

# Prevalencija i polimorfizam S gena psećeg koronavirusa u Hrvatskoj

---

Jureša, Adela

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:178:565221>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-08-19**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

**Veterinarski fakultet**

**Adela Jureša**

**Prevalencija i polimorfizam S gena psećeg koronavirusa u  
Hrvatskoj**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2018.**

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

Predstojnik: prof. dr. sc. Zoran Milas

Mentor: doc. dr. sc. Vladimir Stevanović

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina
2. doc. dr. sc. Josipa Habuš
3. doc. dr. sc. Vladimir Stevanović
4. doc. dr. sc. Suzana Hađina (zamjena)

## Zahvala

Posebnu zahvalu dugujem mentoru doc. dr. sc. Vladimiru Stevanoviću na prilici da kroz diplomski rad steknem nova znanja iz područja molekularne dijagnostike koja mi inače ne bi bila dostupna, te da ista imam prilike samostalno primjenjivati u radu virusološkog laboratorija.

Zahvaljujem i svim djelatnicima Virusološki laboratorij Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti na pomoći koju su mi pružili u obliku savjeta i podrške, a posebno Kristini Kovač, dr.sc. Maji Maurić zahvaljujem na pomoći sa statističkom obradom podataka.

Na kraju zahvaljujem svojoj obitelji na podršci koju su mi pružili tijekom studija.

## Popis kratica

ANOVA = analiza varijance

APN = receptor za aminopeptidazu N

CCoV = (*engl. Canine coronavirus*) pseći koronavirus

DNK = deoksiribonukleinska kiselina

DNK-aza = deoksiribonukleaza

EDTA = etilendiamintetraoctena kiselina

FCoV = (*engl. Feline coronavirs*) mačji koronavirus

FP = fuzijski peptid

HCoV = (*engl. Human coronavirus*) ljudski koronavirus virus

HE = hemaglutinin-esteraza

HIV-1 = (*engl. Human Immunodeficiency Virus*) virus humane imunodeficijencije

IFN = mačji interferon

Ig = *imunoglobulin*

kDa = kilodalton

M = (*engl. Membrane*) strukturni membranski protein

MERS = (*engl. Middle East respiratory syndrome*) Bliskoistočni respiratorni sindrom

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

N = (*engl. Nucleocapsid*) strukturni protein nukleokapside

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

NSP = (*engl. nonstructural proteins*) nestrukturani protein

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

pb = parovi baza

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

PEDV = (*engl. Porcine epidemic diarrhea virus*) virus epizootske dijareje svinja

qRT-PCR = (*engl. quantitative real time polymerase chain reaction*) kvantitativna lančana reakcija polimerazom

RBD = (*engl. receptor-binding domain*) domena za vezivanje receptora

RNK-aza = ribonukleaza

RT-PCR = (*engl. Reverse transcription polymerase chain reaction*) lančana reakcija polimerazom s reverznom transkriptazom

S = (*engl. Spike*) S strukturani protein

SARS = (*engl. Severe acute respiratory syndrome*) Teški akutni respiratorni sindrom

TAE = tris acetat etilendiamintetraoctena kiselina

TGEV = (*engl. Transmissible gastroenteritis coronavirus*) virus transmisivnog gastroenteritisa svinja

TRSs = (*engl. transcriptional regulatory sequences*) sekvence regulatori transkripcije

UTR = (*engl. untranslated region,*) netranslatirana regija

RH = Republika Hrvatska

## Popis tablica i slika

### Tablice:

Tablica 1. Početnice korištene za umnažanje odsječka genoma koronavirusa RT-PCR metodu

Tablica 2. Početnice korištene za umnažanje odsječka genoma koronavirusa za ugniježdenu PCR metodu

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

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za izvođenje ugniježdene PCR metode

Tablica 5. Oznake i pristupni brojevi nukleotidnih sljedovi sojeva koronavirusa korišteni za filogenetsku analizu.

### Slike:

Slika 1. Shematski prikaz građe koronavirusa.

Slika 2. Shematski prikaz fuzije CCoV posredovana S proteinom.

Slika3. Prikaz S proteina, od N do C kraja.

Slika 4. Elektroforeza u gelu - dokaz genoma uzročnika u pretraživanom uzorku, prikazani proizvodi odgovaraju odsječku genoma veličine 1083 bp prvog dijela reakcije

Slika 5. Elektroforeza u gelu - dokaz genoma uzročnika u pretraživanom uzorku, prikazani proizvodi odgovaraju odsječku genoma veličine 514 bp drugog dijela reakcije

Slika 6. Filogenetsko stablo CCoV sojeva

Slika 7. Filogenetsko stablo CCoV sojeva zastupljenih u RH

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. ETIOLOGIJA .....	2
2.1. Građa virusne čestice .....	2
2.1.1. S protein .....	3
2.1.2. E protein .....	5
2.1.3. M protein .....	5
2.1.4. N protein .....	6
2.1.5. Nestrukturni protein koronavirusa .....	6
2.2. Taksonomija koronavirusa .....	7
2.3. Epizotologija .....	8
2.4. Tenacitet virusa .....	8
2.5. Patogeneza .....	8
2.6. Klinička slika .....	9
2.7. Patoanatomski i patohistološki nalaz .....	10
2.8. Dijagnostika .....	11
2.9. Liječenje .....	12
2.10. Imunoprofilaksa .....	12
2.11. Javno zdravstvo .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	14
3.1. Uzorkovanje .....	14
3.2. Molekularna metoda dokaza uzročnika .....	14
3.2.1. Priprema uzoraka .....	14
3.2.2. Izdvajanje virusne RNK .....	14
3.2.3. Postupak izvođenja pretrage lančanom reakcijom polimeraze (PCR) .....	15
3.2.4. Elektroforeza u gelu .....	18
3.2.4.1. Priprema TAE (Tris-acetate-EDTA) pufera .....	20
3.2.4.2. Pripremanje gela .....	21
3.2.4.3. Nanošenje uzoraka na gel i postupak elektroforeze .....	21



3.3. Određivanje nukleotidnog slijeda proizvoda PCR-a .....	22
3.4. Statistička obrada podataka .....	23
4. REZULTATI.....	24
5. RASPRAVA.....	28
6. ZAKLJUČCI.....	32
7. LITERATURA .....	33
8. SAŽETAK .....	39
9. SUMMARY.....	41
10. ŽIVOTOPIS .....	43

# 1. UVOD

Prvom pojavom psećeg enteričkog koronavirusa 1971. godine, koji u obliku zatvorene epizootije pojavio u policijskih pasa u Njemačkoj (PRATELLI, 2006.), koronavirusima se nije pridavala značajnija pažnja, unatoč činjenici da je nakon prve izolacije virus nađen u gotovo svakom dijelu svijeta. To se može pripisati jedino njegovom blagom kliničkom očitovanju (GREEN i DECARO, 2012.). Nastupom dviju velikih epidemija, SARS-a i MERS-a, koronavirusi su potvrdili svoju važnost za veterinarsku, a posljedično i humanu medicinu, zbog spoznaje da većina ako ne i svi ljudski koronavirusi potječu od koronavirusa šišmiša, koji su direktnim ili indirektnim putem prešli na čovjeka (HULSWIT i sur., 2016.). Koronavirusi nisu samo ostavili dojam u humanoj medicini, već su 2005. godine u Italiji uzrokovali oboljenja pasa očitovana žestokim znacima akutnog gastroenteritisa, kakva bi se pridijelila psećem parvovirusu 2 (PINTO i sur., 2014.). Nakon toga su istraživanjima potvrđeni novi, vrlo virulentni sojevi koji se svrstavaju u CCoV IIa sojeve, te su prozvani pantropni sojevi koronavirusa (DECARO i sur., 2012.), čime je samo potvrđena potreba za daljnjim istraživanjima u smjeru epidemiološke važnosti životinjskih koronavirusa (PRATELLI, 2006). Nagli nastup i širenje takvog pantropnog soja iz Italije, prešlo je na cijeli europski kontinent, počevši s Grčkom, zatim Francuskom, Belgijom te ostalim zemljama, a nakon toga nađen je i na azijskom kontinentu (DECARO i sur., 2008.; DECARO i sur., 2012.; NTAFIS i sur., 2011.). Cilj ovog rada je ustanoviti pojavnost kao i raznolikost sojeva psećeg koronavirusa na području Republike Hrvatske. Kako je danas opće poznato da je S gen jedan od osnovnih nosioca vrsne specifičnosti, ali i patogenosti pojedinih sojeva koronavirusa upravo on je korišten za filogenetsku analizu dobivenih nukleotidnih sljedova. Poseban značaj ovaj rad ima i zbog opisa epizootiologije i kliničkog značaja infekcije psećim koronavirusima uzimajući u obzir epizootiološke značajke na području Republike Hrvatske.

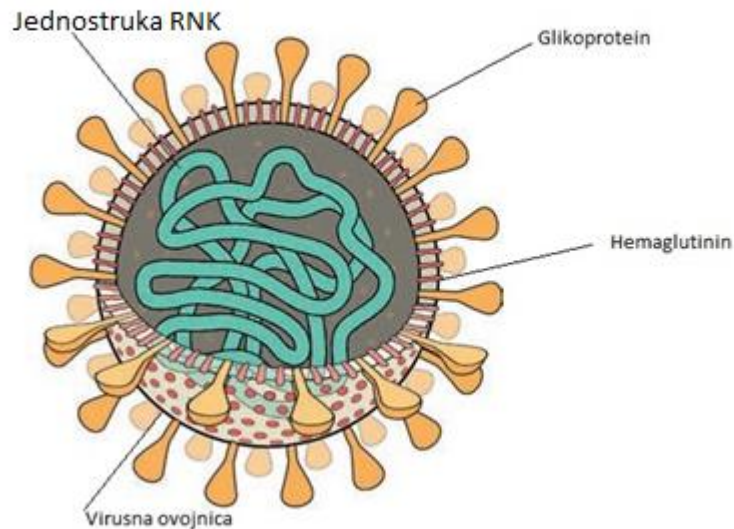
## 2. ETIOLOGIJA

### 2.1. Građa virusne čestice

Koronavirusi, najveći su virusi koji sadrže ribonukleinsku kiselinu, kuglastog su oblika, promjera 120-140 nm, s genomom veličine 27 do 32 kbp (JARVIS i KIRKEGAARD, 1991.). Koronavirusi imaju prepoznatljive izdanke duljine 20 nm, koji su izgrađeni od strukturnog S proteina (*engl. Spike*), N strukturni protein (*engl. Nucleocapsid*), vezan je na genomsku RNK te zajedno tvore spiralnu nukleokapsidu, koja je okružena ikozaedarnom kapsidom, koju čini virusni strukturni protein M (*engl. Membrane*). Neki korona virusi još posjeduju kraće izdanke, duljine oko 5nm, koji su zapravo protein hemaglutinin-esteraza (HE), te su odlika nekih betakoronavirusa (BROWNLIE, 2016.).

Genom svih koronavirusa, osim gena osnovnih strukturnih proteina, sadrži i 7 do 10 otvorenih okvira čitanja (*engl. Open reading frame, ORF*) koji kodiraju odgovarajuće nestrukturne proteine (LAI i HOLMES, 2001.). Razmještaj i broj nestrukturnih proteina, svojstvo je određenih virusa unutar roda (ENJUANES, 2005.). Geni koji kodiraju nestrukturne proteine (*engl. nonstructural proteins, nsps*) zauzimaju dvije trećine genoma, oko 20 kbp, za razliku od strukturnih, koji čine 10 kbp virusnog genoma (ZHAO i sur., 2012.). Osim kodirajućih dijelova genoma, genom koronavirusa, sadrži i nekodirajuće odnosno regulatorne regije. Krećući se od 5' kraja genom sadrži netranslatiranu regiju (*engl. untranslated region, UTR*), koja sadrži mnogobrojne strukturne ukosnice potrebne za RNK replikaciju i transkripciju i na početku gena za svaki strukturni protein nalaze se regulatori transkripcije (*engl. transcriptional regulatory sequences, TRSs*), koje su potrebne za ekspresiju svakog od ovih gena (ZHAO i sur., 2012.).

U nastavku genoma slijede virusne replikaze, zatim strukturni protein S (*engl. Spike*), te E (*engl. Envelope*), M (*engl. Membrane*) i N (*engl. Nucleocapsid*) strukturni protein, te se na kraju genoma nalazi 3' netranslatirana regija (*engl. untranslated region, UTR*) (ZHAO i sur., 2012.).



**Slika 1.** Shematski prikaz građe koronavirusa. Prilagođeno iz GREEN i DECARO, 2012.

### 2.1.1. S protein

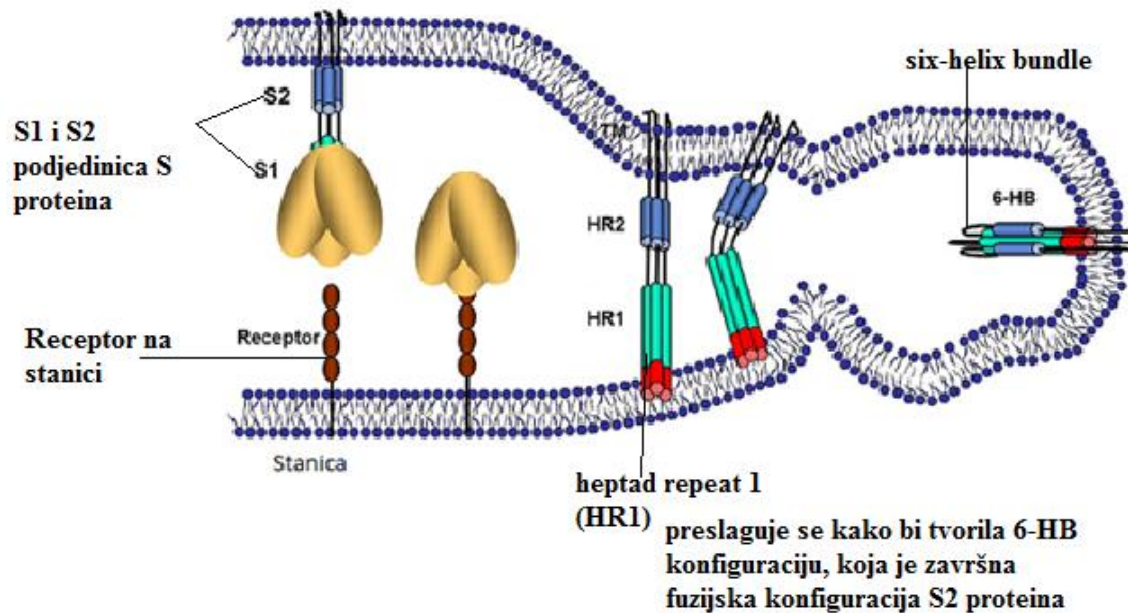
Strukturni S protein, fuzijski je protein klase I (BOSCH i sur., 2003.), te je jedini virusni membranski protein odgovoran za ulazak virusa u stanicu. Veže se za receptor na ciljnoj stanici te posreduje fuziji virusa i ciljne stanice (CAVANAGH, 1995.).

Veličina samog proteina varira i kreće se od 1100 do 1600 aminokiselina s prosječnom molekularnom masom od 220 kDa. Trimeri S proteina tvore izdanke nalik na latice, koji se nalaze na membranskoj površini virusa, a dugi su od 18 do 23 nm (HULSWIT i sur., 2016.).

S protein dijeli se na tri strukturne domene: velika vanjska domena, koja se dalje može podijeliti na dvije subdomene i to S1 i S2 subdomenu, transmembranska domena, te kratka karboksil-terminalna domena (CHANG i sur., 2006.). Zbog strukturne podjele na domene, S protein sadrži domenu za vezivanje receptora (*engl. receptor-binding domain, RBD*) i domenu koja je uključena u fuziju, čineći S protein ključnim proteinom koronavirusa za ulazak u ciljnu stanicu te određivanje tropizma. Mnogi koronavirusi koriste peptidaze kao receptor ciljne stanice, dok većina alfakoronavirusa koriste kao receptor aminopeptidazu N (APN).

Globularna S1 subdomena sudjeluje u prepoznavanju receptora ciljne stanice (HULSWIT i sur., 2016.), te je vrlo varijabilna i sklona mutacijama koje su bile uzrok promjena u antigenosti i patogenosti, za razliku od S2 subdomene, koja je izrazito konzervativna (CHANG i sur., 2006.), te je domena uključena u fuziju (YOO i sur., 1991.).

Nakon vezanja za receptor slijedi fuzija virusne i stanične membrane (BELOUZARD i sur., 2009.). Proces fuzije dovodi do konformacijskih promjena u S proteinu, izlažući hidrofobnu domenu, koja uključuje fuzijski peptid (FP) (HEALD-SARGENT i GALLAGHER, 2012.), regiju veličine 15 do 25 aminokiselina koje imaju glavnu ulogu u interakciji virusa s membranom (MARTIN i sur., 2000.). Ove konformacijske promjene mogu započeti vezenjem virusa za receptor, ali ponekad su potrebni i dodatni okidači procesa, kao što su snižavanje pH ili proteolitički enzimi (BELOUZARD i sur., 2012.). Rascjep S protein, koji se odvija na granici S1 i S2 subdomene, najčešće je uzrokovan lizosomalnim proteazama, iz razloga što su one sveprisutne i obilno se nalaze u velikom broju stanica. Dok dostupnost ostalih proteaza potrebnih nekim sojevima koronavirusa uvjetuje i tropizam tih sojeva (LI, 2006.). Nakon odvajanja receptor vezivne domene (RBD) te domene koja je uključena u fuziju (BELOUZARD i sur., 2009.) fuzijski peptid ubacuje se u membranu ciljne stanice, dok je transmembranski odsječak unutar virusne membrane, nakon čega se regija između počinje odmotavati i počinje preslagivanje u postfuzijski snop sastavljen od šest spirala (*engl. six-helix bundle, 6-HB*) konformaciju, što dovodi do približavanja nasuprotnih membrana (HEALD-SARGENT i GALLAGHER, 2012.). Osim što je primarna odrednica tropizma prema ciljnoj stanici i patogeneze, S protein je i glavna meta neutralizirajućih protutijela (HOFMANN i sur., 2004.).



**Slika 2.** Shematski prikaz fuzije CCoV posredovana S proteinom. Prilagođeno iz HEALD-SARGENT i GALLAGHER, 2012

### 2.1.2. E protein

E protein, mali je transmembranski protein (DEDIEGO i sur., 2007.), mase od 8 do 12 kDa, koji je slabo zastupljen u virusnoj čestici (GODET i sur., 1992.). Posjeduje N terminalnu ektodomenu i C terminalnu endodomenu, te ima aktivnost ionskog kanala (DEDIEGO i sur., 2007.).

### 2.1.3. M protein

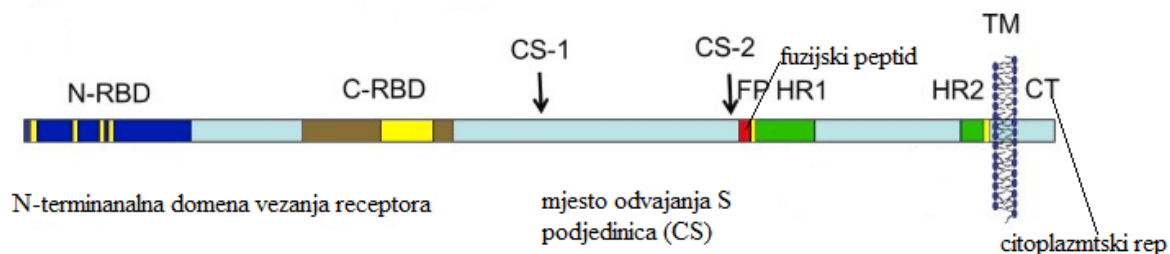
M protein, strukturni je protein koji se najobilnije nalazi u virusnoj čestici, to je mali protein, mase 25 do 30 kDa, a čine ga tri transmembranske domene (ARMSTRONG i sur., 1984.), te se smatra da virusnoj čestici daje oblik.

#### 2.1.4. N protein

Koronavirusni nukleoproteini su fosfoproteini, te su kodirani na 3' kraju genoma (NEUMAN i BUCHMEIER, 2016.), te se smatra da fosforilacija proteina uvjetuje strukturalne promjene te posljedično te promjene dovode do pojačanog afiniteta za virusnu nasuprot nevirusne RNK. N protein, zatim veže virusni genom, u konformaciju koja se može izgledom opisati kao perle u nizu (STOHLMAN i sur., 1988.).

#### 2.1.5. Nestrukturni protein koronavirusa

Primarna funkcija nestrukturnih proteina (*engl. nonstructural proteins, nsps*) je regulacija sinteze i obrade koronavirusnog RNK, tu se ubrajaju nsp7 do nsp16, koji su proizvodi dva replikazna poliproteina translaterana iz genoma koronavirusa. Koronavirusne replikaze uključuju RNK polimerazu (nsp12), zatim helikazu (nsp13), ali i neke rijetke kao što su (nsp14, nsp16) (SNIJDER i sur., 2016.).



**Slika3.** Prikaz S proteina, od N do C kraja. Prilagođeno iz HEALD-SARGENT i GALLAGHER, 2012.

## 2.2. Taksonomija koronavirusa

Izrazita sposobnost izmjene koronavirusa uzrokovana čestim mutacijama, zbog pogriješaka tijekom transkripcije, uzrokovala je veliku raznolikost i genetsku raznovrsnost, te pojavu novih sojeva virusa (JACKWOOD i sur., 2012.).

Koronavirusi pripadaju porodici *Coronaviridae*, podporodici *Coronavirinae*, koja je podijeljena u četiri roda: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* i *Deltacoronavirus* (HULSWIT i sur., 2016.). U rod *Alphacoronavirus*, osim psećeg koronavirusa (CCoVs), spadaju i mačji koronavirusi (FCoVs), virus transmisivnog gastroenteritisa svinja (TGEV) te respiratorni koronavirus svinja, humani koronavirus 229E (HCoV-229E) i humani koronavirus NL63 (HCoV-NL63), virus epizootske virusne dijareje svinja (PEDV) (DECARO i BUONAVOGLIA, 2008.)

Unutar podporodice *Coronavirinae*, *alfakoronavirusi* i *betakoronavirusi* inficiraju sisavce, dok *gamakoronavirusi* uzrokuju oboljenja uglavnom ptica (JACKWOOD i sur., 2012.). Iako se čini da su neki virusi ograničeni na uski spektar domaćina, ako ne i na samo jednog, genomske sekvence i filogenetske analize pokazuju kako je koronavirus često prelazio međuvrtnu barijeru (CHAN i sur., 2013.), odnosno, da većina ako ne i svi humani koronavirusi potječu od šišmiša, koji su direktnim ili indirektnim putem prešli na čovjeka (HULSWIT i sur., 2016.).

Pseći koronavirus, dijeli se u dvije različite skupine, CCoV I te CCoV II skupinu ((DECARO i BUONAVOGLIA, 2008.), iako srodne, posjeduju znatne razlike u S proteinu (PRATELLI i sur., 2003.). Kao i pseći, mačji koronavirus također se dijeli u dva serotipa, FCoV I i FCoV II, na osnovu antigenskih razlika u S protein (LICITRA i sur., 2014). Smatralo se da su se CCoV I te FCoV I razvili iz istog virusa, te da su tipovi II oba virusa, proizišli putem mnogobrojnih rekombinacija originalnih virusa (LORUSSO I sur., 2008.). Klasifikacija psećeg korona virusa II na podtipove IIa i IIb, zasnovana je na promjenama u sekvenci prvih 300 bp unutar S proteina, iako ta klasifikacija nije službeno prihvaćena, unutar taksonomije virusa, ipak je zastupljena u literaturi (LICITRA i sur., 2014.).



### **2.3. Epizotologija**

Enterička koronavirusna infekcija, uobičajena je u pasa širom svijeta, no prijavljeni su slučajevi koronavirusnih enteritisa u divljih pasa. Slični ili isti alfakoronavirusi uzrokuju infekcije lisica (*lat. Vulpes*), mačaka (*lat. Felis catus*) te kunopasa (*lat. Nyctereutes procyonoides*) (BROWNLIE, 2016.).

Prirodni put širenja virusa je feko oralni put (APPEL, 1987.), no ipak još nije jasno je li to jedini put prijenosa, odnosno postoji li mogućnost prijenosa virusa aerosolom (LICITRA i sur., 2014.).

### **2.4. Tenacitet virusa**

Koronavirusne čestice, relativno su otporne u okolini, naročito u usporedbi s HIV-1, tako SARS koronavirusne čestice ostaju infektivne i do 4 dana u nepovoljnim uvjetima (SOBSEY i MESCHKE, 2003.), no za razliku od SARS koronavirusa, MERS koronavirusna čestica, manje je otporna, tako da u vanjskim nepovoljnim uvjetima preživljava znatno kraće, odnosno vrijeme preživljavanja u takvim uvjetima joj je najviše 2 do 3 dana, no ipak se smatra da je, uspoređujući s pandemijskim influenza A virusom u istim uvjetima, znatno otpornija (VAN DOREMALEN i sur., 2013.).

### **2.5. Patogeneza**

Nakon ingestije, koronavirus ulaz unutar citoplazme zrelih epitelnih stanica intestinalnih resica (LICITRA i sur., 2014.), nakon čega dolazi u M stanice Peyerovih ploča, te se zbog odlaska u limfoidno tkivo smatra da virus tamo može perzistirati ili da postaje latentan (GREEN i DECARO, 2012.). Virus se zatim obilno umnaža unutar epitelnih stanica, te se akumulira unutra citoplazmatskih vakuola (GREEN i DECARO, 2012.). Inficirani enterociti podvrgnuti su degeneraciji, koja se odlikuje skraćivanjem, distorzijom te gubitkom mikrovila četkaste prevlake, dovodeći do ljuštenja nekrotičnih stanica u lumen crijeva (LICITRA i sur., 2014.). Slijed ovih zbivanja dovodi do pojačanog gubitka inficiranih enterocita, te se brzo zamjenjuju nezrelim enterocitima Lieberkühnovih kripti (GREEN i DECARO, 2012.), koje zbog pojačanog gubitka stanica pojačavaju mitotsku aktivnost, te dovode do izlaska velikog broja nezrelih enterocita (LICITRA i sur., 2014.). Kripte nisu pogođene, odnosno virus se u njima ne umnaža, ali dovodi, zbog njihovog pojačanog rada, do njihove hiperplazije. Cilindrični enterociti zamjenjuju se

pločastim epitelom, dolazi do atrofije i fuzije vila, te lamina propria postaje preplavljena mononuklearnim stanicama (GREEN i DECARO, 2012.). Sve ove promjene posljedično dovode do promjena u morfologiji tankog crijeva, te je učinak smanjena apsorptivna i probavna funkcija crijeva, što dovodi do kliničkog očitovanja dijarejom i dehidracijom u oboljelih pasa (LICITRA i sur., 2014.). Iako patogeneza pantropne koronavirusne infekcije još uvijek nije do kraja objašnjena, zna se da virus ima mogućnost ulaska preko nosne sluznice, te dolazi do viremije koja omogućava sistemsko širenje virusa. Virus se zatim najčešće pronalazi u limfoidnom tkivu, kao što su timus, slezena te mezenterijalni limfni čvorovi (DECARO i sur., 2008.; DECARO i BUONAVOGLIA, 2008.). Širenje virusa u limfoidna tkiva dovodi do limfopenije (DECARO i sur., 2007.; DECARO i sur., 2008.), te su u akutnoj fazi upale prolazno sniženi limfociti uključivali: CD4+, CD8+ T limfocite kao i B limfocite (MARINARO i sur., 2010.).

## **2.6. Klinička slika**

Pseći koronavirus, pokazuje tropizam za enterocite te je njegovo mjesto djelovanja probavni sustav, prilikom infekcije u pasa, naročito mladih, najčešće uzrokuje blagi gastroenteritis (PRATELLI, 2006.), te se nalazi u koinfekciji s adenovirusom tip I (PRATELLI i sur., 2002.), ili psećim parvovirusom 2 (CARMICHAEL, 1999.). Unatoč tome, određeni sojevi, karakterizirani sistemskim širenjem virusa, dovode do smrtnih posljedica (DECARO i sur., 2008.), takvi sojevi, smatra se, nastali su zbog promjena u sekvenci strukturnog S proteina (BALLESTEROS i sur., 1997.), te su doveli do pojave sojeva koronavirusa različite virulencije. Pojavom i širenjem virulentnijeg soja pantropnog koronavirusa IIa (DECARO i sur., 2012.), pridaje se više važnosti otkrivanju, identifikaciji te monitoringu koronavirusa koji pokazuju žestoka očitovanja bolesti, kakva bi se pridijelila psećem parvovirusu 2 (PINTO i sur., 2014.).

Inkubacijski period je kratak, te iznosi svega 1 do 3 dana, nakon čega dolazi do dijareje i povraćanja, koje nakon nekoliko dana prestaje (APPEL, 1987.).

Klinički znakovi variraju ne samo o soju virusa kojim je životinja inficirana, već na jačinu kliničkih znakova utječe i dob životinje prilikom infekcije, količini patogena kojem je izložena, te ako se radi o mladim životinjama o količini maternalnih protutijela (LICITRA i sur., 2014.). Tako su klinički znakovi jače izraženi u mladim životinjama, a naročito ukoliko se radi o koinfekciji s

drugim patogenima (DECARO i sur., 2004.) Proizvodnja lokalnih protutijela, klase IgA, dovodi do sprječavanja širenja virusa unutar probavnog sustava (KEENAN i sur., 1976.). Dok se virus u fecesu može izlučivati i do 180 dana nakon infekcije (PRATELLI i sur., 2002.). Infekcija pantropnim koronavirusom dovodi do multisistemske bolesti, očituje se raznim kliničkim znakovima od kojih je većina slična onima kod parvovirusne infekcije, i to povišena tjelesna temperatura, hemoragični gastroenteritis, neurološki znakovi i limfopenija, dok je leukopenija najpostojaniji klinički znak pantropne koronavirus Ila infekcije (DECARO i sur., 2008.; DECARO i sur., 2012.; MARINARO i sur., 2010.).

## **2.7. Patoanatomski i patohistološki nalaz**

Blage infekcije psećim koronavirusom makroskopski su bez osobitosti, kakve se najčešće javljaju kod koronavirusnih infekcija, iako ponekad žestoka očitovanja bolesti dovode do patoanatomski vidljivih promjena, koje se očituju kao dilatirani zavoji crijeva, ispunjeni vodenim, zeleno-žutim sadržajem, uz povećanje mezenterijalnih limfnih čvorova (GREEN i DECARO, 2012.). Makroskopske lezije prisutne prilikom infekcije pantropnim koronavirusom uključuju umjereni do jaki enteritis, koji je najčešće ograničen na tanka crijeva, te je stijenka takvih crijeva crveno obojana, suha, naborana te posuta petehijama, dok je njihov sadržaj oskudan, sluzav i žut (ZICOLA i sur., 2012.).

Nalaz također uključuje znatne promjene parenhimatoznih organa te obilan nalaz serosangvinozne tekućine u trbušnoj šupljini. Vidljiva je kongestija jetre, s hemoragijama po površini, dok je slezena povećana sa subkapsularnim krvarenjima (BUONAVOGLIA i sur., 2006.). Regionalni limfni čvorovi povećani su, jedan do dva puta, na nekima se nalaze petehije dok je na drugima nalaz opsežnih krvarenja (ZICOLA i sur., 2012.). Patoanatomski još je vidljiva kongestija pluća, dok promjene ostalih organa uključuju multifokalne hemoragijske infarkte kore bubrega te ponekad čir želuca (BUONAVOGLIA i sur., 2006.). Standardnim hematoksilin-eozin bojenjem presjeka zahvaćenog dijela crijeva vidljiva je umjerena difuzna infiltracija lamine proprie mononukleranim upalnim stanicama (ZICOLA i sur., 2012.), fuzija intestinalnih vila te žarišna proširenja kripte (PINTO i sur., 2004.), s nalazom degeneriranih i nekrotiziranih stanica, naročito na bazi (ZICOLA i sur., 2012.). Javlja se i difuzna limfocitna deplecija mezenterijalnih limfnih čvorova i slezene. Dok promjene na plućima očituju izrazitu leukocitnu infiltraciju

alveolarnih stijenka, kongestiju kapilara, fokalnu hiperplaziju bronhalnog i bronhiolarnog epitela, nalaz rijetkih makrofaga, eritrocita i deskvamiranih epitelnih stanica unutar alveola (DECARO i sur., 2012.).

## 2.8. Dijagnostika

Donošenje dijagnoze psećeg koronavirusa moguće je upotrebom više dijagnostičkih metoda. Elektronskom mikroskopijom, kojom se pretražuje uzorak svježeg fecesa na prisustvo virusa, potrebno je  $1 \times 10^6$  virusnih čestica u uzorku fecesa kako bi se one sa sigurnošću mogle identificirati, prema tome lažno negativni nalazi su mogući (GREEN i DECARO, 2012.). Izolacija virusa na kulturi stanica nije primijenjiva za pretraživanje uzoraka na CCoV-I, jer one nemaju sposobnost umnažanja na kulturi stanica (GREEN i DECARO, 2012.). Iako su se ranija istraživanja oslanjala na otkrivanje koronavirusnih infekcija elektronskom mikroskopijom, izolacijom virusa na staničnim kulturama, novija istraživanja koriste mnogo osjetljivije i specifičnije metode, koje uključuju RT-PCR (lančana reakcija polimerazom s reverznom transkriptazom), ugniježđeni RT-PCR te qRT-PCR (kvantitativna lančana reakcija polimerazom s reverznom transkriptazom) i in situ hibridizaciju (GAMBLE i sur., 1997., GUT i sur., 1999.). Iako su takve visoko osjetljive metode razvijene za otkrivanje koronavirusa (GREEN i DECARO, 2012.), zbog visoke stope mutacija koronavirusa (WOO i sur., 2009.), ipak postoji mogućnost dobivanja lažno negativnih rezultata. To je vidljivo kod paralelnog korištenja RT-PCR i qRT-PCR metode, prilikom čega su neki uzorci bili pozitivni samo jednom od metoda, što se objašnjava ili većom osjetljivošću qRT-PCR metode te ukoliko su uzorci bili pozitivni samo RT-PCR metodom, da svaka od metoda umnaža različite dijelove genoma. Sve to dovodi do zaključka kako bi bilo pouzdano koristiti obje metode za dobivanje rezultata, jer kako je dokazano, niti jedna od metoda ne predstavlja zlatni standard u identifikaciji psećeg koronavirusa (NTAFIS i sur., 2010.). Virus neutralizacijski testovi i imunoenzimni testovi razvijeni su za detekciju protutijela za koronavirus (GREEN i DECARO, 2012.), ali te serološke analize ograničene su na dokaz izlaganja koronavirusima (LICITRA i sur., 2014.), a serumski IgG titar nije proporcionalan zaštiti, kao što je to intestinalni IgA titar (GREEN i DECARO, 2012.). Trenutno ne postoje dijagnostički testovi koji bi bili u mogućnosti razlikovati enterički i

pantropni soj psećeg koronavirusa, stoga psi, koji se smatraju pozitivni na pantropni CCoV, posjeduju nalaz CCoV-IIa soja izvan probavnog sustava (DECARO i sur., 2013.)

## 2.9. Liječenje

Iako je većina kliničkih znakova blaga a infekcija enteričkim sojevima samolimitirajuća, u nekih pasa naročito štenaca, može doći do jake dehidracije te gubitka elektrolita, acidoze i šoka povezane s proljevom. Kako ne postoji etiološka terapija kojom bi se tretirala infekcija psećim koronavirusom, liječenje se temelji na potpornoj terapiji (LICITRA i sur., 2014.), nadoknadi tekućina i elektrolita, koju je preporučljivo primjenjivati sve dok se proljev ili povraćanje ne zaustavi (GREEN i DECARO, 2012.). Iako je rijetko potrebno, mogu se primjeniti antimikrobni pripravci ukoliko postoji sumnja ili mogućnost za razvoj sekundarne bakterijske infekcije (LICITRA i sur., 2014.). Ukoliko se radi o infekciji virulentnijim sojevima, odnosno pantropnim sojevima, terapija koja se primjenjuje odgovara onoj za tretiranje parvovirusne infekcije, stoga uz potpurnu terapiju postoji mogućnost primjene antivirusnih lijekova. Uz izuzetak mačjeg interferona  $\omega$  (IFN)- $\omega$  i nekih imunomodulatora ne postoje licencirani veterinarski antivirusni lijekovi za primjenu pa se za terapiju koriste i humani preparati. Antiemetici su korisni u sprječavanju dehidracije i gubitka elektrolita te omogućuju enteralnu prehranu pacijenata (GREEN i DECARO, 2012.).

## 2.10. Imunoprofilaksa

Kontrola bolesti uzrokovane psećim koronavirusom znatno ovisi o cijepljenju kuja, kojom se smanjuje izlučivanje virusa ali dovodi i do povećanja koncentracije kolostrumnih imunoglobulina (EVERMANN i KENNEDY, 2011.). Kako je placenta pasa i mačaka endoteliokorijalna, što znači da se tek mali postotak 2-18% ukupnih maternalnih protutijela prenosi preko placent (PARRISH, 2016.), oni većinu protutijela dobivaju preko kolostruma (GREEN i DECARO, 2012.). Protutijela klase IgA također se nalazi u kolostrumu, a njegova uloga je u obrani organizma probavnog i respiratornog trakta, prijanjanjem na patogene u lumenu crijeva te njihovu neutralizaciju (GREEN i DECARO, 2012.). Oralna vakcinacija, koja bi stimulirala proizvodnju sekretornog IgA potrebna je za kontrolu bolesti povezanih sa psećim koronavirusom

(EVERMANN i KENNEDY, 2011.). Prve inaktivirane vakcine za pseći koronavirus uvedene su 1980-ih godina. Iako su štitele pse od kliničkih očitovanja bolesti, nisu štitele od infekcija, te je učinak bio upitan zbog ionako blage kliničke slike bolesti i ograničene zaštite (EDWARDS i sur., 1985.). Tako je 1983. uvedena polivalentna vakcina koja je sadržavala uz pseći parvovirus-2 i virus štenećaka i atenuirani CCoV. Ta vakcina također je povučena i to dva mjeseca nakon puštanja u promet zbog reakcija od strane živčanog sustava u nešto više od 900 pasa i uginuća u oko 300 (MARTIN, 1985., WILSON i sur., 1986.). Danas na tržištu postoji velik broj inaktiviranih i modificiranih živih vakcina, iako su one sigurne za upotrebu, njihova primjena ne pruža potpunu zaštitu jer one smanjuju ali ne sprječavaju replikaciju i izlučivanje CCoV u probavnom sustavu (CARMICHAEL, 1999.). Pojavom novih sojeva, najznačajnije pantropskih, javlja se zabrinutost o mogućnostima trenutno dostupnih vakcina da spriječe ili ublaže kliničke manifestacije infekcija. Iako nisu do sada obavljena nikakva istraživanja, prema podacima o prirodnim infekcijama koronavirusa, jasno je da preboljenje ne sprječava niti ne štiti od infekcije pantropskim koronavirusom (GREEN i DECARO, 2012.).

## **2.11. Javno zdravstvo**

Iako se smatra da pseći koronavirus nema sposobnost za infekciju u ljudi (GREEN i DECARO, 2012.), česte mutacije virusa kao i spoznaja da su nedavne velike epidemije uzrokovane koronavirusima koji su prešli međuvrsku barijeru (HULSWIT i sur., 2016.), mogućnost prelaska psećeg koronavirusa na ljude ne može se isključiti (GREEN i DECARO, 2012.). Tako su nedavne epidemije SARS-a (*eng. Severe acute respiratory syndrome*) i MERS-a (*eng. Middle East respiratory syndrome*) dovele do spoznaje o važnosti životinjskih koronavirusa, kako u humanoj tako i u veterinarskoj medicini, koje su okosnica u razumijevanju evolucije ljudskih koronavirusa (BUONAVOGLIA i sur., 2006.).

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Uzorkovanje**

Ovim istraživanjem je obuhvaćen 391 pasa zaprimljenih na Kliniku za zarazne bolesti Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, od kojih su uzorkovani obrisci rektuma. Uzorci su sakupljeni od pasa koji su pokazivali kliničke znakove akutnog gastroenteritisa, u razdoblju od 1. siječnja 2015. do 1. kolovoza 2018. godine. Za statističku obradu korišteni su dostupni podaci iz nacionala, anamneze te kliničkog pregleda i tijeka liječenja.

### **3.2. Molekularna metoda dokaza uzročnika**

Za određivanje prisutnosti koronavirusa iz obrisaka rektuma, iz kojih je prethodno izolirana RNK, korištena je molekularna metoda lančane reakcije polimerazom kojom se umnažao odsječak genoma koronavirusa određene veličine.

#### **3.2.1. Priprema uzoraka**

Priprema se odvija u biozaštitnoj komori, pri čemu se uzorci razrjeđuju puferiranom solnom otopinom u omjeru 1:10, te se dobivena otopina kratkotrajno miješa na tresilici i centrifugira na 3500 okretaja u trajanju od 10 minuta.

#### **3.2.2. Izdvajanje virusne RNK**

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

Komplet QIAamp DNA Mini Kit sadrži:

QIAamp kolona za centrifugiranje	50 komada
plastične epruvete zapremine 2 ml	200 komada
puferska otopina AVL	31 ml
puferska otopina AW1 (koncentrirana)	19 ml
puferska otopina AW2 (koncentrirana)	13 ml
puferska otopina AVE	3x2 ml
Carrier RNK	310 µg

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

Pri izvođenju prvog dijela PCR metode korišteni su sljedeći reagensi:

- voda slobodna od RNK-za
- reakcijski pufer 5x koncentriran
- 25 mM dNTP
- uzvodna početnica 10 µM (CCVF<sub>1</sub>)
- nizvodna početnica 10 µM (CCVR<sub>1</sub>)
- OneStep RT-PCR Enzyme Mix

Pri izvođenju drugog dijela ugniježdene PCR metode korišteni su 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
- uzvodna početnica 10 µM (CCVF<sub>2</sub>)
- nizvodna početnica 10 µM (CCVR<sub>2</sub>)
- Taq Platinum 5u/µl (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)



**Tablica 1.** Početnice korištene za umnažanje odsječka genoma koronavirusa za RT-PCR metodu (NAYLOR i sur., 2001.).

<b>Oznaka početnice</b>	<b>Smjer vezanja</b>	<b>Nukleotidni slijed</b> 5' → 3'
CCVF <sub>1</sub>	Uzvodna početnica	TAATGTGACACAAAYTGCCTGGCAATG (201 do 227)
CCVR <sub>1</sub>	Nizvodna početnica	CTGTAGAAACTYGACTCACTCACTG (1261 do 1286)

**Tablica 2.** Početnice korištene za umnažanje odsječka genoma koronavirusa za ugniježdene PCR metodu (NAYLOR i sur., 2001.).

<b>Oznaka početnice</b>	<b>Smjer vezanja</b>	<b>Nukleotidni slijed</b> 5' → 3'
CCVF <sub>2</sub>	Uzvodna početnica	GTACTGGCAATGCAMGWGGTAAACC (403 do 428)
CCVR <sub>2</sub>	Nizvodna početnica	ACRTTGGTNGCATAGCCAGTGCA (895 do 917)

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

Reagens	Količina za 1 uzorak
Voda	2,30 $\mu$ l
Pufer 5x	1,0 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	0,20 $\mu$ l
Početnica CCVF <sub>1</sub> (10 $\mu$ M)	0,15 $\mu$ l
Početnica CCVR <sub>1</sub> (10 $\mu$ M)	0,15 $\mu$ l
OneStep RT-PCR Enzyme Mix	0,20 $\mu$ l

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

Reagens	Količina za 1 uzorak
Voda	2,54 $\mu$ l
Pufer 10x	0,5 $\mu$ l
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,11 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	0,40 $\mu$ l
Početnica CCVF <sub>2</sub> (10 $\mu$ M)	0,20 $\mu$ l
Početnica CCVR <sub>2</sub> (10 $\mu$ M))	0,20 $\mu$ l
Taq Platinum 5u / $\mu$ l	0,063 $\mu$ l

Reakcijska smjesa za oba dijela PCR metode pripravljena je u količini od 5 $\mu$ l po uzorku, od čega je 4  $\mu$ l reakcijske smjese, dok je 1  $\mu$ l izdvojene RNK pojedinog uzorka za prvi dio PCR reakcije. U drugom dijelu ugniježdene PCR reakcije 1  $\mu$ l izdvojene RNK zamijenjen je jednim  $\mu$ l reakcijske smjese prvog dijela PCR reakcije. Nakon čega se reakcijska smjesa u Eppendorf epruveticama stavlja u PCR-uređaj programiran za prvi dio RT-PCR temperaturni program kako slijedi :

50 °C	30 min	
95 °C	15 min	
94 °C	30 s	} 40 x
58 °C	45 s	
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	

hlađenje pri + 4°C

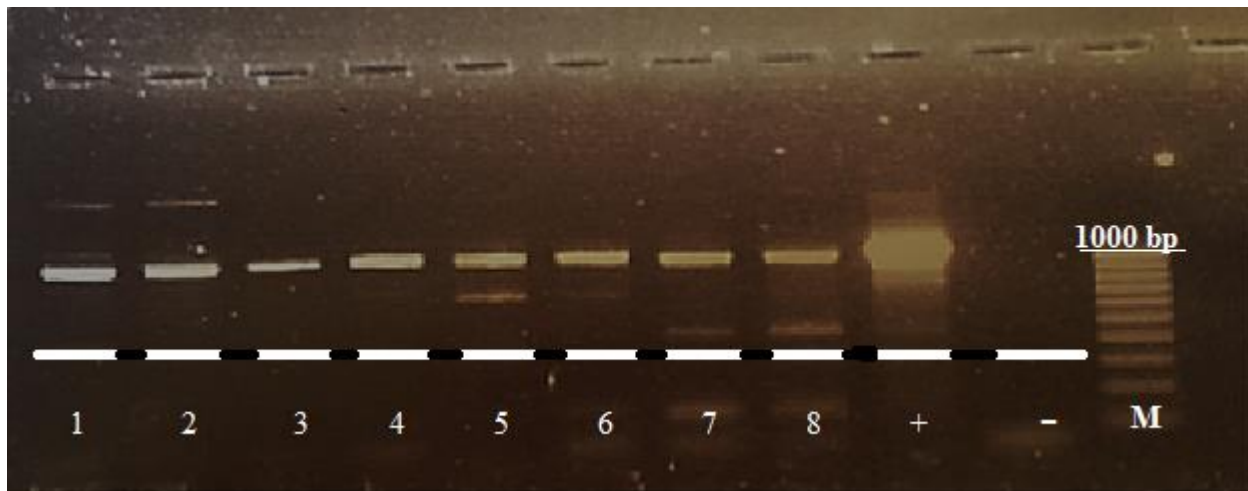
Temperaturni program drugog dijela PCR-a:

94 °C	5 min	
94 °C	30 s	} 33 x
58 °C	30 s	
72 °C	2 min	
72 °C	5 min	

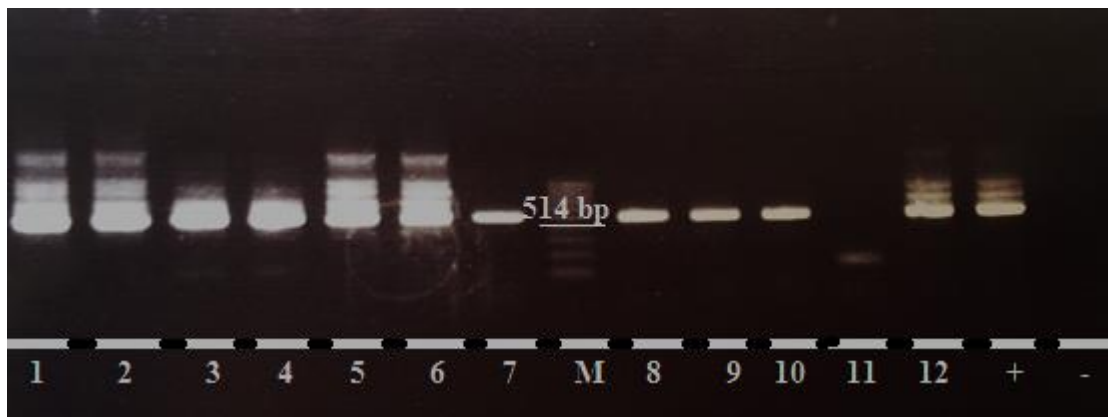
hlađenje pri + 4°C

### 3.2.4. Elektroforeza u gelu

Kako bi se provjerila uspješnost umažanja željenog dijela virusnog genoma pretraživanih uzoraka potrebno je učiniti elektroforezu u gelu. Princip elektroforeze temelji se na migraciji električki nabijenih čestica kroz otopinu zbog djelovanja električnog polja. Što dovodi do separacije električki nabijenih čestica zbog razlika u brzini migracije pojedinih vrsta čestica, koja ovisi o električnom naboju čestice, njezinom obliku i veličini.



**Slika 4.** Elektroforeza u gelu - dokaz genoma uzročnika u pretraživanom uzorku, prikazani produkti odgovaraju odsječku genoma veličine 1083 bp prvog dijela reakcije



**Slika 5.**

Elektroforeza u gelu - dokaz genoma uzročnika u pretraživanom uzorku, prikazani produkti odgovaraju odsječku genoma veličine 514 bp drugog dijela reakcije

### 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) (Clever Scientific Ltd, Rugby, Velika Britanija)
- marker DNA Ladder 100 pb (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- agaroz (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- TAE pufer
- pufer za nanošenje uzoraka u gel (10X *Blue Juice gel loading dye*) (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- uređaj za snimanje gelova (Gel Doc 200, Bio-Rad, Hercules, California, SAD)
- boja za gel (Nucleic Acid Gel stain) (Lonza, Basel, Switzerland)

#### **3.2.4.1. Priprema TAE (Tris-acetate-EDTA) 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)

Priprema započinje stavljanjem 93,5 g EDTA u 400 ml redestilirane vode uz podešavanje pH na 8,0 dodavanjem kristala NaOH, slijedi dopuna redestiliranom vodom do volumena od 500 ml, čime se dobiva 0,5 M otopina EDTA. Nakon čega se 242 g Tris baze otopi u 750 ml redestilirane vode uz dodatak 57ml ledene octene kiseline i 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) iz prijašnje reakcije, te se i ta smjesa dopuni redestiliranom vodom do volumena od 1000 ml. Ovakav TAE pufer,

koncentriran je 50x, no za pripremu gela za elektroforezu potrebna koncentracija TAE pufera je 1x, koja se dobiva miješanjem 10 ml 50x koncentriranog TAE pufera i 490 ml destilirane vode.

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

U Erlenmayerovu tikvicu odvagane se 0,5 g agaroze za elektroforezu kojoj se dodaje 50 ml 1x koncentriranog TAE pufera, te se ta smjesa zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici tijekom 2-3 minute otapa sve dok otopina ne postane potpuno bistra. Otopina se zatim hladi na temperaturu od 50°C te joj se dodaje 0,25 µl boje za gel, nakon čega se otopina razlijeva u kalup za gel na kojem su prethodno postavljene vanjske stranice zbog dobivanja željenog oblika gela te su umetnuti češljici, koji služe za dobivanje jažica u gelu. Hlađenjem vodene otopine agaroze dolazi do umrežavanja molekula, te nastaju vlaknaste polimerne strukture između koji se zadržava otopina elektrolita, te nastaje gel. Nakon hlađenja gela skidaju se vanjske stranice i vade se češljici, a postolje s gelom postavlja se u kadu za elektroforezu tako da je dio gela s jažicama okrenut prema katodi, a kadi za elektroforezu dopunjena TAE-puferom kako bi u potpunosti prekrivao gel.

#### **3.2.4.3. Nanošenje uzoraka na gel i postupak elektroforeze**

Nakon pripreme gela, slijedi nanošenje uzoraka u jažice, što se čini miješanjem 3 µl boje za nanošenje (*engl. 10x Blue Juice loading dye*) s 5 µl umnožene RNK na parafinskom papiru, za svaki pretraživani uzorak. Uzorci se mikropipetom nanose redom u jažice, dok se u posljednje tri jažice na gelu, nanose pozitivna i negativna kontrola te DNA marker (DNA Ladder 100 pb, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD). Nakon toga bazen s gelom, uređaja za elektroforezu, zatvara se poklopcem i spaja na istosmjernu električnu struju napona 90 V i jačine 450 A. Postupak elektroforeze traje 45 minuta, a po završetku gel se vadi, te se rezultati očitavaju pomoću UV transiluminatora i snimaju uređajem za snimanje gelova, nakon čega se slika u trajnom obliku pohranjuje na računalo i ispisuje na termopapiru. Dokazom uzročnika PCR metodom smatra se prisutnost umnoženog fragmenata odgovarajuće veličine, koja se procjenjuje usporedbom položaja dobivenog fragmenta s položajem markera.

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

Nukleotidni slijed umnoženog odsječka virusne DNK određen je u svrhu molekularne tipizacije i filogenetske analize psećeg koronavirusa. 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 sljedova rađena je pomoću računalnog programa MEGA 7 (KUMAR i sur., 2016.). Pomoću navedenog programa načinjeno je višestruko sravnjivanje DNK sljedova te su ustanovljena postojeća polimorfna mjesta unutar slijeda svakog pojedinog uzorka. Koristeći metodu najveće vjerojatnosti (*engl. maximum likelihood, ML*) nukleotidni sljedovi dobivenih odsječaka virusne DNK uspoređeni su s dostupnim nukleotidnim sljedovima iz NCBI banke gena za pojedine podtipove CCoV-a u cilju izrade filogenetskog stabla.

**Tablica 5.** Oznake i pristupni brojevi nukleotidnih slijedovi sojeva koronavirusa korišteni za filogenetsku analizu.

<b>CRCoV</b>		<b>CCoV-I</b>		<b>CCoV-IIa pantropni</b>		<b>CCoV-IIb</b>	
240/05	EU999954	23/03	AY307021	341/05	EU856361	CB/05	DQ112226
				174/06	EU856362	450/07	GU146061
				430/07	EU924790		
				118/08	EU924791		
<b>TGEV</b>				<b>CCoV-IIa enterotropni</b>			
Purdue	NC_002306			Insavc-1	D13096		
TS	DQ201447			BGF10	AY342160		
96-1933	AF104420			03-3684	FJ009113		
<b>FCoV</b>							
typeIBlack	EU186072						
79-1146	NC_007025						

### 3.4. Statistička obrada podataka

Obrada prikupljenih podataka provedena je statističkim programom Dell Statistica (*data analysis software system*), version 12. software.dell.com. (Dell Inc., 2015). Osim parametara deskriptivne statistike načinjena je i statistička analiza rezultata. Kvalitativne varijable, učestalosti, obrađene su hi-kvadrat testom. S obzirom da podaci o trajanju hospitalizacije pojedinih životinja nisu pratili normalnu raspodjelu analizirani su Mann-Whitney U testom, dok su podaci o broju leukocita, koji su pratili normalnu raspodjelu, analizirani jednosmjernom analizom varijance (ANOVA).



## 4. REZULTATI

Istraživanje je obuhvaćalo 391 psa, od kojih je 40 jedinki uzorkovano u 2015. godini, 127 jedinki u 2016. godini, 121 jedinka u 2017. te 103 jedinke u 2018. godini. Iz anamnestičkih podataka vidljivo je da je od ukupnog broja pasa, njih 270 u posjedu privatnih vlasnika, dok je ostalih 121 u vlasništvu skloništa za nezbrinute životinje. Od ukupnog broja životinja, 213 pasa bilo je muškog, a 177 ženskog spola. Životinje su zastupljene u 66 različitih pasmina od kojih je najviše bilo mješanaca (N=202), zatim maltežera (N=23), američkih staforda (N=14), njemačkih ovčara (N=11), dok je u ostalih pasmina zastupljenost bila manje od deset jedinki. Klinički znakovi, na koronavirusnu infekciju pozitivnih životinja uključivali su povraćanje koje se javilo kod 95 oboljelih životinja, odnosno 68,84 % , proljev je uočen u 126 životinja, što čini 90,65 % , dok se krvavi proljev javio u 73 pasa, 53,68 %. Klinički znakovi od strane dišnog sustava javili su se u 31 psa, 22,63%.

Od ukupno pretraženog 391 uzorka, prisutnost koronavirusa dokazana je u njih 140. Dokazom uzročnika PCR metodom smatra se prisutnost umnoženog fragmenata veličine 550 bp, koja se procjenjuje usporedbom položaja dobivenog fragmenta s položajem markera. Nakon čega se dobiveni proizvodi PCR metode šalju na pročišćavanje i određivanje nukleotidnog slijeda.

U odnosu učestalosti obolijevanja mješanaca i čistokrvnih pasa, vidljivo je učestalije obolijevanje mješanaca od koronavirusne infekcije ( $p=0,0001$ ), nego li je to slučaj kod čistokrvnih pasa. No ipak usporedbom svih pasa koji se nalaze u posjedu privatnih vlasnika sa onima u vlasništvu skloništa za nezbrinute životinje, vidljiva je izrazita predispozicija za obolijevanje od koronavirusne infekcije kod pasa u skloništima ( $p=0,0001$ ). Takvi rezultati ukazuju na izrazitu predispoziciju mješanaca za razvoj koronavirusne infekcije, jer većinu populacije pasa u skloništima za nezbrinute životinje čine upravo mješanci. Spolna predispozicija za infekciju koronavirusom nije dokazana ( $p=0,32$ )

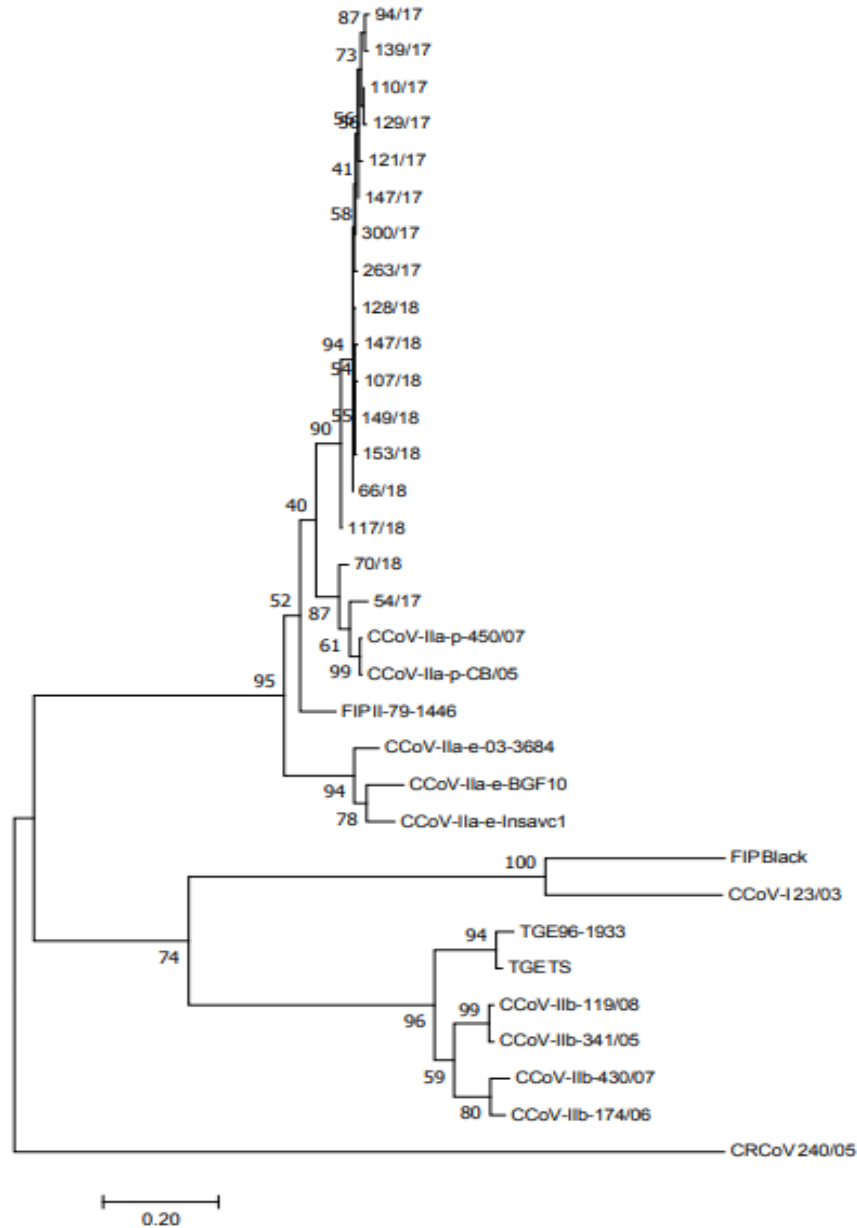
Izrazita dobna predispozicija vidljiva je prilikom infekcije koronavirusom ( $p=0,004$ ). Čak 55% pasa starosti do dva mjeseca te starosti od dva do četiri mjeseca koji su pokazivali kliničke znakove akutnog gastroenteritisa, bili su inficirani koronavirusom. Nešto manja dobna predispozicija javlja se u pasa dobi od četiri do šest mjeseci s učestalošću infekcije od 44%. Nakon čega učestalost infekcije znatno pada s porastom starosti pasa.

Statističkom analizom ustanovljena je povećana učestalost za razvoj povraćanja ( $p=0,006$ ), zatim krvavog proljeva ( $p=0,04$ ) te kliničkih znakova koji govore u prilog oboljenja dišnog sustava ( $p=0,03$ ), u pasa oboljelih od koronavirusne infekcije. Dok infekcija koronavirusom nije značajnije utjecala na pojavu proljeva ( $p=0,055$ ). Laboratorijskom analizom broja leukocita, nije utvrđena statistički značajna razlika u broju stanica u odnosu inficiranih i neinficiranih pasa ( $p=0,43$ ).

Usporedbom pojave koinfekcija koronavirusa vidljiva je izrazita učestalosti istovremene infekcije koronavirusa i parvovirusa ( $p=0,0001$ ), nešto manje koinfekcija sa bocavirusom ( $p=0,04$ ). Koinfekcije koje se u ovom istraživanju nisu pokazale značajnima su koinfekcije koronavirusa s virusom štenećaka ( $p=0,58$ ), nadalje sa astrovirusom ( $p=0,87$ ), iako su se infekcije s adenovirusom pokazale statistički značajne ( $p=0,04$ ) uzorkovani broj životinja bio je relativno mali, pa se ovi rezultati procjenjuju s rezervom, ali govore u prilog potrebi daljnjeg nastavka istraživanja.

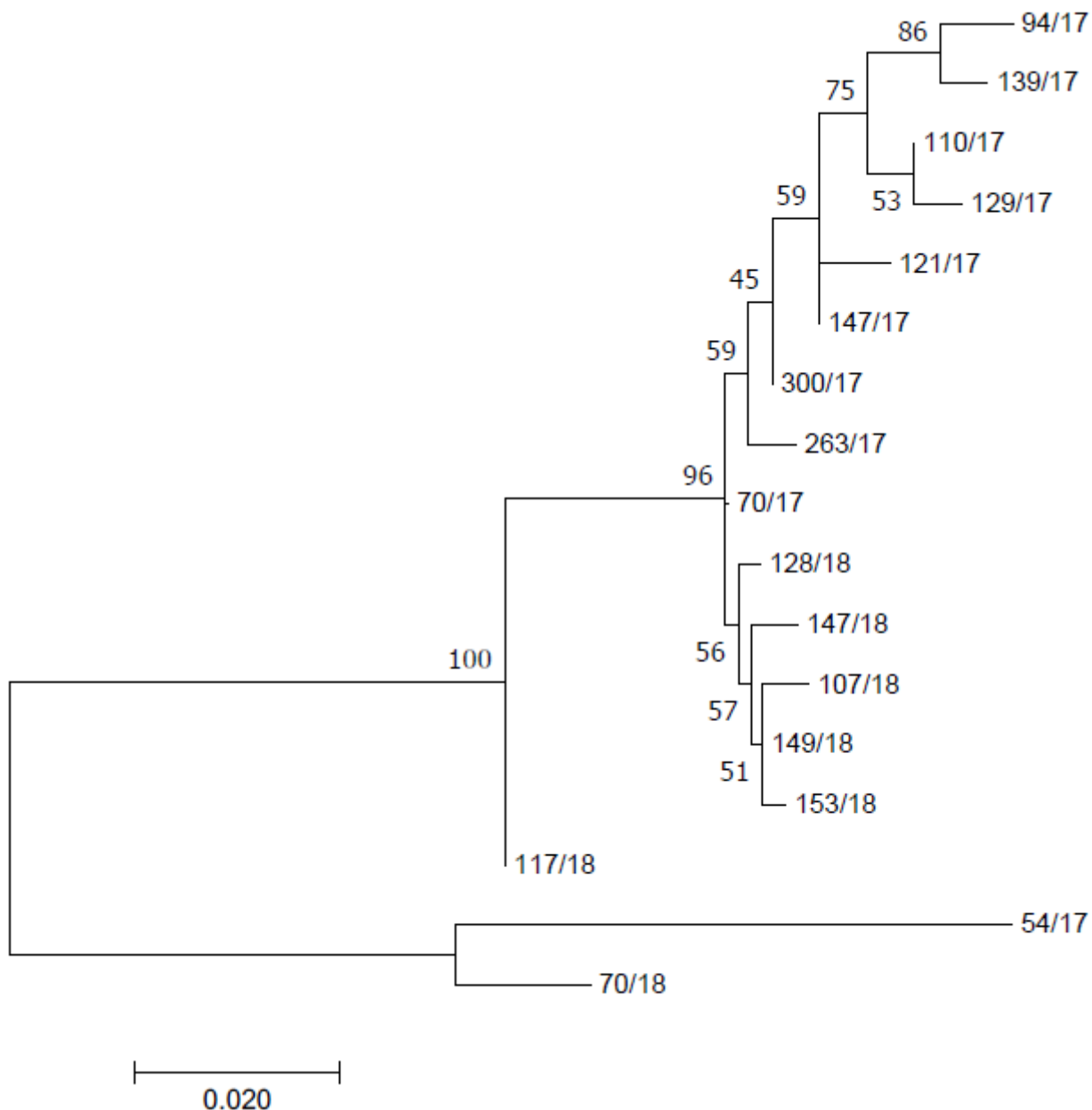
Prognoza kod pasa inficiranih koronavirusom, bila je znatno lošija, odnosno psi inficirani virusom imali su statistički značajno nižu vrijednost preživljavanja od pasa s kliničkim znakovima akutnog gastroenteritisa koji nisu bili inficirani istim ( $p=0,02$ ). Te je hospitalizacija takvih pacijenata bila dulja od neinficiranih pacijenata ( $p=0,04$ ).

Filogenetska analiza 34 pozitivnih uzoraka pokazala je da prema promjenama u S proteinu od uspoređenih uzorka svi su uzorci svrstani u sojeve koji pripadaju CCoV IIa. Također, gotovo svi uzorci koji su pokazali pripadnost soju CCoV IIa, bili su vrlo bliski, dok su neki bili potpuno isti. Sojevi koji se nisu razlikovali, potječu iz skloništa za nezbrinute životinje, zbog stalne cirkulacije istih virusa na malom prostoru. Tako sojevi GE 66/18, GE 69/18, GE 84/18, GE 109/18, GE 131/18, odgovaraju soju GE 70/17, nadalje sojevi GE 154/18 i GE 164/18 odgovaraju soju GE 149/18, sojevi GE 162/18 te soj GE163/18 odgovaraju soju GE 147/18, soj GE 117/18 odgovara soju GE 123/18, a soj GE 84/17 odgovara soju GE 54/17. Svi navedeni sojevi nađeni su u skloništa za nezbrinute životinje.



**Slika 6.** Filogenetsko stablo CCoV sojeva

Filogenetsko stablo dobiveno je korištenjem Maximum Likelihood metode koristeći 3-parametarski Tamura model (TAMURA, 1992.). Drvo s najvećim logaritmom vjerojatnosti je prikazano (-15111,50). 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 korišten je pseći respiratorni koronavirus koji pripada betakoronavirusima.



**Slika 7.** Filogenetsko stablo CCoV sojeva zastupljenih u RH

Filogenetsko stablo nukleotidnih slijedova CCoV s područja RH dobiveno je korištenjem Maximum Likelihood metode koristeći 3-parametarski Tamura model (TAMURA, 1992.). Drvo s najvećim logaritmom vjerojatnosti je prikazano (-15115,60). Postotni udio drva u kojem se pojedini taksoni grupiraju zajedno prikazan je na mjestima račvanja grana. Duljina grana proporcionalna je broju izmjena po nukleotidu.

## 5. RASPRAVA

Od 1971. godine, nakon prve izolacije psećeg koronavirusa u Njemačkoj kod pasa koji su pokazivali znakove akutnog gastroenteritisa, nije se pridavao velik značaj virusu zbog blage i samolimitirajuće kliničke slike kojom se prezentirao. Virus je nakon toga dokazan diljem svijeta, preko Europe, Sjeverne Amerike, Azije i Australije, no i dalje nije izazivao značajan interes, kao ni njegova uloga kao uzročnika akutnih gastroenteritisa pasa (PRATELLI, 2006). Nastup SARS-a 2002. godine, poslužio je kao temelj za početak značajnih istraživanja u smjeru epidemiološke važnosti životinjskih koronavirusa, zbog spoznaje da većina ako ne i svi ljudski koronavirusi potječu od koronavirusa šišmiša. Nakon čega je 2012. godine MERS potvrdio pretpostavku i naglasio važnost daljnjih istraživanja (HULSWIT i sur., 2016.). Vidljiva je sposobnost koronavirusa da od vrlo blagih dovede do izrazito smrtonosnih kliničkih znakova, što joj omogućuje njena izrazita sposobnost i učestalost izmjena, čime dovodi do pojave novih genotipova, te mogućnost inficiranja širokog spektra domaćina. Stoga je pojava pantropnog koronavirusa pasa izazvala veliko zanimanje kada je 2005. godine u Italiji dovela do oboljenja i ugibanja pasa s izrazito jakim znakovima akutnog gastroenteritisa, nakon čega su potvrđeni takvi slučajevi u Grčkoj, Belgiji te Francuskoj. Pojava pantropnog koronavirusa potaknula je potrebu za provedbom istraživanja te detekcijom populacije pasa inficirane koronavirusima. Rezultati skupnih uzoraka iz nekoliko europskih zemalja, pokazivali su prevalenciju od 35,02%, od kojih je najviše uzoraka bilo podrijetlom iz Italije, Francuske, Grčke te Mađarske. Od 35,02 % pozitivnih uzoraka 19,35 % pasa bilo inficirano sojevima koji pripadaju psećim koronavirusima Iia. Odgovarajući rezultati dobiveni su i ovim istraživanjem, kojim je obuhvaćena 391 životinja, te je prevalencija u ovom slučaju bila 35,81%, dok su kod 34 pasa potvrđeni sojevi koji pripadaju psećim koronavirusima Iia, što odgovara prevalenciji od 24,28%. Naknadnim istraživanjima provedenim 2010. godine u europskih pasa, prosječna prevalencija je narasla na 42,06 %, od čega je Mađarska imala najvišu prevalenciju od 78,05%, zatim Grčka sa 55,5%, te Italija sa 43,42%, dok je Ujedinjeno Kraljevstvo imalo najnižu prevalenciju od 27,13%. Odnos sojeva psećih koronavirusa Iia i Iib, bio je u korist Iia sojevima, dok su od svih CCoV II soja tek 19,50% pripali sojevima CCoV Iib. Distribucija pojedinih sojeva također se razlikovala te je najviše CCoV Iib sojeva bilo prisutno u Mađarskoj, gdje su gotovo svi sojevi CCoV II pripali sojevima Iib (96,87%), zatim u Ujedinjenom Kraljevstvu (24,39%) Italiji (12,32%), dok je Grčka imala najnižu prevalenciju od pozitivnih CCoV Iib sojeva s jednim pozitivnim uzorkom, ostale

europske zemlje obuhvaćene istraživanjem nisu imale niti jedan pozitivan slučaj infekcije CCoV IIb sojem. Taj podatak se poklapa s nalazom ovim istraživanjem, od kojih su svih 34 uzorka bila svrstana u sojeve koji pripadaju psećim koronavirusima IIa. Takvi su izrazito virulentni sojevi psećeg koronavirusa IIa soja, nastali mutacijama na S proteinu, nazvani pantropni sojevi, što dovodi do zaključka kako bi pseći koronavirusi mogli poslužiti kao odgovarajući model za istraživanje koronavirusnih strategija u prelasku vrsne barijere i promjene njihove patogenosti.

Izrazita dobna predispozicija vidljiva je prilikom infekcije koronavirusom ( $p=0,004$ ). Što odgovara već uvriježenom mišljenju da se virusni gastroenteritisi javljaju u najvećem broju slučajeva kod mladih pasa, odnosno štenadi. Čak 55% pasa starosti do dva mjeseca te starosti od dva do četiri mjeseca koji su pokazivali kliničke znakove akutnog gastroenteritisa, bili su inficirani koronavirusom. Takav podatak odgovara vremenu početka pada kolostralnih imunoglobulina, koji pružaju imunološku zaštitu u prvim tjednima života štenadi. Također, teža klinička slika koja se javlja u štenadi povezana je sa bržim razvojem dehidracije, uzrokovane proljevom i povraćanjem, te nastankom hipoglikemije. Kontrola bolesti uzrokovane psećim koronavirusom znatno ovisi o vakcinaciji kuja, kojom se smanjuje izlučivanje virusa ali dovodi i do povećanja koncentracije kolostralnih imunoglobulina, iako njihova primjena ne pruža potpunu zaštitu u tome što oni smanjuju ali ne sprječavaju replikaciju i izlučivanje CCoV u probavnom sustavu. Nešto manja dobna predispozicija javlja se u pasa dobi od četiri do šest mjeseci s učestalošću infekcije od 44%. U starijih pasa učestalost infekcije znatno se smanjuje, no ako se i javlja klinički znaci su znatno blažeg tijeka. Ako su takvi psi imunokompetentni, zbog rane izloženosti koronavirusima, te značajki koronavirusa da inficira enterocite, odnosno ne uzrokuje izrazite promjene u sluznici crijeva, sekundarni imunološki odgovor dovodi do brze i obilne produkcije lokalnih imunoglobulina, najznačajnije imunoglobulin A čija je uloga prijanjanje na patogene u lumenu crijeva te njihova neutralizacija, čime se postiže lokalna obrana sluznice crijeva te kontrola bolesti povezanih sa psećim koronavirusom. Spolna predispozicija za infekciju koronavirusom nije dokazana.

Usporedbom učestalosti obolijevanja mješanaca i čistokrvnih pasa, vidljivo je učestalije obolijevanje mješanaca od koronavirusne infekcije ( $p=0,0001$ ), nego li je to slučaj kod čistokrvnih pasa, jer u ukupnoj populaciji pasa mješanci čine većinu. Dok pasminsku predispoziciju nije moguće utvrditi zbog premalog uzorka. No ipak usporedbom svih pasa koji se

nalaze u posjedu privatnih vlasnika s onima u vlasništvu skloništa za nezbrinute životinje, vidljiva je izrazita predispozicija za obolijevanje od koronavirusne infekcije kod pasa u skloništima ( $p=0,0001$ ). Mnogobrojnim istraživanjima već je potvrđen podatak da psi u takvim uvjetima češće obolijevaju, ne samo od koronavirusnih infekcija, nego i drugih virusnih gastroenteritisa, te su i pojave koinfekcija izrazito česte zbog velike gustoće naseljenosti, koja znatno olakšava prijenos virusa između jedinki. Ovim se istraživanjem također pokušalo dokazati učestalost pojave infekcija između najčešćih virusnih bolesti pasa. Usporedbom učestalosti koinfekcija došlo se do podataka da izrazitu statističku značajnost ima koinfekcija enteričke koronavirusne infekcije sa parvovirusnom infekcijom, i to ( $p=0,0001$ ), nešto manje koinfekcija s bocavirusom ( $p=0,04$ ), te adenovirus s istom učestalošću ( $p=0,04$ ), dok koinfekcija s virusom štenećaka ( $p=0,58$ ) te astrovirusom ( $p=0,87$ ) nisu bile značajne. Takve koinfekcije vrlo su česte u gustim populacijama, kao što je to sklonište za nezbrinute životinje, gdje se nalaze na malom području psi raznih imunoloških i cijepljenih statusa. U širenju virusa, nadalje utječe i izlučivanje virusa koje kod koronavirusnih enteritisa može biti i do šest mjeseci nakon prestanka kliničkih znakova. Uzevši u obzir dugo izlučivanje virusa, manjak higijenskih mjera, stres zbog manjka prostora, gustoće naseljenosti, i ostalih nepovoljnih uvjeta koji se javljaju u skloništima, lako se može pretpostaviti da se teško može kontrolirati širenje visoko infektivnih sojeva koronavirusa, ali i drugi virusi pasa, kada jednom uđu u objekt. Takva pretpostavka dokazana, ovim istraživanjem istih sojeva psećeg koronavirusa IIa, koji su se javljali u većim vremenskim razmacima u skloništima obuhvaćenim ovim istraživanjem.

Ovo istraživanje imalo je poseban osvrt na kliničke manifestacije koronavirusne infekcije. Analizirana je pretpostavka da enterička koronavirusna infekcija uzrokuje kliničke znakove koji se pridaju i ostalim virusnim gastroenteritisima, te da postoji značajnost u javljanju određenih kliničkih znakova kojima bi se takva infekcija mogla razlučiti od bakterijskih enteritisa. Od ukupnog broja životinja, njih 68,84% pokazivalo je znakove povraćanja, te je taj podatak imao statističku značajnost od ( $p=0,006$ ), također statistički značajni klinički znakovi bili su krvavi proljev, koji se javio u 53,68% inficiranih životinja, te mu je značajnost bila ( $p=0,04$ ), respiratorni znaci bili su značajni za koronavirusnu infekciju te su se javili u 22,63% inficiranih životinja ( $p=0,03$ ). Te bi se u kliničkom smislu, pri javljanju ovih kliničkih znakova, mogla javiti sumnja na koronavirusni enteritis, naročito ako su prisutni svi od navedenih kliničkih znakova. Klinički znak koji nije bio značajan i specifičan za koronavirusnu infekciju bio je proljev koji se

javio u 90,65% inficiranih životinja ( $p=0,055$ ). Uspoređujući dakle samo koronavirusnu infekciju, u odnosu na ostale uzroke akutnog gastroenteritisa, nije bilo moguće uočiti niti izdvojiti klinički znak koji bi neosporno mogao potvrditi infekciju baš tim virusom. Vrlo važan podatak u kliničkom smislu je dugotrajnost liječenja i stopa preživljavanja inficiranih životinja. Kako s produljenim periodom hospitalizacije rastu troškovi liječenja, uputno je zbog produljene hospitalizacije koju veže infekcija koronavirusom prilikom kliničkih znakova akutnog gastroenteritisa uz ostale uobičajene uzročnike isključiti i koronavirusni enteritis kako bi se preciznije odredilo vrijeme oporavka pacijenta a time i sami troškovi liječenja. Koronavirusna infekcija, kako pokazuje ovo istraživanje znatno produljuje vrijeme oporavka inficiranog pacijenta u odnosu na druge uzročnike ( $p=0,04$ ). Smrtnost inficiranih životinja također je važan podatak, iako on u ovom istraživanju nije pokazao značajnost u infekciji sa koronavirusnim enteritisom ( $p=0,95$ ), no prijašnjim istraživanjima došlo se do podataka da je stopa preživljavanja pasa sa koronavirusnim enteritisom u koinfekciji s parvovirusom pasa bila značajno niža unatoč pravodobnom liječenju.

Dijagnostika koronavirusnih infekcija, temelji se na izrazito preciznim molekularnim metodama kao što su RT-PCR te qRT-PCR. Takve metode iako vrlo osjetljive, ipak, zbog visoke stope mutacija koronavirusa ponekad dovode do dobivanja lažno negativnih rezultata. Virus neutralizacijski testovi i imunoenzimni testovi, također su metode izbora ali te serološke analize ograničene su samo na dokaz izlaganja virusu, dok serumski IgG titar nije proporcionalan zaštiti, kao što je to intestinalni IgA titar. Trenutno ne postoje dijagnostički testovi koji bi bili u mogućnosti razlikovati enterički i pantropni soj psećeg koronavirusa, stoga se psi koji posjeduju nalaz CCoV-IIa soja izvan probavnog sustava smatraju pozitivnim na pantropni soj virusa. Kako je dokazano ovim istraživanjem, povećana je učestalost kliničkih znakova od strane dišnog sustava u pasa oboljelih od koronavirusa te bi zbog kvalitetnije i preciznije dijagnostike, kako i zbog sve učestalije pojave pantropnih sojeva, bilo uputno uz standardnu pretragu na koronavirusni enteritis, životinju pretražiti i na pantropnu, uzorkovanjem obriska nosnice. Nadalje, dokaz CCoV-IIa soja iz tog obriska, koji je i jedini prisutan CCoV II soj nađen ovim istraživanjem na području Zagreba, smatrao bi se konačnim dokazom sistemnog širenja koronavirusa, odnosno pozitivnim nalazom pantropnog soja psećeg koronavirusa.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Koronavirusna infekcija pasa je po učestalosti je drugi uzrok, odmah iza parvovirusne infekcije, akutnog gastroenteritisa pasa na području grada Zagreba s prevalencijom od 35,81% u populaciji bolesnih psa.
2. Pseći koronavirus pokazuje izrazitu dobnu predispoziciju, 55% pozitivnih pasa na koronavirus bili su dobi do dva mjeseca te između dva i četiri mjeseca starosti.
3. Povećan rizik od oboljenja imaju psi u skloništima za napuštene životinje, te su kod takvih pasa koinfekcije značajno češće, naročito sa parvovirusnom infekcijom i bocavirusom.
4. Koronavirusna infekcija, u odnosu na ostale uzroke akutnog gastroenteritisa, ne očituje se niti jednim kliničkim znakom koji bi neosporno mogao potvrditi infekciju baš tim virusom te su potrebne dodatne metode dijagnostike.
5. Koronavirusna infekcija ima osobiti klinički značaj u slučaju infekcija s drugim uzročnicima zaraznih gastroenteritisa pasa u smislu znatnog produljenja vremena hospitalizacije što je povezano s povećanim troškovima liječenja
6. Na području grada Zagreba javljaju se sojevi CCoV IIa koji se dodatno dijele u barem dvije podskupine sojeva.
7. Pseći koronavirusi predstavljaju poseban rizik za zaražavanje pasa u prihvatilištima za nezbrinute životinje.

## 7. LITERATURA

1. BELOUZARD, S.; MILLET, J.K.; LICITRA, B.N.; WHITTAKER, G.R. (2012.):Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, 4, 1011–1033.
2. BINN, L. N., LAZAR, E. C., KEENAN, K. P., HUXSOLL, D. L., MARCHWICKI, R. H. AND STRANO, A. J. (1974.): Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. *Proc. Annu. Meet. U. S. Anim. Health Assoc.* 78: 359–366.
3. BOSCH BJ, VAN DER ZEE R, DE HAAN CAM, ROTTIER PJM. (2003):The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *Journal of Virology.* ;77(16):8801–8811
4. BOSCH, B.J., MARTINA, B.E.E., VAN DER ZEE, R., LEPAULT, J., HAIJEMA, B.J., VERSLUIS, C.(2004.): Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (22), 8455–8460.
5. BOSCH, B.J., VAN DER ZEE, R., DE HAAN, C.A.M., ROTTIER, P.J.M., (2003.): The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J. Virol.* 77 (16), 8801–8811.
6. BUONAVOGLIA C, DECARO N, MARTELLA V, ELIA G, CAMPOLO M, DESARIO C, CASTAGNARO M, TEMPESTA M. (2006.): Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerg. Infect. Dis.* 12:492– 494.
7. BUONAVOGLIA, C.,(2010.): Recombinant canine coronaviruses in dogs. *Eur. Emerg. Infect. Dis.* 16, 41–47.
8. CARMICHAEL, L.E. (1999.):Canine viral vaccines at a turning point—A personal perspective. *Adv. Vet. Med.*, 41, 289–307
9. CARSTENS, E.B.,(2010.):Ratification vote on taxonomic proposals to the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol.* 155, 133–146.
10. CAVANAGH, D., (1995.): The coronavirus surface glikoprotein. U: *The Coronaviridae*, (Siddell, S.G.,ur), Plenum Press, New York, str. 71-103.

11. CHANG CK, SUE SC, YU TH, HSIEH CM, TSAI CK, CHIANG YC, LEE SJ, HSIAO HH, WU WJ, CHANG WL, LIN CH, HUANG TH (2006.): Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *J Biomed Sci.* Jan;13(1):59-72.
12. CHANG HW, EGBERINK HF, HALPIN R, SPIRO DJ, ROTTIER PJ. (2012): Spike protein fusion Peptide and feline coronavirus virulence. *Emerg Infect Dis.* ;18(7):1089–1095.
13. COSTA, E. M., DE CASTRO, T. X., BOTTINO, F. O. AND GARCIA, R. C. (2014.): Molecular characterization of canine coronavirus strains circulating in Brazil. *Vet. Microbiol.* 168: 8–15.
14. DECARO N, BUONAVOGLIA C. (2008.): An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. *Vet. Microbiol.* 132:221–234.
15. DECARO N, BUONAVOGLIA C.( 2011.): Canine coronavirus: not only an enteric pathogen. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 41:1121–1132.
16. DECARO N, CAMPOLO M, LORUSSO A, DESARIO C, MARI V, COLAIANNI ML, ELIA G, MARTELLA V, BUONAVOGLIA C. (2008.): Experimental infection of dogs with a novel strain of canine coronavirus causing systemic disease and lymphopenia. *Vet. Microbiol.* 128:253–560.
17. DECARO N, DESARIO C, ELIA G, MARI V, LUCENTE MS, CORDIOLI P, COLAIANNI ML, MARTELLA V, BUONAVOGLIA C. (2007.): Serological and molecular evidence that canine respiratory coronavirus is circulating in Italy. *Vet. Microbiol.* 121:225–230.
18. DECARO N, ELIA G, MARTELLA V, CAMPOLO M, MARI V, DESARIO C, LUCENTEMS, LORUSSO E, KANELLOS T, GIBBONS RH, BUONAVOGLIA C. (2010.): Immunity after natural exposure to enteric canine coronavirus does not provide complete protection against infection with the new pantropic CB/05 strain. *Vaccine* 28:724 –729.
19. DECARO N, MARI V, CAMPOLO M, LORUSSO A, CAMERO M, ELIA G, MARTELLA V, CORDIOLI P, ENJUANES L, BUONAVOGLIA C. (2009.): Recombinant canine coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus of swine are circulating in dogs. *J. Virol.* 83:1532 1537.

20. DECARO N, MARI V, VON REITZENSTEIN M, LUCENTE MS, CIRONE F, ELIA G, MARTELLA V, KING VL, DI BELLO A, VARELLO K, ZHANG S, CARAMELLI M, BUONAVOGLIA C. (2012.): A pantropic canine coronavirus genetically related to the prototype isolate CB/05. *Vet. Microbiol.* 159:239 –244.
21. DECARO N, MARTELLA V, RICCI D, ELIA G, DESARIO C, CAMPOLO M, CAVALIERE N, DI TRANI L, TEMPESTA M, BUONAVOGLIA C. (2005.): Genotypespecific fluorogenic RT-PCR assays for the detection and quantitation of canine coronavirus type I and type II RNA in faecal samples of dogs. *J. Virol. Methods* 130:72–78.
22. DECARO N, PRATELLI A, CAMPOLO M, ELIA G, MARTELLA V, TEMPESTA M, BUONAVOGLIA C. (2004.): Quantitation of canine coronavirus RNA in the faeces of dogs by TaqMan RT-PCR. *J. Virol. Methods* 119:145–150.
23. DECARO, N., MARI, V., ELIA, G., ADDIE, D. D., CAMERO, M., LUCENTE, M. S., MARTELLA, V. BUONAVOGLIA, C. (2010.): Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 41–47.
24. DECARO, N., MARTELLA, V., ELIA, G., CAMPOLO, M., DESARIO, C., CIRONE, F., TEMPESTA, M. BUONAVOGLIA, C. (2007.): Molecular characterisation of the virulent canine coronavirus CB/05 strain. *Virus Res.* 125: 54–60
25. DEDIEGO ML, ALVAREZ E, ALMAZÁN F, REJAS MT, LAMIRANDE E, ROBERTS A, SHIEH WJ, ZAKI SR, SUBBARAO K, ENJUANES L (2007.): A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol.*;81(4):1701-13.
26. ERLES K, BROWNLIE J.(2009.): Sequence analysis of divergent canine coronavirus strains present in a UK dog population. *Virus Res.* 141:21–25.
27. GALLAGHER, T.; BUCHMEIER, M.J (2001.): Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology*, 279, 371–374.
28. GRAHAM, R.L.; BARIC, R.S. (2010.): Recombination, reservoirs, and the modular spike: Mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J. Virol.*, 84, 3134–3146.

29. GREEN C. E., N. DECARO (2011): Canine viral enteritis. U: Infection disease of the dog and cat, 4th Edition (Green C. E., ur.), Saunders Elsevier, Athens, Georgia, str. 76-80.
30. HEALD-SARGENT T , GALLAGHER T. (2012):Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses*. 2012 557-80.
31. JACKWOOD, M. W., HALL, D. & HANDEL, A. (2012). Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *J Molec Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 12, 1305–1311.
32. JARVIS,T.C. AND KIRKEGAARD,K. (1991) *Trends Genet.*, 7, 186-191
33. LAI, M.M.C., HOLMES, K.V., (2001.): Coronaviridae: the viruses and their replication. U: *Fields Virology*, 4th Edition (Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Strais, S.E.,ur), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, str. 1163–1185.
34. LI F, BERARDI M, LI W, FARZAN M, DORMITZER PR, HARRISON SC. (2006);Conformational States of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Ectodomain. *Journal of Virology*. 80(14):6794–6800.
35. LICITRA, B. N., DUHAMEL, G. E. AND WHITTAKER, G. R. (2014.): Canine enteric coronaviruses: emerging viral pathogens with distinct recombinant spike proteins. *Viruses* 6: 3363–3376.
36. LICITRA, B. N., WHITTAKER, G. R., DUBOVI, E. J. AND DUHAMEL, G. E. (2014.):Genotypic characterization of canine coronaviruses associated with fatal canine neonatal enteritis in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 52: 4230–4238.
37. LORUSSO, A.; DECARO, N.; SCHELLEN, P.; ROTTIER, P.J.; BUONAVOGLIA, C.; HAIJEMA, B.J.; DE GROOT, R.J. GAIN (2008.): preservation, and loss of a group 1a coronavirus accessory glycoprotein. *J. Virol.*, 82, 10312–10317.
38. MACLACHLAN N. J., E. J. DUBOVI (2011.): Coronaviridae. U: *Fenner's veterinary virology*, 4th Edition (MacLachlan, N. J., E. J. Dubovi, ur.), Saunders Elsevier, Oxford, UK, str. 435-449.
39. MARINARO, M.; MARI, V.; BELLACICCO, A.L.; TARSITANO, E.; ELIA, G.; LOSURDO, M.; REZZA, G.; BUONAVOGLIA, C.; DECARO, N(2010.): Prolonged

- depletion of circulating CD4+ T lymphocytes and acute monocytosis after pantropic canine coronavirus infection in dogs. *Virus Res.*, 152, 73–78.
40. NAYLOR, M. J., MONCKTON, R. P., LEHRBACH, P. R. AND DEANE, E. M. (2001.): Canine coronavirus in Australian dogs. *Aust. Vet. J.* 79: 116–119.
  41. NAYLOR, M.J., WALIA, C.S., MCORIST, S., LEHRBACH, P.R., DEANE, E.M., HARRISON, G.A., (2002.): Molecular Characterization confirms the presence of a divergent strain of canine coronavirus (UWSMN-1) in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3518–3522.
  42. NEUMAN B, ADAIR B, YOSHIOKA C, QUISPE J, MILLIGAN R, YEAGER M, BUCHMEIER M. (2006.): Ultrastructure of SARS-CoV, FIPV, and MHV Revealed by Electron Cryomicroscopy. U: *The Nidoviruses* (Perlman S, Holmes K, ur.). Vol. 581. Springer US; str. 181–185.
  43. NTAFIS V, XYLOURI E, MARI V, PAPANASTASSOPOULOU M, PAPAIOANNOU N, THOMAS A, BUONAVOGLIA C, DECARO N. (2012.): Molecular characterization of a canine coronavirus NA/09 strain detected in a dog's organs. *Arch. Virol.* 157:171–175.
  44. NTAFIS, V., MARI, V., DECARO, N., PAPANASTASSOPOULOU, M., PAPAIOANNOU, N., MPATZIOU, R., BUONAVOGLIA, C. AND XYLOURI, E. (2011.): Isolation, tissue distribution and molecular characterization of two recombinant canine coronavirus strains. *Vet. Microbiol.* 151: 238–244.
  45. PINTO, L.D., BARROS, I.N., BUDASZEWSKI, R.F., WEBER, M.N., MATA, H., ANTUNES, J.R., BOABAID, F.M., WOUTERS, A.T.B., DRIEMEIER, D., BRANDÃO, P.E., CANAL, C.W.,(2014.): Characterization of pantropic canine coronavirus from Brazil. *Vet. J.* 202, 659–662.
  46. PRATELLI A, DECARO N, TINELLI A, MARTELLA V, ELIA G, TEMPESTA M, CIRONE F, BUONAVOGLIA C. (2004.): Two genotypes of canine coronavirus simultaneously detected in fecal samples of dogs with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 42:1797–1799.
  47. PRATELLI A, MARTELLA V, DECARO N, TINELLI A, CAMERO M, CIRONE F, ELIA G, CAVALLI A, CORRENTE M, GRECO G, BUONAVOGLIA D, GENTILE M,

- TEMPESTA M, BUONAVOGLIA C. (2003.): Genetic diversity of a canine coronavirus detected in pups with diarrhoea in Italy. *J. Virol. Methods* 110:9–17.
48. PRATELLI, A. (2006.): Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis. *Vet. Res.* 37: 191–200
49. PRATELLI, A. (2011.): The evolutionary processes of canine coronaviruses. *Adv. Virol.* 2011: 562831.
50. PRATELLI, A., ELIA, G., MARTELLA, V., PALMIERI, A., CIRONE, F., TINELLI, A., CORRENTE, M. AND BUONAVOGLIA, C.(2002.): Prevalence of canine coronavirus antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay in dogs in the south of Italy. *J. Virol. Methods* 102: 67–71
51. PRATELLI, A., G. ELIA, V. MARTELLA, A. TINELLI, N. DECARO, F. MARSILIO, D. BUONAVOGLIA, M. TEMPESTA, AND C. BUONAVOGLIA.(2002.): M gene evolution of canine coronavirus in naturally infected dogs. *Vet. Rec.*151:758-761.
52. SAWICKI, S. G. i sur.(2005): Coronavirus Transcription: A Perspective. U: Coronavirus Replication and Reverse Genetics, 1st Edition (Enjuares,L., ur.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, str.31-55.
53. WESLEY, R.D. (1999.):The S gene of canine coronavirus, strain UCD-1, is more closely related to the S gene of transmissible gastroenteritis virus than to that of feline infectious peritonitis virus. *Virus Res.*, 61, 145–152.
54. WESLEY, R.D., (1999.): The S gene of canine coronavirus, strain UCD-1, is more closely related to the S gene of transmissible gastroenteritis virus than to that of feline infectious peritonitis virus. *Virus Res.* 61, 145–152.
55. WOO, P.C.Y., LAU, S.K.P., HUANG, Y., YUEN, K.Y., (2009.): Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med.* 234, 1117–1127
56. YOO DW, PARKER MD, BABIUK LA(1991): The S2 subunit of the spike glycoprotein of bovine coronavirus mediates membrane fusion in insect cells. *Virology* Jan;180(1):395-9.

57. ZHAO, L., JHA, B.K., WU, A., ELLIOTT, R., ZIEBUHR, J., GORBALENYA, A.E., (2012.): Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. *Cell Host Microbe* 11, 607–616.
58. ZICOLA A, JOLLY S, MATHIJS E, ZIANT D, DECARO N, MARI V, THIRY E. (2012.): Fatal outbreaks in dogs associated with pantropic canine coronavirus in France and Belgium. *J. Small Anim. Pract.* 53:297–300.



## 8. SAŽETAK

Pseći koronavirus prvi puta je opisan 1971. godine u Njemačkoj međutim opsežnija istraživanja životinjskih, pa tako i psećih, koronavirusa počinje tek nakon pojave SARS-a zbog spoznaje da većina ako ne i svi ljudski koronavirusi potječu od koronavirusa životinja. Sustavna istraživanja o proširenosti, epizootiologiji, genetičkoj raznolikosti kao i o kliničkom očitovanju infekcije koronavirusima u pasa na području RH nedostaju.

Istraživanjem je obuhvaćen 391 pas zaprimljenih na Kliniku za zarazne bolesti Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u razdoblju od 1. siječnja 2015. Do 1. kolovoza 2018. godine. Psi su pokazivali kliničke znakove akutnog gastroenteritisa, te su im uzorkovani obrisci rektuma za dokaz psećeg koronavirusa metodom lančane reakcije polimerazom. Za statističku obradu prikupljeni su podaci o nacionalu, anamnezi, kliničkoj slici, tijeku i ishodu liječenja.

Dobiveni rezultati, potvrdili su prevalenciju koronavirusnih infekcija od 35,81%, što govori u prilog slične distribucije virusa s ostalim zemljama Europe. No značajniji nalaz bio je dokaz cirkulacije CCoV IIa soja među inficiranim psima koji su izrazito virulentni, nastali mutacijama na S proteinu, te su nazvani pantropni sojevi.

Također važan podatak u epidemiološkom smislu je povećan broj inficiranih životinja mlađe dobi, koji proporcionalno pada sa starošću, što odgovara već uvriježenom mišljenju da su virusni gastroenteritisa bolesti mladih životinja. Populacija pasa u skloništima za životinje pokazivala je povećan rizik od infekcije zbog specifičnih uvjeta smještaja, i povećanu učestalost oboljelih životinja, u odnosu na one u privatnom vlasništvu.

Što se tiče kliničkog očitovanja infekcije statistička značajnost dokazana je samo u slučajevima krvavog proljeva, povraćanja i znacima oboljenja dišnog sustava, međutim nije bilo moguće uočiti niti izdvojiti specifičan klinički znak koji bi neosporno mogao potvrditi infekciju baš tim virusom. Po drugoj strani infekcija koronavirusima je produljila vrijeme hospitalizacije kod infekcija drugim virusnim patogenima probavnog sustava pasa što znatno povećava troškove liječenja. Ovo dodatno naglašava potrebu za dodatnim metodama za dokaz koronavirusnih infekcija u terenskim uvjetima.

## 9. SUMMARY

### PREVALENCE AND GENE POLYMORPHISM WITH CANINE CORONAVIRUS IN CROATIA

Canine coronavirus was first described during an outbreak in 1971. in Germany, however , more extensive research of animal and even canine coronaviruses begin only after the emergence of SARS due to recent elucidations that most if not all human coronaviruses seem to originate from animal coronaviruses. Comprehensive research on the prevalence, epizootiology, genetic diversity as well as the clinical manifestations of infection coronavirus of dogs in Croatia are missing.

The study included 391 dogs gathered from the Clinic for Infectious Diseases of the Institute of Microbiology and Infectious Diseases at the Clinic of Veterinary Medicine, University of Zagreb, in the period from January the first 2015 to October the first 2018. Dogs showed clinical signs of acute gastroenteritis, so rectal swabs from affected dogs were taken, and polymerase chain reaction method was used to diagnose the presence of the canine coronavirus. For statistical data analysis, age, breed and sex of dogs were collected, as well as, anamnesis, clinical findings, course and treatment outcome.

Results of seroprevalence studies confirmed the prevalence of coronavirus infections of 35.81%, which is in favor of a similar distribution of viruses within other countries of Europe. More striking finding was evidence of CCoV II a strain circulating among infected dogs, such strains, highly virulent, formed by S gene mutations, are called pantropic strains.

Coronavirus is widespread in the dog population however, increased number of infected animals were pups younger than 4 months, which is in line with the comprehension that viral gastroenteritis is a disease of young animals. The highest prevalence rates of infection are found in kenneled dogs, the risk of infection increased due to specific accommodation conditions, also this population showed an increased incidence of diseased animals compared to those in private ownership. Although statistical significance has been demonstrated only in cases of bloody

diarrhea, vomiting and signs of respiratory disease, it was not possible to abstract or identify a specific clinical sign that would undoubtedly confirm infection with the virus. It was further established, as it was assumed that coronavirus infection have prolonged the time of hospitalization in concurrent infections with other viral pathogens of the digestive system, which significantly increased the cost of treatment. This further emphasizes the need for additional methods to identify coronavirus infections in field conditions.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 17. rujna 1991. godine u Zagrebu gdje sam završila "OŠ Marina Držića", nakon koje upisujem "Nadbiskupsku klasičnu gimnaziju" u Zagrebu, koju sam pohađala od 2006. do 2010. godine. Iste te godine upisujem Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, te počinjem volontirati u Veterinarskoj stanici Oroslavje. Tokom cjelokupnog studija, radila sam različite studentske poslove. 2016. godine, pružila mi se prilika da kroz diplomski rad steknem nova znanja iz područja molekularne dijagnostike u virusološkom laboratoriju u sklopu Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, pod stručnim vodstvom mentora doc. dr. sc. Vladimira Stevanovića. Obveznu stručnu praksu odradila sam u Veterinarskoj stanici grada Zagreba.