

# UTJECAJ PODTIPA PSEĆEG PARVOVIRUSA 2 NA KLINIČKU SLIKU, TIJEK I ISHOD LIJEČENJA

---

**Patačko, Dorotea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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:178:866973>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-06**



*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

Dorotea Patačko

UTJECAJ PODTIPA PSEĆEG PARVOVIRUSA 2  
NA KLINIČKU SLIKU, TIJEK I ISHOD LIJEČENJA

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2021.

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: doc. dr. sc. Vladimir Stevanović

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Ljubo Barbić
2. izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina
3. doc. dr. sc. Vladimir Stevanović
4. dr. sc. Matko Perharić (zamjena)

## **ZAHVALA**

Veliku zahvalnost dugujem svojim roditeljima što su mi omogućili ovaj studij te svim prijateljima što su me pratili na mom putu i bili mi ogromna podrška.

Također veliko hvala svim zaposlenicima Virološkog laboratorija na strpljenju i prenesenom znanju.

Zahvaljujem i svim djelatnicima Klinike za zarazne bolesti na skupljanju uzoraka za ovaj diplomski rad te zahvaljujem i doc.dr.sc. Maji Maurić na pomoći sa statističkom obradom podataka.

A posebno hvala mom mentoru, doc.dr.sc. Vladimiru Stevanoviću na ukazanom povjerenju, svim savjetima te na podršci.

## POPIS KRATICA

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

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

CPV-2a = pseći parvovirus-2 podtip a

CPV-2b = pseći parvovirus-2 podtip b

CPV-2c = pseći parvovirus-2 podtip c

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

VP = strukturalni kapsidni protein

NS = nestrukturalni protein

TfR = (eng. transferrin receptor) transferinski receptor

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

DIK = diseminirana intravaskularna koagulacija

ELISA = (eng. enzyme linked immunosorbent assay) imunoenzimni test

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

DNK = deoksiribonukleinska kiselina

## POPIS TABLICA, SLIKA I GRAFIKONA

### **SLIKE**

Slika 1. Prikaz evolucije psećeg parvovirusa

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

Slika 3. Proširenost CPV-2 antigenskih varijanti

Slika 4. Intranuklearne uklopine u vlaknima srčanog mišića

### **TABLICE**

Tablica 1. Evolucijske aminokiselinske zamjene između FPV, CPV-2 te antigenskih tipova i CPV mutanata

Tablica 2. Podaci korišteni za statističku obradu

Tablica 3. Podaci potrebni za procjenu kliničkog skora

Tablica 4. Sastav kompleta QIAamp cador Pathogen Mini Kit (250)

Tablica 5. Početnice za umnažanje odsječka genoma CPV-2 korištene za izvođenje PCR metode

Tablica 6. Sastav reakcijske smjese za izvođenje PCR metode

### **GRAFIKONI**

Grafikon 1. Zastupljenost pojedinih podtipova CPV-2 virusa u pretraženim uzorcima

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	6
2. PREGLED LITERATURE.....	7
2.1. POVIJEST .....	7
2.2. ETIOLOGIJA.....	8
2.2.1. Građa virusne čestice.....	8
2.2.2. Građa genoma .....	9
2.3. Taksonomija i klasifikacija.....	9
2.4. Tenacitet .....	10
2.5. Proširenost .....	10
2.6. Epizootiologija .....	11
2.7. Patogeneza .....	12
2.8. Klinička slika .....	13
2.9. Patoanatomski i patohistološki nalaz .....	14
2.10. Dijagnostika .....	15
2.11. Liječenje .....	15
2.12. Imunoprofilaksa .....	16
2.13. Javno zdravstvo.....	16
2. MATERIJALI I METODE.....	17
3.1. Uzorkovanje.....	17
3.2. Molekularna metoda dokaza uzročnika .....	19
3.2.1. Priprema uzoraka .....	19
3.2.2. Izdvajanje virusne DNK.....	19
3.2.3. Postupak izvođenja pretrage lančanom reakcijom polimeraze (PCR) .....	20
3.2.4. Elektroforeza u gelu .....	22
3.2.5. Nanošenje uzoraka u gel i postupak elektroforeze .....	24
3.3. Određivanje nukleotidnog slijeda proizvoda PCR-a.....	24
3.4. Statistička obrada podataka .....	25
4. REZULTATI.....	25
5. RASPRAVA .....	27
6. ZAKLJUČCI.....	30
8. LITERATURA .....	30
8. SAŽETAK .....	35
9. SUMMARY .....	36
10. ŽIVOTOPIS .....	37

## 1. UVOD

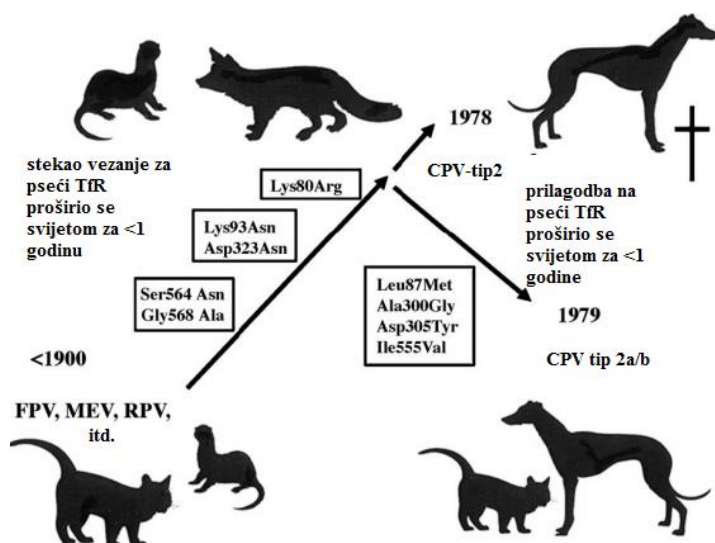
Pseći parvovirus-2 (CPV-2, *eng. canine parvovirus 2*) otkriven je 1978. godine te je poznat kao jedan od najvažnijih crijevnih patogena pasa diljem svijeta. Infekcija ovim virusom uzrokuje visoki morbiditet, i do 100%, te mortalitet, više od 10% (NANDI i sur., 2013.). Dobio je naziv CPV-2 kako bi se razlikovao od usko povezanog CPV-1 (*eng. canine parvovirus 1*). Izvorni CPV-2 naknadno je nadopunjen dvjema antigenskim podtipovima, CPV-2a (*canine parvovirus-2a*) i CPV-2b (*canine parvovirus 2b*). U Italiji, 2000. godine, otkriven je i CPV-2c (*canine parvovirus-2c*) podtip virusa koji se proširio na područje Europe, Sjeverne i Južne Amerike te Azije. Vjeruje se da je pseći parvovirus (CPV, *eng. canine parvovirus*) nastao prilagodbom mačjeg parvovirusa (FPV, *eng. panleukopenia virus*) na novog domaćina, odnosno na psa, preko divljih mesojeda. (NANDI i sur., 2013.). Razlikuju se po šest ili sedam aminokiselina koje su smještene u VP2 kapsidnom proteinu virusa, a koji se vezuje s transferinskim receptorom (TfR, *eng. transferrin receptor*) na stanici domaćina (DECARO i BUONAVOGLIA, 2012.). Ovaj virus je iznimno zarazan te se često pojavljuje u uzgajivačnicama i u skloništima za napuštene životinje te se parvovirusna infekcija s pravom smatra jednom od najvažnijih zaraznih bolesti pasa (MIRANDA i THOMPSON, 2016.). U Republici Hrvatskoj bolest je prvi puta opisana 1980. godine (CVETNIĆ, 1980.), kada je dokazana sposobnost hemaglutinacije u izmetu pasa koji su bolovali od parvovirusne infekcije. Prvo veliko istraživanje koje nam je dalo podatke o proširenosti, čimbenicima rizika, kliničkom očitovanju i molekularnoj epizootiologiji parvovirusne infekcije na području grada Zagreba objavljeno je 2017. godine (MILJAN, 2017.). Cilj ovog diplomskog rada je ustanoviti i objasniti utjecaj podtipa psećeg parvovirusa 2 na kliničku sliku, tijek i ishod liječenja. Nadalje, cilj je i pokušati ustanoviti moguće kliničke znakove koji bi veterinarima praktičarima pomogli u postavljanju kliničke dijagnoze parvovirusne infekcije, ali i u prognozi ishoda ove bolesti.



## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. POVIJEST

Pseći parvovirus je opisan 1978. godine i od tada je poznat kao čest patogen proširen diljem svijeta (SHACKELTON i sur., 2005.). Retrospektivne analize otkrile su da je prvi pozitivan serum bio skupljen 1976. godine. Ipak, neovisna molekularna istraživanja psećeg parvovirusa ukazuju na mogućnost pojave tog virusa deset godina ranije nego što je zapravo prvi puta opisan (SHACKELTON i sur., 2005.). Postavljeno je nekoliko hipoteza o tome kako je pseći parvovirus mogao nastati. Prva je da je direktno mutirao od virusa mačke panleukopenije. Zatim se razmatralo nije li FPV iz vakcine mutirao, a treća je da se virus jednostavno prilagodio novom domaćinu, odnosno psu. Mnogi autori smatraju da je upravo treća hipoteza najvjerojatnija zato što se psi i mačke najčešće drže zajedno u kućanstvima te su najzastupljeniji kao kućni ljubimci. Nedugo nakon toga, 1979. godine, otkriven je novi antigenski podtip, CPV-2a, a od originalnog CPV-2 mogao se razlikovati pomoću monoklonskih protutijela. CPV-2a je ponovno mutirao te je nastao CPV-2b (Slika 1.). Zanimljivo je da je mutacija S297A djelovala povoljno na sam virus iz tog razloga što se s lakoćom održao u populaciji (Tablica 1.) (TRUYEN, 2006.).



**Slika 1.** Prikaz evolucije psećeg parvovirusa. Prilagođeno iz TRUYEN, 2006.

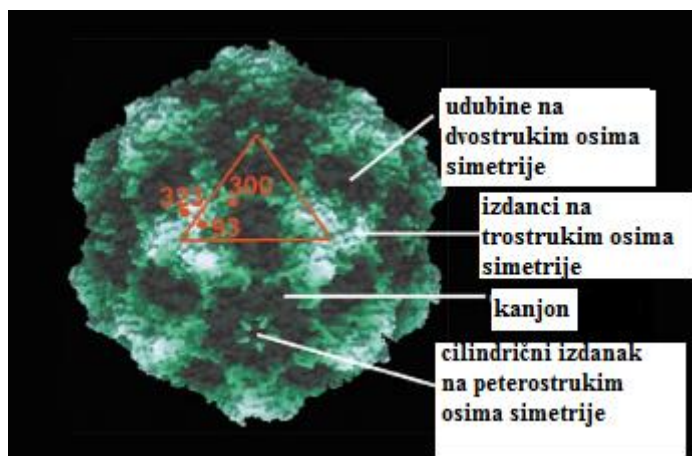
	aminokiselina VP2											
Virus	80	87	93	265	297	300	305	323	426	555	564	568
FPV	K	M	K	T	S	A	D	D	N	V	N	A
CPV-2	R	M	N	T	S	A	D	N	N	V	S	G
CPV-2a	R	L	N	T	S	G	Y	N	N	I	S	G
CPV-2b	R	L	N	T	S	G	Y	N	D	V	S	G
CPV-2c(a)	R	M	N	T	A	D	Y	N	N	V	S	G
CPV-2c(b)	R	L	N	T	A	D	Y	N	D	V	S	G
S297A	R	L	N	T	A	G	Y	N	N D	I	S	G
D426E	R	L	N	T	S A	G	Y	N	E	V	S	G
T265P	R	L	N	P	S	G	Y	N	D	V	S	G

**Tablica 1.** Evolucijske aminokiselinske zamjene između FPV, CPV-2 te antigenskih tipova i CPV mutanata. Prilagođeno iz TRUYEN, 2006.

## 2.2. ETIOLOGIJA

### 2.2.1. Građa virusne čestice

Pseći parvovirus je mali virus, veličine svega 27 nm, ali je zato lako prenosiv uzrokujući hemoragični gastroenteritis te visoki mortalitet zaraženih pasa (DECARO i BUONAVOGLIA, 2012.). Građa kapside mu je ikozaedarna te nema ovojnicu. Sadrži jednolančanu deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) koja je odgovorna za kodiranje tri strukturalna proteina (VP1, VP2, VP3) te dva nestrukturalna polipeptida (NS1, NS2) (OLIVEIRA i sur., 2019.). Protein VP2 je oblik proteina VP1 te je najzastupljenija komponenta kapside. Na cijeli aminokiselinski slijed VP2 proteina nastavlja se N-terminalna regija koju sadrži protein VP1. Protein VP3 je izveden iz VP2 posttranslacijskim proteolitičkim cijepanjem te je prisutan samo u cjelovitom virionu. Kapsida sadrži 60 gradivnih podjedinica koje su nastale kombinacijom VP1 i VP2 proteina. Svaka ta podjedinica sadrži osam beta ploča međusobno povezanih s četiri petlje (NANDI i KUMAR, 2010.). Beta ploče grade udubljenja na peterostrukim osima simetrije te se nazivaju kanjoni i smatraju se mjestom vezanja za stanične receptore. Petlje grade izdanke koji nalikuju šiljcima i nalaze se na trostrukim osima simetrije (HUEFFER i PARRISH, 2003.). Na kapsidi razlikujemo i manje izdanke cilindričnog oblika na peterostrukim osima simetrije te male udubine na dvostrukim osima simetrije. Njihovom osnovnom ulogom smatra se da kanjone učine nedostupnijima protutijelima (Slika 2.) (TSAO i sur., 1991.).



**Slika 2.** Shematski prikaz građe površine kapside CPV-2 virusa. Prilagođeno iz HUEFFER i PARRISH, 2003.

### 2.2.2. Građa genoma

Genom psećeg parvovirusa se sastoji od oko 5200 nukleotida. Također sadrži dva otvorena okvira za čitanje (ORF, eng. *open reading frames*). Na 3' kraju se nalazi prvi otvoreni okvir za čitanje te kodira nestrukturane proteine NS1 i NS2. Na 5' kraju se nalazi drugi otvoreni okvir za čitanje te kodira strukturne proteine VP1 i VP2 (OGBU i sur., 2020.; REED i sur., 1988.).

### 2.3. Taksonomija i klasifikacija

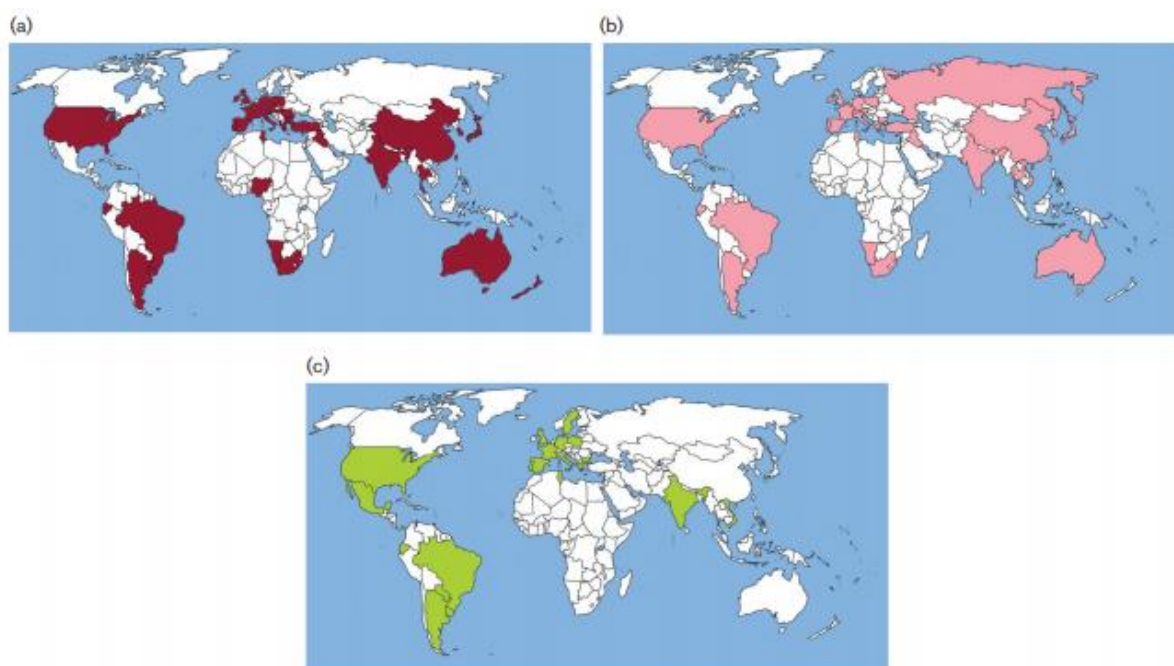
Pseći parvovirus tip 2 pripada rodu *Protoparvovirus*, koji se nalazi unutar porodice *Parvoviridae* (LI i sur., 2019.). Porodica je, na temelju afiniteta prema domaćinu, podijeljena na još dvije podporodice, a to su *Parvovirinae* i *Densovirinae*. *Parvovirinae* inficiraju kralježnjake, dok *Densovirinae* inficiraju kukce i ostale člankonošce. Podporodica *Parvovirinae* sadrži rodove *Parvovirus*, *Dependovirus*, *Erythrovirus*, *Amdovirus* i *Bocavirus* (KERR i sur., 2006.). Zajedno s mačjim panleukopenija virusom, pseći parvovirus tip-2 predstavlja sojeve vrste *Carnivore protoparvovirus 1* (ICTV, virus taxonomy, 2016.).

## 2.4. Tenacitet

Pseći parvovirus izrazito je otporan u okolišu te može preživjeti u izmetom onečišćenom tlu pet mjeseci i duže, ako su uvjeti povoljni (NANDI i KUMAR, 2010.). Otporan je na mnoge detergente, dezinficijense, kao i na promjene temperature i pH vrijednosti (GORHAM, 2018.).

## 2.5. Proširenost

Antigenski podtipovi CPV-2 tijekom godina rasprostranili su se diljem svijeta pa je tako njihova prisutnost zabilježena u 42 države i na 5 kontinenata (MIRANDA I THOMPSON, 2016.). Nedavna epidemiološka istraživanja pokazala su da je CPV-2a podtip najviše zastupljen u Australiji (MEERS i sur., 2007.), većini Azije (YOON i sur., 2009.; PHROMNOI i sur., 2010.; CHOU i sur., 2013.; YI i sur., 2014.; TIMURKAN i sur., 2015.) i europskih država (CAVALLI i sur., 2014.; FILIPOV i sur., 2014.), dok je to jedini zabilježen podtip virusa na Novom Zelandu (OHNEISER i sur., 2015.), u Nigeriji (DOGONYARO i sur., 2013.), Mađarskoj (DEMETER i sur., 2010.), Češkoj Republici (DECARO i sur., 2007.), Sloveniji i Rumunjskoj (DECARO i BUONAVOGLIA, 2012.). CPV-2b je dominantni antigenski podtip u Irskoj (MCELLIGOTT i sur., 2011.), Ujedinjenom Kraljevstvu (DECARO i sur., 2007.), Sjedinjenim Američkim Državama (HONG i sur., 2007.), afričkim državama (DOGONYARO i sur., 2013.) i u četiri azijske države (SOMA i sur., 2013.). Podtipovi CPV-2a i CPV-2b podjednako su rasprostranjeni u Belgiji (DECARO i sur., 2013.), Švicarskoj i Austriji (TRUYEN i sur., 2000.). Približno 20 godina nakon pojave CPV-2c podtipa, isti je uglavnom nađen u državama Južne Amerike i u europskim državama (SUTTON i sur., 2013.). U Poljskoj, svi izolati izolirani od 1995. do 2009. godine pripadali su CPV-2c podtipu (MAJER-DZIEDZIC i sur., 2011.). Što se tiče Hrvatske, na temelju jednog detaljnog istraživanja, utvrđeno je da je CPV-2c neosporivo najzastupljeniji podtip virusa, a čini 59,0% od ukupnog broja pretraženih uzoraka. Slijedi CPV-2a podtip sa zastupljenošću od 23,0% te najmanje zastupljen CPV-2b podtip sa svega 1,0% (MILJAN, 2017.).



**Slika 3.** Proširenost CPV-2 antigenских podtipova. Prilagođeno iz MIRANDA i THOMPSON, 2016. A) prisutnost CPV-2a varijante B) prisutnost CPV-2b varijante C) prisutnost CPV-2c varijante.

## 2.6. Epizootiologija

Pseći parvovirus je veoma opasan enteropatogen koji uzrokuje smrtonosnu bolest kod štenaca, ali i odraslih pasa diljem svijeta (AMRANI i sur., 2016.). Prirodna parvovirusna infekcija moguća je kod pasa (*Canis familiaris*), grmolikih pasa (*Speothos venaticus*), kojota (*Canis latrans*), vukova (*Canis lupus*), lisica koje jedu rakove (*Cerdocyon thous*), grivastih vukova (*Chrysocyon brachyurus*) te mačaka (*Felis silvestris*), iako su zapravo svi pripadnici porodice *Canidae* prijemljivi na infekciju. Pokusno se mogu inficirati i tvorovi i kune (GREEN i DECARO, 2011.). Vektori koji sudjeluju u prijenosu virusa najčešće su ljudi, razna oprema, insekti, glodavci, ali i psi, na čijoj se dlaci virus može dugo zadržati (GREEN i DECARO, 2011.). Najčešća je oronazalna infekcija preko predmeta onečišćenih izmetom. Ciljne stanice za infekciju i umnažanje psećeg parvovirusa su stanice crijevnih kripti i limfoidnih organa, iako to mogu biti i sva ostala tkiva, uključujući i mozak (DECARO i BUONAVOGLIA, 2012.; DECARO i sur., 2009.). Parvovirusna infekcija ne mora nužno rezultirati kliničkim znakovima, pogotovo ako su u organizmu štenca prisutna maternalna protutijela.

Predosponirajući čimbenici za infekciju mogu biti istovremene infestacije crijevnim parazitima ili infekcije crijevnim bakterijama, kao što su *Clostridium perfringens*, *Campylobacter sp.* i *Salmonella spp* (GREEN i DECARO, 2011.). Najprijemljiviji za infekciju su štenci starosti između šest tjedana i šest mjeseci, iako mogu oboljeti i stariji psi (MIRANDA i THOMPSON, 2016.; HOUSTON i sur., 1996.). Od pasmina, posebno su prijemljivi rotweileri, dobermani, engleski špringer španijeli, američki pit bull terijeri i njemački ovčari, dok se mješane pasmine smatraju otpornijima na parvovirusnu infekciju (MIRANDA i THOMPSON, 2016.).

## **2.7. Patogeneza**

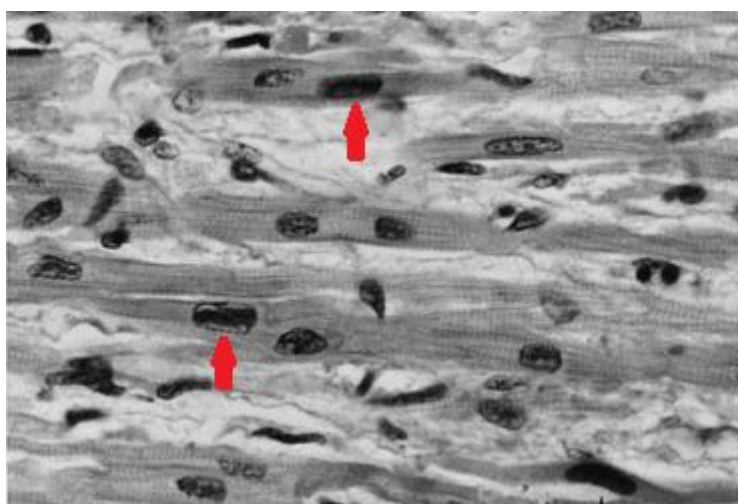
Kako je već spomenuto, do infekcije najčešće dolazi unošenjem virusa oronazalnim putem. Nakon ulaska u organizam, virus se ubrzano umnaža u limfoidnom tkivu orofarinksa, mezenterijalnim limfnim čvorovima i u timusu. Za 1-5 dana nakon infekcije nastupa viremija te se virus krvlju prenosi do kripte tankog crijeva (GREEN i DECARO, 2011.; GODDARD i LEISEWITZ, 2010.). Iduća tri do četiri dana virus inficira brzodijeleće stanice koštane srži i crijevne stanice te u njima tvori intranuklearne eozinofilne uklopine. Rezultat toga je izraziti pad bijelih krvnih stanica u krvi (NANDI i KUMAR, 2010.). U zdravom organizmu psa epitelne stanice crijevnih kripta nastaju iz germinativnog epitela Lieberkühnovih kripta te zatim migriraju do vrha crijevnih resica i tamo sudjeluju u apsorpciji hranjivih tvari. Pseći parvovirus inficira taj germinativni epitel kripta te uzrokuje destrukciju i kolaps epitela, što uzrokuje pojavu proljeva (GREEN i DECARO, 2011.). Izrazite promjene koje uzrokuje virus vidljive su i u timusu. Lezije su obično smještene u germinalnim centrima i u kori timusa, što ukazuje na izraziti tropizam virusa prema mitotički aktivnim stanicama. Rezultat toga je neutropenija i limfopenija (GODDARD i LEISEWITZ, 2010.). Cirkulirajuća protutijela mogu se naći u krvi i prije pojave kliničkih znakova te njihov titar raste kako bolest napreduje (POLLOCK i COYNE, 1993.).

## 2.8. Klinička slika

Inkubacija kod prirodne parvovirusne infekcije iznosi sedam do 14 dana, dok kod pokusne iznosi četiri do pet dana. Uglavnom su zahvaćeni probavni trakt, koštana srž i miokard, iako mogu biti i koža te živčani sustav. Često dolazi i do komplikacija u obliku sekundarnih bakterijskih infekcija i tromboze. Inaparentne ili subkliničke infekcije zabilježene su kod štenaca koji posjeduju maternalna protutijela koja ih štite od bolesti, ali ne i od infekcije. Kod parvovirusnog enteritisa u kliničkoj slici dominiraju klinički znakovi kao što su povraćanje, žuto-sivi do krvavi proljev izrazito neugodnog mirisa, anoreksija i dehidracija. Tjelesna temperatura je povišena (40-41°C) te se javlja leukopenija. Kod ovog oblika smrt može nastupiti unutar dva dana nakon pojave bolesti zbog sepse i/ili diseminirane intravaskularne koagulopatije (DIK). Također se mogu javiti i neurološki simptomi kao rezultat krvarenja u središnjem živčanom sustavu, DIK-a, hipoglikemije, sepse ili poremećenog acido-baznog i elektrolitnog statusa. Moguća je i pojava kliničkih znakova na koži u obliku multiformnih eritema, ulceracija na šapama, sluznici usne šupljine i vagine te vezikula u usnoj šupljini. Zbog intrauterine infekcije dolazi do miokarditisa, kada štenci uginu odmah po rođenju ili kratko nakon epizoda dispneje i povraćanja. Znakovi zatajenja srca mogu prethoditi crijevnom obliku bolesti ili se pojave iznenada bez ikakvih drugih kliničkih znakova. Miokarditis je postao rijedak zbog toga što su mnoge kuje vakcinirane ili su bile izložene CPV podtipovima te su stvorile snažan imunološki odgovor. Štence koji sišu štiti visoki titar maternalnih protutijela te tako sprječava infekciju u ranom razdoblju života kada se i stanice miokarda umnožavaju. Tromboza ili flebitis mogu se razviti zbog postavljenog intravenskog katetera ili zbog prisutnosti visceralnih tromba (GREEN i DECARO, 2011.).

## 2.9. Patoanatomski i patohistološki nalaz

Patoanatomske promjene što ih uzrokuje CPV-2 rezultat su njegovog tropizma za brzodijeleće stanice. Makroskopske promjene su nespecifične. Za crijevni oblik bolesti svojstvene su lezije smještene uglavnom u jejunumu i ileumu. U zahvaćenim dijelovima crijeva vidljiva su subserozna krvarenja ili kongestija crijevne sluznice. U lumenu se nalazi tamni, ponekad i krvavi vodenasti sadržaj (NANDI i KUMAR, 2010.). Vidljivo je i povećanje, odnosno edem torakalnih i/ili abdominalnih limfnih čvorova. Mikroskopske crijevne lezije uključuju nekrozu epitela kripti u tankom crijevu i intranuklearne virusne uklopine u tim epitelnim stanicama, ali i u skvamoznom epitelu gornjeg dijela probavnog sustava. Crijevne resice su skraćene te dolazi do kolapsa lamine proprije (GREEN i DECARO, 2011.). Na prerezu, pluća su edematozna i hemoragična. Pleuralna šupljina može sadržavati veće količine serozne tekućine, koja je ponekad može sadržavati i krv (ROBINSON i sur., 1980.). Nekroza i deplecija limfoidnog tkiva uočava se u Peyerovim pločama, mezenterijalnim limfnim čvorovima, timusu i slezeni (GREEN i DECARO, 2011.). Za parvovirusni miokarditis svojstveno je povećanje srca s osobitom dilatacijom lijeve pretkljetke i kljetke (NANDI i KUMAR, 2010.). Mikroskopski se vide multifokalne infiltracije limfocita i plazma stanica te bazofilne intranuklearne uklopine u vlaknima srčanog mišića (GREEN i DECARO, 2011.).



**Slika 4.** Intranuklearne uklopine u vlaknima srčanog mišića (crvene strelice). Prilagođeno iz AGUNGPRIYONO i sur., 1999.



## 2.10. Dijagnostika

Sumnja na parvovirusnu infekciju može se postaviti na temelju kliničkih znakova, kao što su povraćanje, proljev i leukopenija u necijepljenih pasa (GODDARD i LEISEWITZ, 2010.). Protutijela na CPV-2 se mogu dokazati u krvnom serumu pomoću inhibicije hemaglutinacije ili pomoću brzog ELISA testa (*eng. enzyme linked immunosorbent assay*) kojeg veterinari često koriste u svojim praksama. Ti testovi nisu pouzdani jer psi mogu biti seropozitivni ako su preboljeli subkliničku infekciju, ako su još uvijek prisutna maternalna protutijela ili ako su psi bili cijepljeni (MYLONAKIS i sur., 2016.). ELISA test za detekciju virusa u fecesu je specifičan, ali slabo osjetljiv. Problem predstavlja kratka prisutnost virusa u fecesu, a i izlučivanje virusa fecesom može biti intermitentno. Hemaglutinacija se također koristi za dokaz prisutnosti virusa u uzorcima fecesa i crijeva (GREEN i DECARO, 2011.). Taj test je osjetljiviji od ELISA testa, ali je slabo specifičan (DAHIYA i sur., 2004.). Dokaz prisutnosti virusa pomoću elektronskog mikroskopa slabo je osjetljiva tehnika. Imunohistokemijske metode omogućuju detekciju virusnog antigena u mnogim tkivima u obliku intranuklearnih uklopina (DECARO i BUONAVOGLIA, 2012.). Molekularne metode za dokaz CPV-2 virusa najzastupljenije su metode u današnje vrijeme. Metode koje se zasnivaju na lančanoj reakciji polimerazom (PCR, *eng. polymerase chain reaction*) jesu izrazito osjetljive. Ova metoda omogućuje razlikovanje CPV-2 varijanti koristeći specifične početnice. Metoda PCR u stvarnom vremenu (*real time-PCR, eng. real time polymerase chain reaction*) dokazuje pristunost virusne DNK te omogućuje njezino kvantificiranje (NANDI i KUMAR, 2010.).

## 2.11. Liječenje

Liječenje parvovirusne infekcije svodi se na potpurnu i simptomatsku terapiju. One uključuju tekućinsku terapiju, antibiotsku terapiju i zaustavljanje povraćanja. Za ispravljanje hipokalijemije, hipoglikemije i hipoproteinemije koristi se kristaloidna i koloidna intravenska tekućinska terapija (MYLONAKIS i sur., 2016.). Antibiotska terapija preporuča se iz razloga što oštećenje epitela crijeva omogućava ulazak bakterija u krv, a neutropenija povećava rizik od sepse. Najučinkovitija je kombinacija penicilina i aminoglikozida, uz prethodnu adekvatnu hidraciju životinje. Od antiemetika najboljim su se pokazali antagonisti serotoninskih

receptora, kao što su ondansetron i dolasetron. Hranjenje putem nazogastrične sonde preporuča se od prvog dana liječenja ako štene ne jede samostalno. U slučaju jake anemije i hipoproteinemije potrebna je transfuzija pune krvi, odnosno plazme (GREEN i DECARO, 2011.). Novi aspekti liječenja uključuju i transplantaciju fekalne mikrobiote koja rezultira bržim oporavkom i kraćim vremenom hospitalizacije (PEREIRA i sur., 2018.).

## **2.12. Imunoprofilaksa**

Kod svih sisavaca, pa tako i kod pasa, mladunče od majke prima protutijela preko placente i kolostruma. Štene primi oko 90% svih protutijela na CPV upravo preko kolostruma. Poluživot maternalnih protutijela iznosi oko deset dana (GODDARD i LEISEWITZ, 2010.). Štene se prvi puta cijepi u dobi od šest do osam tjedana. Nakon izvršene primovakcinacije, cjepivo se aplicira dvokratno u razmaku od dva do četiri tjedna. Zadnje, treće cjepivo štene mora primiti u dobi od 16 tjedana. Ako se pas prvi puta cijepi nakon navršenih 16 tjedana, dostatno je dvokratno cijepljenje u razmaku od dva do četiri tjedna (MYLONAKIS i sur., 2016.). Nadocijepljivanje se obavlja nakon što je prošla godina dana od primovakcinacije, a nakon toga svake tri godine (NANDI i sur., 2013.). Modificirana živa cjepiva pružaju dulju imunost te se najčešće koriste (MYLONAKIS i sur., 2016.). Dakako, na tržištu su dostupna različita jedno i viševaljana te mrtva i atenuirana cjepiva protiv parvovirusne infekcije. Istraživanja su pokazala da vakcine koje sadrže CPV-2 i CPV-2b uspješno štite od svih poznatih CPV-2 podtipova, uključujući i noviji CPV-2c podtip (NANDI i KUMAR, 2013.; SPIBEY i sur., 2008.). U Hrvatskoj se najčešće koriste Vanguard Plus 5, Nobivac te Canigen DHPPi/L. Prvo cjepivo sadrži modificirani živi originalni CPV te CPV-2C podtip. Drugo sadrži atenuirani živi CPV-2b, a posljednje živi atenuirani Cornell soj.

## **2.13. Javno zdravstvo**

U dostupnoj pretraženoj literaturi nema podataka o prijenosu psećeg parvovirusa 2 na čovjeka i obrnuto. Stoga parvovirusna infekcija nema značaj u javnom zdravstvu.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Uzorkovanje

Za ovo istraživanje sakupljeno je i obrađeno ukupno 78 uzoraka fecesa i obrisaka rektuma pasa zaprimljenih na Kliniku za zarazne bolesti Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Navedeno uzorkovanje i prikupljanje podataka o životinjama uključivalo je razdoblje od 1. siječnja 2019. do 1. prosinca 2020. Sve životinje, odnosno psi pokazivali su znakove akutnog gastroenteritisa. Dostupni podaci o nacionalu, anamnezi, kliničkom pregledu i tijeku liječenja korišteni su kod 60 pasa, u svrhu statističke obrade (Tablica 2.). Korišten je i tzv. klinički skor u rasponu od jedan do pet, a koji označava stanje životinje kod prvog prijema u ambulantu. Kod procjene skora koristili su se podaci o trajanju bolesti, ponašanju životinje, ambulantomnoj sposobnosti, utvrđenom hidracijskom stanju te izmjerenoj rektalnoj tjelesnoj temperaturi (Tablica 3.) (MARKOVICH i sur., 2012.).

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

PODACI O VLASNIKU	NACIONAL	ANAMNEZA	KLINIČKI PREGLED	TIJEK LIJEČENJA	ISHOD BOLESTI
Privatna osoba/azil	Pasma	Razlog dolaska	Povraćanje	Trajanje hospitalizacije	
	Dob	Podaci o cijepljenju	Proljev		
	Spol	Dehelmentizacija	Krvavi proljev		
			Lančana reakcija polimerazom		

**Tablica 3.** Podaci potrebni za procjenu kliničkog skora

KLINIČKI SKOR	TRAJANJE BOLESTI U DANIMA	PONAŠANJE ŽIVOTINJE	AMBULANTNA SPOSOBNOST	UTVRĐENO HIDRACIJSKO STANJE	REKTALNA TJELESNA TEMPERATURA
1	<1	BISTRO, OPREZNO	NORMALNA	FIZILOŠKI	FIZIOLOŠKA
2	1-3	MIRNO, OPREZNO PA DO ZNAKOVA DEPRESIJE	NORMALNA	DEHIDRACIJA 5%	FIZIOLOŠKA DO VRUĆICA
3	2-3	ZNAKOVI DEPRESIJE	SLABOST	DEHIDRACIJA 6%-7%	FIZIOLOŠKA DO VRUĆICA
4	>3	ZNAKOVI DEPRESIJE	SLABOST I NERADO HODANJE	DEHIDRACIJA 7%-8%	FIZIOLOŠKA DO VRUĆICA
5	>3	STUPOROZNO STANJE	LEŽEĆI POLOŽAJ	DEHIDRACIJA 8%-10%	NIŽA OD FIZIOLOŠKE

Svi uzorci do korištenja, odnosno obrade su bili uskladišteni u ledenici pri -80°C u Virološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### 3.2. Molekularna metoda dokaza uzročnika

Prisustvo CPV-2 dokazano je primjenom lančane reakcije polimerazom kojom se umnažao odsječak genoma virusa. Ukupna DNK izolirana je iz uzoraka fecesa ili obrisaka rektuma te je korištena za molekularni dokaz CPV-2 u uzorcima.

#### 3.2.1. Priprema uzoraka

Uzorci su u Virološki laboratorij stizali u obliku obrisaka rektuma ili uzoraka fecesa. Štapić s obriskom rektuma stavio se u eppendorf epruvetu te se nepotreban dio štapića odrezao škarama. Zatim se u biozaštitnoj komori u epruvete dodala puferirana solna otopina u količini od 1000  $\mu$ L. Načinjena otopina kratko se promiješala na tresilici te se nakon toga centrifugirala 15 sekundi na 6000 okretaja.

#### 3.2.2. Izdvajanje virusne DNK

Za izdvajanje ukupne DNK virusa koristio se komercijalni komplet QIAamp cador Pathogen Mini Kit (250) (QIAGEN, Hilden, Njemačka) sukladno uputama proizvođača.

**Tablica 4.** Sastav kompleta QIAamp cador Pathogen Mini Kit (250)

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

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

Za izvođenje PCR metode koristili su se sljedeći reagensi:

- voda slobodna od RNK-za i DNK-za (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- reakcijski pufer 10x koncentriran
- 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- 25 mM dNTP
- početnice N1-N2, N3-N4 (HORIUCHI i sur., 1998.)
- početnice V5-V56, V22-V41, V51-V52 (HORIUCHI i sur., 1998.)
- Taq Platinum 5u/μl (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)

**Tablica 5.** Početnice za umnažanje odsječka genoma CPV-2 korištene za izvođenje PCR metode. Prilagođeno iz HORIUCHI i sur., 1998.

OZNAKA POČETNICE	NUKLEOTIDNI SLIJED 5' → 3'
N1	5'-CATAG-ACCGTTACTGACATTC-3'
N2	5'-TATGTCTG-TCTTGATACTTC-3'
N3	5'-CATTTTGGAAATATGATAGCA-3'
N4	5'-ATTTGCTTAGTTCCTTTACCT-3'
V5	5'-AGCTATGAGATCTGAGACA-3'
V56	5'-AATTGGATTCCAAGTATGAG-3'
V22	5'-TGT-CAAAATAATTGTCCTG-3'
V41	5'-ATTGTAT-ACCATATAACAAACC-3'
V51	5'-CCAAC TAAAAGAAGTAAACC-3'
V52	5'-AT-TAATGTTCTATCCCATTG-3'

**Tablica 6.** Sastav reakcijske smjese za izvođenje PCR metode

REAGENS	KOLIČINA ZA 1 UZORAK
Voda	5,60 $\mu$ l
Pufer 10X	1,25 $\mu$ l
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,75 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	1,0 $\mu$ l
Početnica Hfor (10 $\mu$ M)	0,625 $\mu$ l
Početnica 555rev (10 $\mu$ M)	0,625 $\mu$ l
Taq Platinum 5u/ $\mu$ l	0,156 $\mu$ l

Svi reagensi koji čine reakcijsku smjesu za izvođenje PCR metode otočeni su u plastičnu epruvetu u količini koja se prethodno izračunala, ovisno o broju uzoraka. Otopina se potom kratko promiješala na tresilici i centrifugirala. Nakon toga se u PCR Eppendorf epruvetice otpipetiralo 10  $\mu$ l reakcijske smjese te se dodalo 2,50  $\mu$ l izdvojene DNK svakog pojedinog uzorka. Tako pripremljeni uzorci su se posložili u jažice u PCR uređaju koji je bio programiran na sljedeći temperaturni program:

95°C	5 minuta	
95°C	30 sekundi	} 10x
50°C	1 minuta	
72°C	2 minute	
95°C	30 sekundi	
45°C	1 minuta	
72°C	2 minute	
72°C	10 minuta	
10°C	∞	

hlađenje na +4°C

### 3.2.4 Elektroforeza u gelu

Metodom elektroforeze u gelu provjerena je uspješnost prepisivanja i umnažanja ciljnog dijela virusnog genoma pretraživanih uzoraka. Osnovno načelo rada elektroforeznog razdvajanja je to da čestice različite mase i naboja, pod utjecajem električnog polja, za isto vrijeme prelaze različite puteve u agaroznom gelu.

#### Oprema, pribor i reagensi:

- analitička vaga (PB153) (Mettler Toledo, Kusunacht, Švicarska)
- 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)
- uređaj za snimanje gelova (Gel Doc 200, Bio-Rad, Hercules, California, SAD)
- kalup za gel
- češljic za tvorbu jažica u gelu
- Eppendorf pipeta 20 µl



- TAE pufer
- agaroz (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- boja za gel (Ethidium Bromide Solution 10 mg/ml, Bio-Rad Laboratories, SAD)
- marker DNA Ladder 100 pb (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- DNA Loading Buffer (6x) (Lonza, Rockland, Maine, SAD)

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

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

- 93,5 g EDTA (EDTA Disodium salt, Sigma Aldrich, SAD)
- 242 g Tris (TRIZMA base, Sigma Aldrich, SAD)
- 57 ml ledene octene kiseline (Kemika, Hrvatska)

Najprije se priprema 0,5 M otopina EDTA tako da se 93,5 g EDTA stavi u 400 ml redestilirane vode uz podešavanje pH na 8,0 dodavanjem kristala NaOH te se nakon toga dopuni redestiliranom vodom do volumena od 500 ml. Zatim se 242 g Tris-a otopi u 750 ml redestilirane vode te se doda 57 ml ledene octene kiseline i 100 ml 0,5 M EDTA i dopuni se redestiliranom vodom do oznake od 1000 ml.

Za pripremu gela za elektroforezu potreban je TAE pufer koncentracije 1x, stoga željenu koncentraciju pripremimo miješanjem 110 ml TAE pufera koncentriranog 50x i 490 ml redestilirane vode.

#### **3.2.4.2. Pripremanje gela za elektroforezu**

U Erlenmayerovu tikvicu se dodalo 75 ml pufera TAE koncentriranog 1x. Zatim se pomoću analitičke vage odvagunulo 0,75 g agaroze koja se dodala u tikvicu. Tikvica se stavila u mikrovalnu pećnicu te se zagrijavala tijekom 3 minute dok otopina nije postala potpuno bistra. Otopina se hladila do 50°C te se zatim dodala boja za gel u količini od 5 µl. Prethodno su se postavile vanjske gumene stranice na kalup za gel kako bi se spriječilo njegovo

razlijevanje te su umetnuti češljici za tvorbu jažica. Otopina se zatim izlila u kalup za gel te se ostavila hladiti na sobnoj temperaturi i zaštićena od direktne svjetlosti. Nakon hlađenja i polimerizacije gela češljici su izvađeni, a vanjske gumene stranice su maknute s rubova kalupa za gel. Kalup se zatim uronio u kadicu za elektroforezu, tako da je dio gela s jažicama bio okrenut u smjeru katode. Kadica za elektroforezu se do oznake napunila TAE-puferom koji je u potpunosti morao prekriti gel.

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

Na parafinskom filmu pomiješalo se 3 $\mu$ l boje (DNA Loading Buffer (6x)) i 2,50  $\mu$ l uzorka te se postupak ponovio za svaki pretraživani uzorak. Eppendorf pipetom uzorci pomiješani s bojom nanoseni su po rednom broju u jažice. U posljednje tri jažice nanosene su pozitivna kontrola (FPV 7° ili Vanguard cjepivo), negativna kontrola i DNA marker. Kadica ispunjena TAE puferom u koju se uronio gel spojila se na istosmjernu struju napona 100 V, jačine 700 mA i snage 150 W. Postupak elektroforeze trajao je 30 minuta. Nakon tog vremena, gel se izvadio iz kadice, a rezultati su se očitali pomoću uređaja za snimanje gelova. Veličina dobivenih odsječaka mogla se procijeniti usporedbom položaja dobivenog fragmenta s DNA markerom. Prisutnost umnoženog fragmenta odgovarajuće veličine označavala je uspješan dokaz uzročnika PCR metodom.

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

Nukleotidni slijed umnoženog odsječaka virusne DNK određivan je u svrhu molekularne tipizacije i analize psećeg parvovirusa. 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 polimorfni mjesta unutar slijeda svakog pojedinog uzorka.

### 3.4. Statistička obrada podataka

Obrada prikupljenih podataka provedena je statističkim programom Dell Statistica (data analysis software system), version 12. software.dell.com. (Dell Inc., 2015). Osim parametara deskriptivne statistike načinjena je i statistička analiza rezultata. Kvalitativne varijable, učestalosti, obrađene su hi-kvadrat testom. Granica statističke značajnosti označena je na  $p < 0,05$ . S obzirom da su podaci o trajanju hospitalizacije pojedinih životinja pratili normalnu raspodjelu analizirani su student-t-testom.

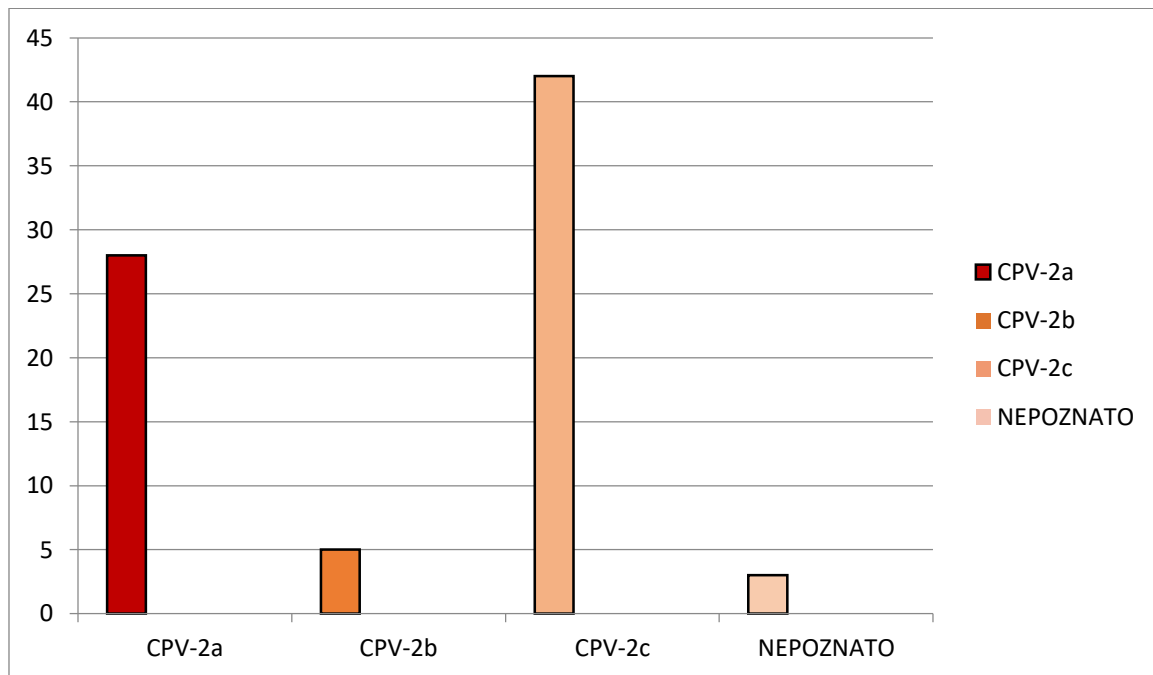
## 4. REZULTATI

Istraživanjem je bilo obuhvaćeno 78 životinja. Iz prikupljenih anamnestičkih podataka bilo je vidljivo da je 44 psa imalo vlasnika, dok ih 34 bilo iz skloništa za napuštene životinje. Uočena je velika pasminska raznolikost pa su tako zabilježene 22 različite pasmine. Najviše je bilo mješanaca (N=33, 42,31%), labrador retrievera (N=4), njemačkih ovčara (N=2), belgijskih ovčara (N=2), američkih stafforda (N=2), a kod 17 pasa je pasmina ostala nepoznata. U ostalih pasmina zastupljenost je bila do jedne jedinke. Ženskog spola bilo je 26 pasa, muškog 34, dok je kod 18 pasa spol ostao nepoznat. Prilikom prvog prijema životinje, iz anamnestičkih podataka smo saznali da je 48 pasa povraćalo, 10 ih nije povraćalo, a kod 20 pasa taj je podatak ostao nepoznat. Također, proljev je imalo 50 pasa, sedam pasa nije imalo proljev, a kod 21 psa taj je podatak isto tako ostao nepoznat. Od 50 pasa koji su imali proljev, kod 38 pasa taj proljev je bio krvav. Klinički znakovi od strane dišnog sustava zabilježeni su kod osam pasa.

Svih 78 pretraženih uzoraka bilo je pozitivno na prisutnost CPV-2. Pozitivan rezultat podrazumijevao je dokaz uzročnika PCR metodom te prisutnost umnoženog fragmenta veličine 1005 pb na gelu za elektroforezu. Dobiveni proizvodi PCR metode poslani su na određivanje nukleotidnog slijeda. Kod tri proizvoda PCR metode, unatoč pozitivnom rezultatu te nekoliko ponavljanja cijelog postupka, nije bilo moguće odrediti nukleotidni slijed.

Zastupljenost pojedinih podtipova CPV-2 u 78 pretraženih uzoraka bila je nadasve zanimljiva te iznenađujuća. Predominantni podtip CPV-2 virusa je bio CPV-2c (N=42, 53,85%), slijedio ga je CPV-2a (N=28, 35,9%), a najmanje zastupljen je bio CPV-2b (N=5, 6,41%) Kod tri uzorka nije bilo moguće odrediti o kojem se podtipu virusa radi (Grafikon 1.)

**Grafikon 1.** Zastupljenost pojedinih podtipova CPV-2 virusa u pretraženim uzorcima



U statističkoj analizi prikupljenih podataka korišten je hi-kvadrat test te studentov-t-test. Usporedbom pojavnosti određenog podtipa CPV-2 kod pasa koji su imali vlasnika i pasa iz azila, ustanovljeno je da CPV-2c ima izrazitu tendenciju pojavnosti kod pasa iz azila, a CPV-2a i CPV-2b kod pasa koji su imali vlasnika ( $p=0,054992$ ). Cijepljene životinje su razvile kliničku sliku neovisno jesu li bile zaražene tipom 2a i 2b ili 2c ( $p=0,17459974$ ). Dobna predispozicija je značajna te se CPV-2c javlja značajno češće u pasa starijih od tri mjeseca, u odnosu na pse mlađe od tri mjeseca kod kojih je zabilježena češća pojavnost podtipova CPV-2a i CPV-2b ( $p=0,04391$ ). Zbog nedovoljnog broja jedinki za pojedine pasmine, nije bilo moguće odrediti pasminsku predispoziciju za obolijevanje od parvovirusne infekcije pasa niti zastupljenost pojedinih virusnih podtipova. Statističkom obradom nije dokazano da su čistokrvne pasmine bile češće zastupljene od mješanaca ( $p=1$ ). Nije ustanovljena spolna

predispozicija. Prilikom prvog prijema životinje u ambulantu, ustanovljeno je da između podtipova nema značajne razlike u kliničkom skor (p=0,780707). Zanimljivo je da postoji tendencija da se podtipovi CPV-2a i CPV-2b češće javljaju kod pasa cijepljenih protiv zaraznih bolesti, nego podtip CPV-2c (p=0,145493). Nije ustanovljen statistički značajan utjecaj podtipa virusa na učestalost stacioniranja bolesne životinje (p=1). Duljina hospitalizacije se nije mogla dovesti u vezu s podtipom virusa te je ustanovljeno da nema značajne razlike između podtipova (t=1,3253, p=0,190889). Također se utvrdilo da nema značajne razlike u preživljavanju životinja inficiranih jednim od tri podtipa virusa (p=1). Cijepljene životinje nisu imale statistički značajno preživljavanje u odnosu na necijepljene (p= 0.96432941). Klinički skor se isto nije razlikovao između cijepljenih i necijepljenih životinja (p= 0.87190032).

## 5. RASPRAVA

Pseći parvovirus-2, uzročnik akutnog hemoragijskog enteritisa i miokarditisa, smatra se jednim od najvažnijih i najčešćih crijevnih patogena u pasa (NANDI i sur., 2013.). Iako je CPV-2 prvi puta opisan davne 1978. godine, u Hrvatskoj je prvi puta zabilježen 1980. godine, na temelju dokaza sposobnosti hemaglutinacije u izmetu psa koji je bolovao od parvovirusne infekcije (CVETNIĆ, 1980.). Od tada pa do 2017. godine nije postojalo niti jedno istraživanje na tu temu, a koje se provelo u Hrvatskoj. Stoga vrijedi spomenuti istraživanje provedeno 2017. godine, a koje nam je dalo uvid u prve opsežne podatke o o proširenosti, čimbenicima rizika, kliničkom očitovanju te molekularnoj epizootiologiji infekcije parvovirusom pasa na području grada Zagreba (MILJAN, 2017.).

Istraživanjem u ovom radu željelo se utvrditi kako podtip psećeg parvovirusa 2 utječe na kliničku sliku, tijek i ishod liječenja. Pretraženo je 78 uzoraka uzetih od pasa koji su došli u ambulantu s kliničkom slikom akutnog gastroenteritisa te je svih 78 uzoraka, pretraženo PCR metodom, bilo pozitivno na prisutnost CPV-2. Najzastupljeniji podtip psećeg parvovirusa zasigurno je bio CPV-2c, i to kod 42 psa. Slijedio ga je podtip CPV-2a, utvrđen kod 28 pasa. Najmanje zastupljen bio je podtip CPV-2b, zabilježen kod pet pasa. Veoma slična zastupljenost pojedinih podtipova virusa zabilježena je i u nekim europskim državama, kao što su Italija i Njemačka (DECARO i sur., 2011.; MIRANDA i sur., 2016.). Hrvatskoj

najbliže europske države, Mađarska i Slovenija, najčešće susreću CPV-2a podtip, što je jako zanimljivo (DEMETER i sur., 2010.; DECARO i BUONAVOGLIA, 2012.). U susjednoj nam Austriji CPV-2a i CPV-2b podtipovi podjednako su rasprostranjeni (TRUYEN i sur., 2000.). Na području Republike Hrvatske najzastupljeniji je CPV-2c podtip (59,0%), zatim CPV-2a podtip (23,0%), a posljednji je podtip CPV-2b sa svega 1,0% (MILJAN, 2017.). Izolati opisani u ovom radu pripadali su najčešće tipu CPV-2c (N=42, 53,85%), slijedio ga je CPV-2a (N=28, 35,9%), a najmanje zastupljen je bio CPV-2b (N=5, 6,41%). Iz navedenog se može zaključiti da je proširenost podtipova psećeg parvovirusa u Hrvatskoj stalna. Iako je došlo do neznatnog povećanja udjela podtipa 2b, i dalje je najzastupljeniji podtip 2c kojeg slijedi podtip 2a. Postavlja se pitanje koji su to epizootiološki čimbenici koji dovode do ovakve distribucije podtipova? Djelomični odgovor nam daje činjenica da se podtip CPV-2c češće dokazivao kod pasa iz skloništa za životinje, a podtipovi CPV-2a i CPV-2b kod pasa koji su imali vlasnika. Iz osobne komunikacije s djelatnicima skloništa, koja su obuhvaćena u ovom istraživanju, utvrđeno je da se imunoprofilaksa parvoviroze provodi u svake životinje prvog dana prijema u nastambu. Veća zastupljenost CPV-2c podtipa u skloništima bi se možda mogla objasniti na način da CPV-2c podtip neprestano cirkulira u skloništima za nezbrinute životinje, a zbog velikog opterećenja prostora zbog stalnog prijema novih životinja, mjere opće profilakse su nedovoljne te se životinje zaražavaju usprkos cijepljenju. Druga je mogućnost i da dolazi do proboja cijepne imunosti kada se psi zaraze podtipom 2c. Rezultati ovog istraživanja to opovrgavaju. Psi koji su oboljeli od parvoviroze unatoč cijepljenju najčešće su bili zaraženi podtipovima 2a i 2b (69,23%), a životinje zaražene podtipom 2c bile su cijepjene u 50% slučajeva. Ovi udjeli govore upravo suprotno, iako razlika nije statistički značajna.

U ovom radu pokušalo se istražiti čimbenike dispozicije u pretraženih pasa, a isto tako se pokušalo i ustanoviti postoje li razlike u epizootiologiji pojedinih podtipova psećeg parvovirusa 2. Opće prihvaćeno je mišljenje da od parvovirusne infekcije obolijevaju pretežito štenci u dobi od šest tjedana do šest mjeseci (MIRANDA i THOMPSON, 2016.). Zanimljivo, u ovom radu je ustanovljeno da se CPV-2c podtip značajno češće javlja kod pasa starijih od tri mjeseca, dok se podtipovi CPV-2a i CPV-2b češće javlja kod pasa mlađih od tri mjeseca. Ovo je značajna razlika u epizootiologiji međutim razloge ove dobne predispozicije tek treba ispitati. Raniji podaci ukazuju na to da su čistokrvni psi primjemljivi na parvovirusnu infekciju, za razliku od mješanaca (MIRANDA i THOMPSON, 2016.). Ovo istraživanje dokazalo je upravo suprotno. Mješanci su činili 33 jedinke od 61 za koje je pasmina bila

poznata. Statistička analiza nije pokazala značajnu razliku u zastupljenosti čistokrvnih pasa i mješanaca. U ovom istraživanju svi psi iz skloništa su bili križane pasmine te se ovaj rezultat treba uzeti obazrivo.

Kliničkom slikom prevladava krvavi, smrdljivi, profuzni proljev te povraćanje (GREEN i DECARO, 2011.), što je i ustanovljeno kod većine pretraživanih pasa u ovo istraživanju. Rađena je i procjena kliničkog skora, odnosno procjena stanja u kojem se nalazi životinja kod prvog prijema u ambulantu. Jedno istraživanje je ukazalo na to da je psima inficiranim CPV-2b podtipom dodijeljen klinički skor 3, a kod infekcije podtipom CPV-2c to je bio klinički skor 2 (MARKOVICH i sur., 2012.). Ovim istraživanjem je ustanovljeno da nema značajne razlike u kliničkom skoru između pojedinih podtipova virusa. Podtip virusa dakle nema utjecaja na težinu oboljenja pasa do posjeta veterinaru.

Utjecaj pojedinih podtipova virusa na potrebu za bolničkim liječenjem životinje, duljinu hospitalizacije te preživljavanje životinje opisano je u svega nekoliko radova te se nije dokazao nikakav utjecaj (GODSALL i sur., 2010.). Isti su rezultati ovog istraživanja. Ovo je osobito bitno kod davanja prognoze ishoda liječenja te procjene troškova, jer neovisno o podtipu oni se ne razlikuju.

Imunoprofilaksa ima veliki značaj u zaštiti psa od parvovirusne infekcije, ali isto tako i kod preživljavanja nakon infekcije (DECARO i sur., 2009.). Unatrag nekoliko godina među veterinarima vlada mišljenje da cjepivo pse ne štiti dovoljno od moguće parvovirusne infekcije te da je sve češća pojava bolesti kod pasa s urednim cijepnim statusom. Mogući razlog je to što cjepivo sadrži izvorni podtip CPV-2, a na terenu cirkuliraju neki sasvim drugi podtipovi od kojih psi nisu zaštićeni (NANDI i sur., 2013.). Ovim istraživanjem nije dokazan češći prodor imunosti kod pasa inficiranih tipom 2c. Isti je rezultat bio opisan i 2017. godine (MILJAN, 2017.). Zanimljivo je da cijepljenje nije utjecalo na klinički skor prilikom prijema, kao niti na preživljavanje. Ovo je od posebnog značaja za veterinare praktičare. Vrlo je vjerojatno da je određeni broj životinja koje su bile cijepjene imao subklinički oblik infekcije ili kliničku sliku koja nije upućivala na parvovirusnu infekciju pasa te uzorci nisu upućeni na dijagnostičke pretrage za potvrdu CPV-2 infekcije. Po drugoj strani, psi koji jednom razviju kliničku sliku koja odgovara parvovirozi zahtijevaju agresivno liječenje neovisno o cijepnom statusu.

Od prvog opisa bolesti, parvoviroza pasa ne gubi na značaju u veterinarskoj medicini. Sustavno praćenje epizootologije i kliničkog očitovanja bolesti, kako je to predstavljeno u

ovom istraživanju, izrazito je važno. Ovakvi podaci mogu dati osnovu izmjena u profilaksi i liječenju ove bolesti te sustavnom suzbijanju.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. U Republici Hrvatskoj zastupljena su sva tri podtipa CPV-2.
2. CPV-2c podtip virusa češće se javlja kod pasa iz skloništa za nezbrinute životinje, a podtipovi CPV-2a i CPV-2b kod pasa od privatnih vlasnika.
3. Podtipovi CPV-2a i CPV-2b se češće javljaju u štenadi do tri mjeseca starosti, dok se podtip CPV-2c značajno češće javlja kod starijih životinja.
4. Težina kliničke slike, duljina i ishod liječenja parvoviroze pasa ne ovisi o podtipu virusa.
5. Cijepljenje zaštićuje pse od infekcije i novim CPV-2c podtipom.
6. Psi koji razviju kliničku sliku, koja upućuje na parvovirozu, zahtijevaju agresivan pristup liječenju neovisno o cjepnom statusu.

## **8. LITERATURA**

AGUNGPRIYONO, D. R., K. UCHIDA, H. TABARU, R. YAMAGUCHI, S. TATEYAMA (1999): Subacute Massive Necrotizing Myocarditis by Canine Parvovirus Type 2 Infection with Diffuse Leukoencephalomalacia in a Puppy. *Vet Pathol* 36, 77–80.



AMRANI, N., C. DESARIO, A. KADIRI, A. CAVALLI, J. BERRADA, K. ZRO, G. SEBBAR, M. L. COLAIANNI, A. PARISI, G. ELIA, C. BUONAVOGLIA, J. MALIK, N. DECARO (2016): Molecular epidemiology of canine parvovirus in Morocco. *Infection, Genetics and Evolution* 41, 201-206.

CAVALLI, A., C. DESARIO, I. KUSI, V. MARI, E. LORUSSO, F. CIRONE, I. KUMBRE, M. L. COLAIANNI, D. BUONAVOGLIA, N. DECARO (2014): Detection and genetic characterization of Canine parvovirus and Canine coronavirus strains circulating in district of Tirana in Albania. *J Vet Diagn Invest* 26, 563-566.

CHOU, S. J., H. T. LIN, J. T. WU, W. C. YANG, K. W. CHAN (2013): Genotyping of canine parvovirus type 2 VP2 gene in Southern Taiwan in 2011. *Taiwan Vet J* 39, 81–92.

CVETNIĆ, S. (1980): Parvovirusna infekcija pasa. *Praxis vet.* 28, 163-167.

DAHIYA, S. S., D. D. KULKARNI (2004): Optimization of haemagglutination test for the detection of canine Parvovirus infection. *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.* 25, 119-220.

DECARO, N., C. BUONAVOGLIA (2012): Canine parvovirus—a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol* 155, 1–12.

DECARO, N., C. BUONAVOGLIA, (2012): Canine parvovirus—A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary Microbiology* 155, 1-12.

DECARO, N., C. DESARIO, D. D. ADDIE, V. MARTELLA, M. J. VIEIRA, G. ELIA, A. ZICOLA, C. DAVIS, G. THOMPSON (2007): The study molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg Infect Dis* 13, 1222–1224.

DECARO, N., C. DESARIO, F. AMORISCO, M. LOSURDO, G. ELIA, A. PARISI, G. VENTRELLA, V. MARETLA, C. BUONAVOGLIA (2013): Detection of a canine parvovirus type 2c with a non-coding mutation and its implications for molecular characterisation. *Vet J* 196, 555–557.

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

DEMETER, Z., E. A. PALADE, T. SOOS, A. FARSANG, C. JAKAB, M. RUSVAI (2010): Misleading results of the MboII-based identification of type 2a canine parvovirus strains from Hungary reacting as type 2c strains. *Virus Genes* 41, 37–42.

DOGONYARO, B. B., A. M. BOSMAN, K. P. SIBEKO, E. H. VENTER, M. VAN VUUREN (2013): Genetic analysis of the VP2-encoding gene of canine parvovirus strains from Africa. *Vet Microbiol* 165, 460–465.

FILIPOV, C., C. DESARIO, O. PATOUCHAS, P. EFTIMOV, G. GRUICHEV, V. MANOV, G. FILIPOV, C. BUONAVOGLIA, N. DECARO (2016): A ten-year molecular survey on parvoviruses infecting carnivores in Bulgaria. *Transbound Emerg Dis* 63, 460–464.

GODDARD, A., A. L. LEISEWITZ (2010): Canine parvovirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40, 1041-1053.

GODSALL, S. A., S. R. CLEGG, J. H. STAVISKY, A. D. RADFORD, G. PINCHBECK (2010): Epidemiology of canine parvovirus and coronavirus in dogs presented with severe diarrhoea to PDSA PetAid hospitals. *Vet. Rec.* 167, 196-201.

GORHAM, A. (2018): Importance of Vaccinating for Canine Parvovirus: Best Practices for Prevention. Disertacija. Southern Illinois University Carbondale. Južni Illinois, USA.

HONG, C., N. DECARO, C. DESARIO, P. TANNER, M. C. PARDO, S. SANCHEZ, C. BUONAVOGLIA, J. T. SALIKI (2007): Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J Vet Diagn Invest* 19, 535–539.

HOUSTON, D. M., C. S. RIBBLE, L. L. HEAD (1996): Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *J Am Vet Med Assoc* 208, 542–546.

HORIUCHI, M., Y. YAMAGUCHI, T. GOJOBORI, M. MOCHIZUKI, H. NAGASAWA, Y. TOYODA, N. ISHIGURO, M. SHINAGAWA (1998): Differences in the Evolutionary Pattern of Feline Panleukopenia Virus and Canine Parvovirus. *Virology* 249, 440-452.

HUEFFER, K., C. R. PARRISH (2003): Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr Opin Microbiol* 6, 392-398.

LI, C., J. TANG, Z. CHEN, G. NIU, G. LIU (2019): A divergent canine parvovirus type 2c (CPV-2c) isolate circulating in China. *Infection, Genetics and Evolution* 73, 242-247.

MAJER-DZIEDZIC, B., A. JAKUBCZAK, J. ZIETEK (2011): Phylogenetic analysis of canine parvovirus CPV-2 strains and its variants isolated in Poland. *Pol J Vet Sci* 14, 379–384.

MANOV, G. FILIPOV, C. BUONAVOGLIA, N. DECARO (2016): A ten-year molecular survey on parvoviruses infecting carnivores in Bulgaria. *Transbound Emerg Dis* 63, 460–464.

MARKOVICH, J. E., K. M. STUCKER, A. H. CARR, C. E. HARBISON, J. M. SCARLETT, C. R. PARRISH (2012): Effects of canine parvovirus strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs. *Scientific Reports, JAVMA* 241, 66-72.

MCELLIGOTT, S., P. J. COLLINS, R. D. SLEATOR, V. MARTELLA, N. DECARO, C. BUONAVOGLIA, H. O'SHEA (2011): Detection and genetic characterization of canine parvoviruses and coronaviruses in southern Ireland. *Arch Virol* 156, 495–503.

MEERS, J., M. KYAW-TANNER, Z. BENSINK, R. ZWIJNENBERG (2007): Genetic analysis of canine parvovirus from dogs in Australia. *Aust Vet J* 85, 392–396.

MILJAN, A. (2017): Filogenetska analiza VP2 gena parvovirusa pasa u Republici Hrvatskoj. Diplomski rad. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Zagreb, Republika Hrvatska.

MIRANDA, C., G. THOMPSON (2016): Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *Journal of General Virology* 97, 2043–2057.

MYLONAKIS, M. E., I. KALLI, T. S. RALLIS (2016): Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. *Vet Med (Auckl)* 7, 91-100.

NANDI, S., M. KUMAR (2010): Canine Parvovirus: Current Perspective. *Indian Journal of Virology* 21, 31-44.

NANDI, S., M. KUMAR, T. KUMAR MOHAPATRA, C. RAVISHANKAR, (2013): Emergence of Canine Parvovirus – 2 Variants and its Impact on Vaccination. *World Applied Sciences Journal* 23, 1366-1376.

OGBU, K.I., F. MIRA, G. PURPARI, C. NWOSUH, G. R. LORIA., G. SCHIRO, G. CHIARAMONTE, M. T. TION, S. DI BELLA, G. VENTRIGLIA, N. DECARO, B. M. ANENE, A. GUERCIO (2020): Nearly full length genome characterization of canine parvovirus strains circulating in Nigeria. *Transbound Emerg Dis.* 67, 635-647.

OHNEISER, S. A., S. F. HILLS, N. J. CAVE, D. PASSMORE, M. DUNOWSKA (2015): Canine parvoviruses in New Zealand form a monophyletic group distinct from the viruses circulating in other parts of the world. *Vet Microbiol* 178, 190–200.

OLIVEIRA, P. S. B., J. F. CARGNELUTTI, E. K. MASUDA, R. WEIBLEN, E. F. FLORES (2019): New variants of canine parvovirus in dogs in southern Brazil. *Archives of Virology* 164, 1361-1369.

PEREIRA, G. Q., L. A. GOMES, I. S. SANTOS, A. F. ALFIERI, J. S. WEESE, M. C. COSTA (2017): Fecal microbiota transplantation in puppies with canine parvovirus infection. *J Vet Intern Med* 32, 707-711.

PHROMNOI, S., K. SIRINARUMITR, T. SIRINARUMITR (2010): Sequence analysis of VP2 gene of canine parvovirus isolates in Thailand. *Virus Genes* 41, 23–29.

POLLOCK, R. V., M. J. COYNE (1993): Canine parvovirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 23, 555-568.

REED, A. P., E. V. JONES, T. J. MILLER (1988): Nucleotide Sequence and Genome Organization of Canine Parvovirus. *Journal Of Virology* 62, 266-276.

ROBINSON, W. F., C. R. HUXTABLE, D. A. PASS (1980): Canine parvoviral myocarditis: a morphologic description of the natural disease. *Vet. Pathol.* 17, 282-293.

SANCHEZ, C. BUONAVOGLIA, J. T. SALIKI (2007): Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J Vet Diagn Invest* 19, 535–539.

SHACKELTON, L. A., C. R. PARRISH, U. TRUYEN, E. C. HOLMES (2005): High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 379-384.

SOMA, T., S. TAHARAGUCHI, T. OHINATA, H. ISHII, M. HARA (2013): Analysis of the VP2 protein gene of canine parvovirus strains from affected dogs in Japan. *Res Vet Sci* 94, 368–371.

SPIBEY, N., N. M. GREENWOOD, D. SUTTON, W. S. K. CHALMERS, I. TARPEY (2008): Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet Microbiol.* 128, 48-55.

SUTTON, D., C. VINBERG, A. GUSTAFSSON, J. PEARCE, N. GREENWOOD (2013): Canine parvovirus type 2c identified from an outbreak of severe gastroenteritis in a litter in Sweden. *Acta Vet Scand*, 55-64.

TIMURKAN, M., T. OĞUZOĞLU, (2015): Molecular characterization of canine parvovirus (CPV) infection in dogs in Turkey. *Vet Ital* 51, 39–44.

TRUYEN, U., (2006): Evolution of canine parvovirus—A need for new vaccines?. *Veterinary Microbiology* 117, 9-13.

TRUYEN, U., A. STEINEL, L. BRUCKNER, H. LUTZ, K. MÖSTL (2000): Distribution of antigen types of canine parvovirus in Switzerland, Austria and Germany. *Schweiz Arch Tierheilkd* 142, 115–119.

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.

YI, L., M. TONG, Y. CHENG, W. SONG, S. CHENG (2014): Phylogenetic analysis of canine parvovirus VP2 gene in China. *Transbound Emerg Dis* 63, 262-269.

YOON, S. H., W. JEONG H. J. KIM, D. J. AN (2009): Molecular insights into the phylogeny of canine parvovirus 2 (CPV-2) with emphasis on Korean isolates: a Bayesian approach. *Arch Virol* 154, 1353–1360.

## **8. SAŽETAK**

### **UTJECAJ PODTIPA PSEĆEG PARVOVIRUSA 2 NA KLINIČKU SLIKU, TIJEK I ISHOD LIJEČENJA**

Parvovirusna infekcija pasa prvi puta je opisana krajem prošlog stoljeća, a danas je jedna od najvažnijih zaraznih bolesti u ove vrste. Izrazita sklonost mutacijama dovodi do pojave novih sojeva koji istiskuju starije u populaciji pasa.

Za ovo istraživanje sakupljeno je i obrađeno ukupno 78 uzoraka fecesa i obrisaka rektuma pasa zaprimljenih na Kliniku za zarazne bolesti Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Navedeno uzorkovanje i prikupljanje

podataka o životinjama uključivalo je razdoblje od 1. siječnja 2019. do 1. prosinca 2020. Sve životinje, odnosno psi pokazivali su znakove akutnog gastroenteritisa. Dostupni podaci o nacionalu, anamnezi, kliničkom pregledu te tijeku i ishodu liječenja korišteni su u svrhu statističke obrade. Metodom lančane reakcije polimeraze u uzorcima fecesa ili obriscima rektuma dokazivana je prisutnost psećeg parvovirusa-2.

Nakon određivanja nukleotidnog slijeda umnoženih odsječaka virusnog genoma ustanovljena je prisutnost sva tri poznata podtipa CPV-2 virusa, a najzastupljeniji su podtipovi CPV-2c (53,85%) i CPV-2a (35,9%). Iz dodatnih anamnestičkih podataka bilo je vidljivo da se podtip CPV-2c češće javlja kod pasa iz azila. Isti podtip se javlja češće u štenadi, dok se preostala dva javljaju češće u starijih životinja. Težina kliničke slike, tijek i ishod liječenja ne ovise o podtipu virusa. Cijepljenje daje zaštitu pasa neovisno o podtipu virusa. Psi koji razviju kliničku sliku, koja upućuje na parvovirozu, zahtjevaju agresivan pristup liječenju neovisno o cjepnom statusu.

**KLJUČNE RIJEČI:** parvovirusna infekcija pasa, anamnestički podaci, podtip CPV-2, klinički slika, imunoprofilaksa

## **9. SUMMARY**

### **INFLUENCE OF DOG PARVOVIRUS SUBTYPE 2 ON THE CLINICAL PICTURE, COURSE AND OUTCOME OF TREATMENT**

Parvovirus infection in dogs was first described at the end of the previous century. Due to the high rate of mutations, new subtypes often emerge and become dominant in the dog population. For this research, a total of 78 faeces and rectal swabs of dogs were collected and processed at the Clinic for Infectious Diseases of the Department of Microbiology and Infectious Diseases with the Clinic of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. This sampling and collection of data on animals included the period from 1 January 2019 to 1 December 2020. All animals and dogs showed signs of acute gastroenteritis. Data

on nationality, medical history, clinical examination, and course and outcome of treatment were used for statistical analysis. The presence of canine parvovirus-2 was demonstrated by a polymerase chain reaction in faecal samples or rectal swabs.

After determining the nucleotide sequence of the amplified segments of the viral genome, the presence of all three known subtypes of the CPV-2 virus was established, and the most common subtypes are CPV-2c (53.85%) and CPV-2a (35.9%). Additional anamnestic data showed that the CPV-2c subtype was more common in shelter dogs. The same subtype is more commonly responsible for infections in puppies, while the other two are common in older dogs.

Assessment of the clinical picture, course and outcome of disease showed that there was no significant difference between individual virus subtypes. Immunoprophylaxis gives the same level of protection for all three subtypes. Finally, parvovirus demands aggressive therapy regardless of the vaccinal status.

**KEYWORDS:** canine parvovirus infection, anamnestic data, CPV-2 subtype, clinical picture, immunoprophylaxis

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 7. studenog 1993. godine u Koprivnici, gdje sam i pohađala te završila Osnovnu školu Antun Nemčić Gostovinski. Školovanje sam nastavila u Gimnaziji Fran Galović u Koprivnici, od 2008. do 2012. godine. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2013. godine. Od 2019. do 2020. godine volontirala sam na klinici Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti sa klinikom, gdje sam, zahvaljujući zaposlenicima klinike, nadopunila svoje dotadašnje stečeno znanje te sam stekla potrebne praktične vještine. Mentora za diplomski rad, doc.dr.sc. Vladimira Stevanovića, odabrala sam upravo na toj klinici iz razloga što sam željela steći iskustvo rada u laboratoriju, što mi se radom na ovom istraživanju i ostvarilo. Obaveznu veterinarsku praksu odradila sam u Veterinarskoj ambulanti "More" u Šibeniku, a kroz gotovo cijelo vrijeme studiranja sam volontirala u Veterinarskoj stanici "Nova" u Koprivnici.

