

GENETSKA RAZNOLIKOST I EVOLUCIJA PROTOPARVOVIRUSA-1 MESOJEDA U MAČAKA

Vukelić Dasović, Nina

Professional thesis / Završni specijalistički

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:178:048338>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Nina Vukelić Dasović
GENETSKA RAZNOLIKOST I EVOLUCIJA
PROTOPARVOVIRUSA-1 MESOJEDA U MAČAKA
Specijalistički rad

Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Nina Vukelić Dasović

GENETSKA RAZNOLIKOST I EVOLUCIJA
PROTOPARVOVIRUSA-1 MESOJEDA U MAČAKA

Specijalistički rad

Zagreb, 2021.

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Vladimir Stevanović

Specijalistički rad obranjen je dana 10. veljače 2022. na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Nevenka Rudan
2. prof. dr. sc. Ljubo Barbić
3. akademik, prof. emeritus Josip Madić (vanjski član)

Rad ima 75 stranica.

Predgovor

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

Ovim putem posebno zahvaljujem mentoru izv.prof.dr.sc. Vladimiru Stevanoviću na prenesenom znanju, inovativnosti i savjetima, te doc. dr. sc. Maji Maurić Maljković na odrađenom velikom poslu statističke obrade podataka i pojašnjenjima.

Od srca hvala voditeljici studija prof. dr. sc. Nevenki Rudan na podršci, ohrabrivanju i svim lijepim riječima tijekom ovih godina. Velika hvala dr. sc. Snježani Kovač, Kristini Kovač i Alenki Škrinjarić na strpljenju i svemu što su me naučile o radu u laboratoriju.

Posebna zahvala mojem fantastičnom triju i svim vidljivim i nevidljivim suputnicima na životnim stazama bez kojih se ova dugogodišnja želja ne bi ostvarila.

SAŽETAK

U razdoblju od 2015. do 2020. godine sa Klinike za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prikupljeno je 211 obrisaka rektuma i uzoraka izmeta mačaka koje su pokazivale znakove akutnog gastroenteritisa. Za sve životinje prikupljeni su i podaci o nacionalu, anamnezi, kliničkoj slici, tijeku i ishodu liječenja. U uzorcima je dokazivana prisutnost sojeva CPPV-1 metodom lančane reakcije polimeraze. Rezultati pretrage dali su uvid u prevalenciju zarazne panleukopenije mačaka u životinja koje su pokazivale kliničke znakove akutnog gastroenteritisa na području grada Zagreba, te ona iznosi 61,61% sa stopom preživljavanja od 55,55%. Nakon određivanja nukleotidnog slijeda umnoženih odsječaka genoma ustanovljeno je kako su u populaciji mačaka na području grada Zagreba prisutna oba soja CPPV-1, (FPV 73,33%, CPV-2 22,67%). Dokazano je kako tip virusa CPV-2c dominira sa 76,47%, dok se CPV-2c nalazio u 11,76% uzoraka, za 11,76% uzoraka nije bilo rezultata. Anamnestičkim podacima prikupljenim prilikom prvog pregleda ustanovljeno je da su mlađe životinje češće oboljevale od soja FPV (prosjeak od 0,79 godina), dok je soj CPV-2 bio češći kod starijih životinja sa prosjekom od 4,5 godine. Krvna slika pokazala je značajnu eozinopeniju i trombocitopeniju u krvi pozitivnih mačaka. Kod FPV soja ustanovljene su izmjene aminokiselina na pozicijama 91, 232, 303 (mjesto vezanja protutijela) i 562 (neizravno uzrokuje promjene u konformaciji). Filogenetskom analizom stabla dobivene su lokalna i međunarodna skupina, što se može objasniti postojanjem univerzalnog modela evolucije nastalog zbog globalizacije, pa su tako sojevi s različitih kontinenata međusobno slični.

Ključne riječi: zarazna panleukopenija mačaka, protoparvovirus-1 mesojeda, čimbenici rizika, klinička slika, molekularna epizootiologija

SUMMARY

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Feline panleukopenia (FPL) is a very common clinical disease syndrome in cats caused by infection with Carnivore protoparvovirus-1, it is also the oldest known viral disease in cats. Both feline parvovirus (FPV) and canine parvovirus (CPV-2) can cause FPL. Kittens usually die within the mortality rate of 90% despite vaccination. So far no research on CPPV-1 prevalence and epizootiology in cats in the Republic of Croatia has been done.

The aim of this study was: 1) To collect the data on the prevalence of CPPV-1 strains on the territory of the Republic of Croatia, to determine risk factors and clinical manifestations of infection to facilitate the identification of infection and targeted treatment by veterinary practitioners. 2) Phylogenetic analysis of the virus, which has not been conducted in our country so far to provide insight into the molecular epizootiology of infection with feline panleukopenia. 3) Determining the direction of CPPV-1 evolution in cats and the significance of the amino acid alterations of viral proteins for the pathogenicity and efficacy of immunoprophylaxis.

MATERIAL AND METHODS

During the period from 2015 to 2020, 211 rectal swabs and fecal samples of cats that showed signs of acute gastroenteritis were collected from the Clinic for Infectious Diseases of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. Along with the fecal samples, data on medical history, clinical picture, course, and treatment outcome were collected for all the animals included in this study. The presence of CPPV-1 strains in fecal samples or rectal swabs was detected with the polymerase chain reaction. Determination of the nucleotide sequence of amplified sections of the genome was done by MEGA 7 software.

RESULTS

The overall prevalence of feline panleukopenia in cats that showed clinical signs of acute gastroenteritis in the city of Zagreb was 61.61% with a survival rate of 55,55%. It was proven that both strains of CPPV-1 were present in the cat population in the city of Zagreb (FPV=73.33%, CPV-2=22.67%). Furthermore, CPV-2c virus type was shown to dominate with 76.47%, while CPV-2c was found in 11.76% of samples and 11,76% had no results of virus type. Data on the disease history collected during the first examination revealed that younger animals were more likely to be infected with the FPV strain (average of 0.79 years), while the CPV-2 strain was more common in older animals (average of 4.5 years). CBC showed statistically significant eosinopenia as well as significantly reduced platelet counts in positive cats. In FPV strains, amino acid changes were found at positions 91, 232, 303 (receptor binding sites) and position 562 which might indirectly cause surface conformational changes. Phylogenetic analysis of the tree gave us two large groups, local and international, which can be explained by a universal model of evolution caused by globalization, that makes strains from different continents similar to each other.

CONCLUSIONS

The prevalence of 61,61% of CPPV-1 in the city of Zagreb was high and it was consistent with all the published results in other countries. The percentage of CPV-2 strains (22,67%) among the positive samples was higher than expected. Significant eosinopenia, as well as significantly reduced platelet counts in the CBC of positive cats, could serve for diagnostic purposes. In FPV strains, amino acid changes were found at positions 91, 232, 303, and 562. Amino acid residues 91, 232, and 303 are antibody binding sites, while amino acid residue 562 might indirectly cause surface conformational changes. Phylogenetic analysis of the tree provided insight into the

distribution of sequences into two large groups, local and international, which can be explained by the existence of a universal model of evolution as a result of globalization, so strains from different continents are similar to each other.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Uvod.....	1
1.2. Pregled područja istraživanja.....	3
1.2.1. Povijest.....	3
1.2.2. Taksonomija.....	4
1.2.3. Građa virusne čestice.....	4
1.2.4. Građa genoma.....	8
1.2.5. Tenacitet.....	8
1.2.6. Epizootiologija.....	9
1.2.7. Patogeneza.....	10
1.2.8. Klinička slika.....	11
1.2.9. Patoanatomski i patohistološki nalaz.....	12
1.2.10. Dijagnostika.....	13
1.2.11. Terapija.....	14
1.2.12. Imunoprofilaksa.....	15
1.2.13. Javno zdravstvo.....	16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	17
3. MATERIJAL I METODE	18
3.1. Uzorkovanje.....	18
3.2. Molekularna metoda dokaza uzročnika.....	19
3.2.1. Priprema uzorka.....	19

3.2.2. Izdvajanje virusne DNK.....	20
3.2.3. Postupak izvođenja pretrage lančane reakcije polimerazom (PCR).....	20
3.2.4. Elektroforeza u gelu.....	22
3.2.4.1. Priprema TAE pufera.....	23
3.2.4.2. Priprema gela.....	23
3.2.5. Nanošenje uzoraka u gel i postupak elektroforeze.....	24
3.3. Određivanje nukleotidnog slijeda proizvoda PCR-a.....	25
3.4. Statistička obrada podataka.....	26
4. REZULTATI.....	27
5. RASPRAVA.....	41
6. ZAKLJUČCI.....	50
7. LITERATURA.....	52
8. ŽIVOTOPIS.....	64

PRILOZI

Slike:

Slika 1. Vanjski prikaz virusne čestice CPV-2.

Slika 2. Dijagram vrpce koji prikazuje topologiju VP-2 FPV-a i njegove sekundarne strukture.

Slika 3. Virus panleukopenije mačaka kao uzročnik teškog enteritisa.

Slika 4. Prikaz produkta PCR reakcije izvedene početnicama za sekvenciranje

Slika 5. Zastupljenost sojeva protoparvovirusa-1 mesojeda u mačaka na području grada Zagreb

Slika 6. Neki od anamnestičkih podataka pozitivnih mačaka na prvom prijemu

Slika 7. Medijan vrijednosti leukocita u pozitivnih i negativnih mačaka izražen u $10^9/L$

Slika 8. Srednja vrijednost trombocita u pozitivnih mačaka izražena u $10^9/L$

Slika 9. Rasprostranjenost sojeva CPPV-1 u mačaka na području grada Zagreba u periodu od 2015. do 2020. godine

Slika 10. Kretanje sojeva CPPV-1 u mačaka na području grada Zagreba unutar kalendarske godine u periodu od 2015. do 2020. godine

Slika 11. Mjesečna prevalencija pozitivnih uzoraka u periodu od 2015. do 2020. godine

Slika 12. Filogenetsko stablo CPPV-1 sojeva

Tablice:

Tablica 1. Razlika u aminokiselinskom sastavu između CPV-a i FPV-a.

Tablica 2. Podaci o životinjama upotrebljavani u statističkoj obradi.

Tablica 3. Podaci korišteni u procjeni kliničkog skora.

Tablica 4. Sadržaj kompleta QIAamp DNA Mini Kit

Tablica 5. Upotrebljene početnice za umnažanje odsječka genoma FPV i CPV-2.

Tablica 6. Sastav reakcijske smjese za izvođenje PCR metode.

Tablica 7. Utjecaj sojeva CPPV-1 na ispitivane čimbenike rizika, kliničku sliku i ishod bolesti u mačaka na području grada Zagreba

Tablica 8. Uzorci FPV-a koji pripadaju skupini World 1962-2020

Tablica 9. Uzorci FPV-a koji pripadaju skupini HR-IT 2006-2020

Tablica 10. Uzorci FPV-a koji pripadaju skupini Vaccinal 1962-2020

Tablica 11. Uzorci FPV-a koji pripadaju skupini Europe 2005-2020

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. UVOD

Carnivore protoparvovirus-1 (CPPV-1), uzročnik zarazne panleukopenije mačaka (zaraznog mačjeg enteritisa), pripada porodici *Parvoviridae* (VERGE i CHRISTOFORONI, 1928.). Virus je, kao uzročnik bolesti kod mačaka, poznat još od 1920-ih godina (VERGE i CHRISTOFORONI, 1928.; MIRANDA i sur., 2016.). Zarazna panleukopenija je jedna od najvažnijih mačjih zaraznih bolesti današnjice, koja je unatoč cijepljenju vrlo česta, posebice u mačića kod kojih doseže smrtnosti i do 90% (GREENE, 2012.). Naziv porodice, kojoj pripada uzročnik, potječe od latinske riječi *parvus*, što znači malen (MARKEY i sur., 2013.). Kako i samo ime govori, virus je malen, serološki jedinstven, te sadrži linearnu jednolančanu deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) (GREENE, 2012.). Rodu protoparvovirus-1 mesojeda pripadaju sojevi virusa panleukopenije mačaka (eng. *feline panleukopenia virus*, FPV) i sojevi psećeg parvovirusa-2 (eng. *canine parvovirus-2*, CPV-2) (COTMORE i sur., 2014.). Parvovirusi u domaćih mačaka (*Felis catus*) i drugih mesojeda, poput američkog nerca (*Neovison vison*) i rakuna (*Procyon lotor*), poznati su dugi niz godina, te su općenito opisani kao virus panleukopenije mačaka (FPV) ili njegove bliske varijante (ALLISON i sur., 2014.). Pseći parvovirus pojavljuje se 1970-ih godina kao novi virus koji je za razliku od FPV-a sposoban inficirati pse, vukove i kojote (PARRISH i sur., 1985.; ALLISON i sur., 2014.) uzrokujući najvažniju zaraznu bolest pasa današnjice, parvovirusnu infekciju pasa (GREENE, 2012.). Velika sklonost protoparvovirusa-1 mesojeda mutacijama bila je vidljiva već godinu dana nakon prvog opisa CPV-2, naime, javlja se soj CPV-2a, jednim dijelom i zbog masovnog cijepljenja pasa radi teške kliničke slike bolesti (BUONAVOGLIA i sur., 2001.). Tijekom desetljeća sojevi CPV-2 dodatno su evoluirali, te trenutno svijetom cirkuliraju mnoge njegove antigenske i genske varijante (PARRISH i sur., 1995.). Značajno je da se mačke mogu

inficirati s oba soja CPPV-1, u 95% slučajeva uzročnik je FPV, a u 5% CPV, te pogotovo njegovi podtipovi CPV-2a, b i c (BARRS, 2019.). Spektar domaćina za pojedini soj određuje kapsidni protein VP2 koji obuhvaća 90% virusne kapside i odgovoran je za interakciju virusa sa staničnim receptorima, što ga čini glavnim nositeljem virusnih antigenskih svojstava (PARRISH i sur., 1991.; TRUYEN i sur., 1996a) Podaci o CPV-2 soju daleko su opsežniji od onih o FPV soju, pa su do sada opisane brojne aminokiselinske izmjene u unutrašnjosti virusa, te na njegovoj kapsidi (DECARO i sur., 2008.; BATTILANI i sur., 2011.; MIRANDA i sur., 2016.).

1.2 PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.2.1. POVIJEST

Zarazna panleukopenija mačaka najstarija je poznata virusna bolest mačaka, te je moguće da datira još iz 1800-ih godina (FAIRWATER, 1876.; SCOTT, 1987.; BARRS, 2019.). Tijekom prvih desetak godina 20. stoljeća prijavljen je niz slučajeva zaraznog enteritisa mačaka s visokom smrtnošću i sezonskom pojavnošću (LEASURE, 1934.). Prva uspješna cijepljenja mačaka opisana su 1934. godine, samo šest godina nakon što je virus identificiran kao uzročnik bolesti (VERGE, 1928.; LEASURE, 1934.). Cijepljenje se provodilo korištenjem formalin inaktiviranih tkivnih ekstrakata zaraženih mačaka (LEASURE, 1934.). Virus je uspješno izoliran na kulturi stanica 1964. godine, što je dovelo do razvoja inaktiviranih i modificiranih živih cjepiva (eng. *modified live vaccines*, MLV) (POVEY, 1973.). Zahvaljujući toj činjenici, u Ujedinjenom Kraljevstvu u periodu od 1973. do 2016. godine zabilježen je veliki porast primovakcinacije mačića od strane vlasnika, s 18% na čak 82% (POVEY, 1973.). Sljedećih desetljeća zarazna panleukopenija mačaka postala je vrlo rijetka dijagnoza u veterinarskim klinikama diljem Ujedinjenog Kraljevstva, Australije, Novog Zelanda i Sjedinjenih Američkih Država, uz sporadično pojavljivanje u skloništima za divlje životinje (BARRS, 2019.). Zadnjih nekoliko godina bilježi se njena reemergentnost među populacijom necijepljenih mačaka iz skloništa za nezbrinute životinje diljem Australije (BARRS, 2019.). Tijekom pandemije psećeg parvovirusa među populacijom pasa 1970-ih godina, genetskom analizom uzročnika bolesti, otkriveno je kako je vrlo usko povezan s virusom panleukopenije mačaka (99% nukleotidne podudarnosti) koji inače nije zarazan za pse (CHANG i sur., 1992.; TRUYEN i PARISH 1992.; ALLISON i sur., 2015.). Sposobnost CPV-2 da inficira pse i proširi se psećom populacijom proizašla je iz mutacija u genu za kapsidni protein koje su virusu omogućile vezanje na transferinske receptore tipa 1 (eng. *transferrin type-1 receptor*, TfR)

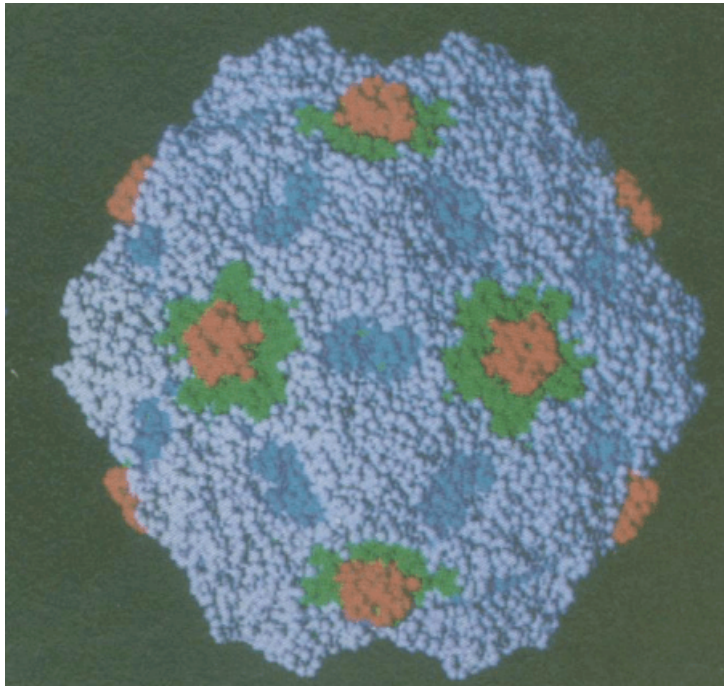
psećih stanica (PARKER i sur., 2001.; GOVINDASAMY i sur., 2003.; ALLISON i sur., 2015.).

1.2.2. TAKSONOMIJA I KLASIFIKACIJA

Protoparvovirus-1 mesojeda (*Carnivore protoparvovirus-1*, CPPV-1) pripada rodu *Protoparvovirus*, porodici *Parvoviridae* koja obuhvaća dvije potporodice: potporodicu *Parvovirinae* koji inficiraju kralježnjake i potporodicu *Densovirinae* koji se javljaju kod kukaca. Taksonomija parovovirusa može biti zbunjujuća s obzirom na to da jedna životinjska vrsta može biti domaćin više vrsta parovovirusa, pa su oni taksonomski grupirani u rodove prema njihovim molekularnim značajkama, a ne prema vrsti domaćina. Potporodici *Parvovirinae* pripada pet rodova: *Protoparvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* i *Bocavirus* (MACLACHLAN i DUBOVI, 2011.). Protoparvovirus-1 mesojeda obuhvaća dva soja virusa, virus panleukopenije mačaka (eng. *feline panleukopenia virus*, FPV) i pseći parvovirus-2 (eng. *canine parvovirus-2*, CPV-2) (COTMORE i sur., 2014.). Oba soja su sposobna inficirati domaću mačku, te izazvati zaraznu panleukopeniju mačaka (BARRS, 2019.).

1.2.3. GRADA VIRUSNE ČESTICE

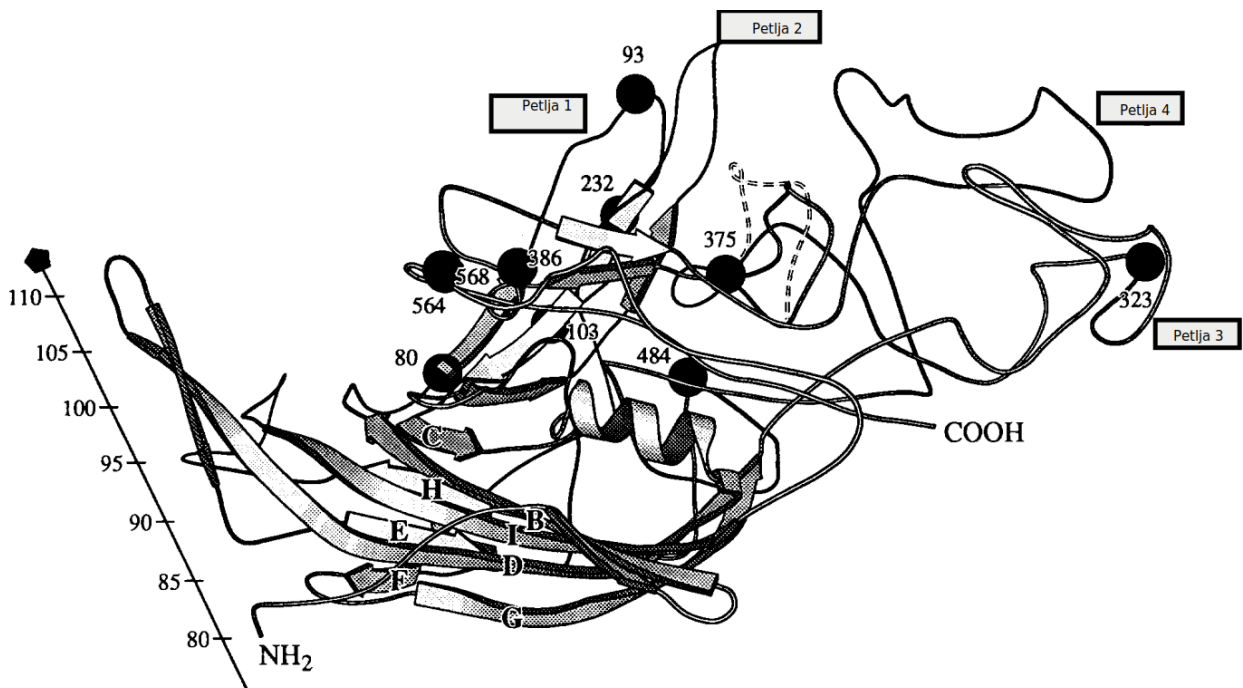
Parvovirusi su vrlo mali, što govori i sam naziv virusa koji potječe od latinske riječi *parvus*, malen. Promjera su 25 nm, nemaju ovojnicu, te su ikozaedralne simetrije. Posjeduju jednolančanu linearnu DNK. Kapsida na svojoj površini sadrži brojne elemente koji su usko povezani s njenom funkcijom (Slika 1.).



Slika 1. Vanjski prikaz virusne čestice CPV-2. Zelenom bojom označena su područja beta ploča, svjetlo plava boja predstavlja područja koja čine trnaste izdanke (trostruka os simetrije), crvena su područja koja čine peterostruke cilindrične izdanke i tamnoplava područja označavaju udubine na dvostrukoj osi simetrije. Prilagođeno iz TSAO i sur., 1991.

Mjesto prepoznavanja receptora mačjih i psećih stanica, koje određuje njihovog domaćina i tkivni tropizam, nalazi se u kanjonu, a mjesta vezanja većine protutijela su aminokiselinski ostaci šiljastih izdanaka na trostrukim osima simetrije. Kapsida parvovirusa sastoji se od kombinacije ukupno 60 proteinskih molekula: VP1, VP2 (čini 90% kapside) i VP3. VP1 i VP2 nastaju spajanjem iste glasničke ribonukleinske kiseline (eng. *messenger ribonucleic acid* - mRNA) i čitava sekvenca VP2 kodirana je unutar VP1 gena. Treći strukturni protein VP3 (nalazi se samo u kapsidi koja sadrži DNK) nastaje cijepanjem peptida iz amino kraja VP2 (MACLACHLAN i DUBOVI, 2011.). Gradivne podjedinice kapside nastaju kombiniranjem VP1 i VP2 proteina, što je vidljivo pod elektronskim mikroskopom (TSAO i sur., 1991.; ALLISON i sur., 2014.).

Svaka podjedinica sastoji se od osam beta ploča međusobno povezanih s četiri petlje. Kanjoni, za koje se smatra da su mjesta vezanja na stanične receptore, su udubine koje tvore beta ploče uz peterostruke osi simetrije na površini virusa (TSAO i sur., 1991.; TRUYEN i sur., 1995.; HUEFFER i PARRISH, 2003.; NAKAMURA i sur., 2004.) (Slika 2.). Površina virusne kapside sadrži još manje cilindrične izdanke na peterostrukim osima simetrije i mala udubljenja na dvostrukim osima simetrije. Njihova bi uloga mogla biti činjenje kanjona još nedostupnijim za protutijela (TSAO i sur., 1991.).



Slika 2. Dijagram vrpce koji prikazuje topologiju VP-2 FPV-a i njegove sekundarne strukture. Isprekidana linija označava prostorni oblik petlje CPV-a između ostataka 358 i 374. Crne točke prikazuju mjesta deset amino kiselina koje razlikuju ova dva virusa. Prilagođeno iz Agbandje i sur., 1993.

Smatra se da je imunoprofilaksa pseće parvoviroze barem jednim dijelom dovela do pojave novog podtipa virusa CPV-2a koji se od CPV-2 razlikuje u pet aminokiselinskih promjena na VP2 genu: Met87Leu, Ile101Thr, Ala300Gly, Asp305Tyr, Val555Ile. Četiri navedene aminokiseline sudjeluju u građi izdanaka za koje se smatra da su mjesta vezanja protutijela, te je tako novi podtip djelomično uspio izbjeći imunski odgovor domaćina (ZHOU i sur., 2017.). Pseći parvovirus-2b (CPV-2b) od CPV-2a razlikuje se u izmjeni dviju aminokiselina, Asn na 426. mjestu u Asp, te je Ile na 555. mjestu promijenjen u Val, kao i u izvornom CPV-2 (PARRISH i sur., 1991.). Pseći parvovirus-2c je najnoviji podtip te se naknadnim istraživanjem dokazalo kako se od prva dva tipa razlikuje u aminokiselinskim izmjenama na 426. mjestu (Glu umjesto Asn) i 300. mjestu (Gly umjesto Asp) (IKEDA i sur., 2000.; BUONAVOGLIA i sur., 2001.). Kod CPV-2a i CPV-2b došlo je i do novih aminokiselinskih izmjena i to na položaju 297 i 300 pri kojima dolazi do izmjene Ser297Ala i Gly300Asp (ZHOU i sur., 2017.). Aminokiselinski ostatak na 297. mjestu utječe na antigenska svojstva virusa, a na 300. mjestu utječe na mogućnost umnažanja virusa u različitim vrsta domaćina i stabilnost kapside (TSAO i sur., 1991.; PARKER i PARRISH, 1997.; TRUYEN, 2006.). Razlike u aminokiselinskom sastavu između CPV-a i FPV-a opisane su u tablici 1.

Tablica 1. Razlika u aminokiselinskom sastavu između CPV-a i FPV-a. Pozicije na strukturi FPV-a prikazuju površinske (Po) i dubinske (Do) ostatke. Prilagođeno iz Agbandje i sur., 1993.

	Broj sekvence aminokiseline									
	80	93	103	232	323	375	386	484	564	568
CPV	R	N	A	I	N	N	K	V	S	G
FPV	K	K	V	V	D	D	Q	I	N	A
Pozicija na strukturi	Do	Po	Do	Po	Po	Do	Po	Do	Po	Do
FPV-a	Petlja 1	Petlja 1	Petlja 1	Petlja 2	Petlja 3	Petlje 3-4	Petlje 3-4	Petlja 4	C-kraj	C-kraj

1.2.4. GRADA GENOMA

Genom parvovirusa veličine je otprilike 4,5 do 5,5 tisuća baznih parova (bp); NS1 regija obuhvaća dio od 273. do 2279. mjesta, VP1 od 2286. do 2317. i 2390. do 4541., te se nalazi unutar VP2 proteina koji se prostire od 2787. do 4541. mjesta. Neki parvovirusi posjeduju samo negativnu jednolančanu DNK unutar kapside (pseći parvovirus, minutni virus miševa). Drugi sadrže različite omjere pozitivnih i negativnih lanaca, pa tako pojedini virioni ovih virusa mogu sadržavati jednolančanu DNK oba polariteta. Genom ima dva glavna otvorena okvira čitanja (eng. *open reading frame*, ORF) (MACLACHLAN i DUBOVI, 2011.). Otvoreni okvir čitanja na 3' kraju genoma kodira nestrukturalne proteine potrebne za transkripciju i replikaciju DNK (NS1 i NS2), a otvoreni okvir čitanja na 5' kraju kodira strukturalne proteine kapside (VP1 i VP2) (MUZYCZKA i sur., 2001.). U članova potporodice *Parvovirinae* oba okvira za čitanje prisutna su na istom lancu DNK. Genom ima terminalne palindromske sekvence koje omogućuju formiranje ukosnice na svakom kraju ili formiranje neke druge složene strukture potrebne za replikacija virusa (MACLACHLAN i DUBOVI, 2011.).

1.2.5. TENACITET

Virus panleukopenije mačaka (FPV) je vrlo stabilan i može preživjeti godinu dana na sobnoj temperaturi u organskom materijalu (GREENE, 2012.). U okolišu parvovirusi mogu preživjeti i do godinu dana (NANDI i KUMAR, 2010.), međutim, vrućina, suša u ljetnim mjesecima ili uklanjanje organskog debrisa ubrzava njegovu inaktivaciju. FPV odolijeva zagrijavanju na 56°C tijekom 30 minuta i uspijeva se održati dulje vrijeme na nižim temperaturama. Virus preživljava dezinfekciju sa 70% alkoholom i raznim razrijeđenjima organskog joda, fenola i kvaternarnog amonijevog spoja. Parvovirusi poput FPV-a inaktiviraju se razrijeđenim izbjeljivačem (5,25%

natrijevim hipokloritom), 4% formaldehidom, peroctenom kiselinom, natrijevim hidroksidom (0,1 M pri pH od 12,8 ili višem) i 1% glutaraldehidom tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Za dezinfekciju toplinom potrebne su temperature od najmanje 90°C tijekom deset minuta (GREENE, 2012.).

1.2.6. EPIZOOTIOLOGIJA

Zarazna panleukopenija mačaka je visoko kontagiozna, vrlo često fatalna, virusna zarazna bolest domaćih i divljih felida (GREENE, 2012.). Ulazna vrata virusa su kroz oronazalnu sluznicu, a virus cilja brzodijeleće stanice, posebice epitel kriпти tankog crijeva, limfoidno tkivo i koštanu srž (GASKELL i sur., 1996., CAVE i sur. 2002., GREENE i sur., 2006.; AWAD i sur., 2019.). Najčešći prijenos virusa je neizravnim putem zbog njegovog kratkog perioda izlučivanja (jedan do dva dana, a mokraćom i šest tjedana nakon oporavka od bolesti) posrednim kontaktom prijemljivih životinja sa onečišćenom okolinom (GREENE, 2012.). Životinje u aktivnom stadiju bolesti virus izlučuju putem mokraće, povraćanog sadržaja, sline, a najviše izmetom. Virus je vrlo stabilan u okolišu (MACLACHLAN i DUBOVI, 2011.). Prijenos se vjerojatno događa i mehanički preko buha i drugih insekata tijekom toplih mjeseci (GREENE, 2012.). Protoparvovirus-1 mesojeda u mačaka proširen je diljem svijeta s različitom zastupljenošću sojeva i podtipova. Istraživanje provedeno u Australiji 2019. godine pokazalo je kako je zarazna panleukopenija mačaka u 90% slučajeva uzrokovana virusom panleukopenije mačaka (FPV), a tek 5% slučajeva bolesti rezultat su infekcije mačaka varijantama psećeg parvovirusa (CPV), konkretno podtipovima CPV-2a, b i c (BARRS, 2019.). Balboni i suradnici (2018.) proveli su istraživanje među populacijom asimptomatskih mačaka na Sardiniji (Italija) uzimajući uzorke krzna od 54 mačke koje su pretražili lančanom reakcijom polimeraze (*eng. polymerase chain reaction*, PCR) na prisutnost FPV i CPV.

Od devet mačaka kod kojih je parvovirus pronađen na njihovom krznu, kod četiri je dokazana prisutnost DNK virusa panleukopenije mačaka, četiri su bile pozitivne na DNK psećeg parvovirusa (tri CPV-2b i jedna CPV-2c), a jedna je mačka bila pozitivna na oba soja.

1.2.7. PATOGENEZA

Nakon ulaska virusa u organizam kroz orofarinks, dolazi do početne replikacije virusa u limfnom tkivu ždrijela 18 do 24 sata nakon infekcije. Nakon dva do sedam dana nastaje viremija i virus prelazi u druge organe i tkiva (MACLACHLAN i DUBOVI, 2011.; STUETZER i HARTMANN, 2014.; PFANKUTCHE i sur, 2018.; .). S obzirom na to da parvovirusi iziskuju prisutnost stanične DNK polimeraze, za uspješnu infekciju FPV-u su potrebne brzo dijeleće stanice u S-fazi dijeljenja. Stoga su oštećenja najprisutnija u tkivima s najvećom mitotičkom aktivnošću (GREENE, 2012.). Limfoidno tkivo, koštana srž i kripte crijevne sluznice najčešće su napadnuti kod odraslih životinja. Kasne prenatalne i rane neonatalne infekcije kod mačaka završavaju oštećenjima limfoidne i koštane srži, ali i središnjeg živčanog sustava, uključujući veliki mozak, mali mozak, mrežnicu i očne živce (GREENE, 2012.). Panleukopenija je upečatljiva značajka mnogih infekcija virusom panleukopenije mačaka gdje se ukupan broj bijelih krvnih stanica i broj neutrofila znatno smanjuje. Broj limfocita također bilježi pad, iako u manjem stupnju, a utjecaj virusa na eozinofile, bazofile, monocite ili eritrocite je mali (LAWRENCE i SYVERTON, 1938.; HAMMON i ENDERS, 1939a,b; LAWRENCE i sur., 1940.; ROHOVSKY i GRIESEMER, 1967.; REYNOLDS, 1969.; ICHIJO i sur., 1976.; LARSEN i sur., 1976.; CARLSON i SCOTT, 1977.; HOSOKAWA i sur., 1987.; PARRISH, 1995.).

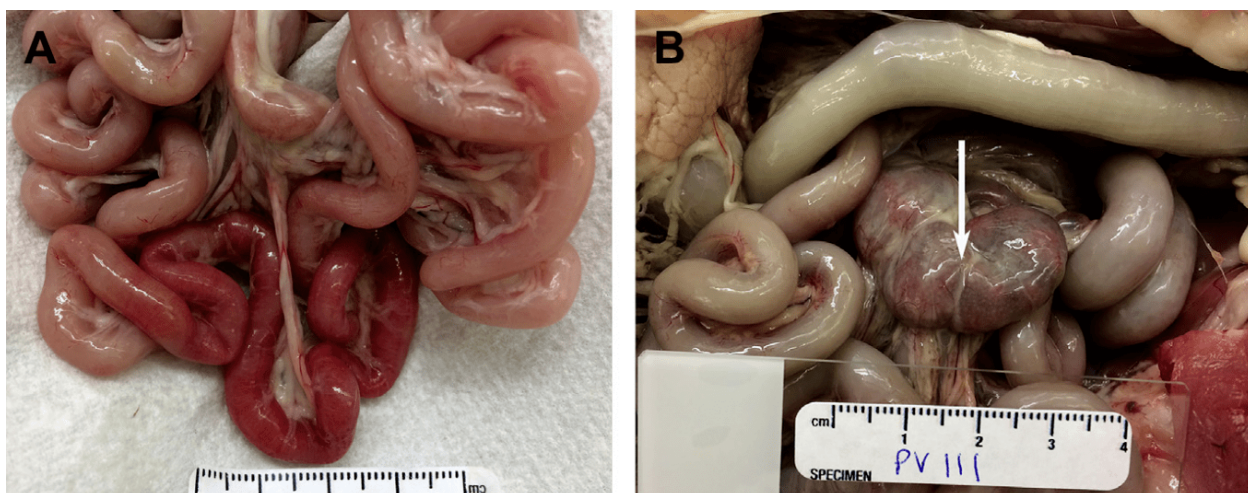
1.2.8. KLINIČKA SLIKA

Bolest se klinički manifestira teškom depresijom, povraćanjem, dehidracijom i proljevom, te često fatalnim završetkom (GASKELL i sur., 1996.; CAVE i sur., 2002.; GREENE i sur., 2006.; AWAD i sur., 2018.). Mačići koji nisu cijepljeni zaštićeni su majčinim protutijelima dobivenim kolostrumom do trećeg mjeseca starosti. Većina infekcija je subklinička, o čemu govori podatak o pronalasku protutijela kod 75% necijepljenih i asimptomatskih mačaka do prve godine života.

Mačke koje obole obično su mlađe od jedne godine. Perakutno životinje mogu iznenada uginuti bez kliničkih znakova bolesti. U akutnoj fazi bolesti javlja se vrućica (40°C – $41,7^{\circ}\text{C}$), depresija i anoreksija nakon razdoblja inkubacije od dva do sedam dana. Povraćanje se obično razvije jedan do dva dana nakon početka vrućice, povraćani sadržaj uključuje prisustvo žuči i nije povezan s jelom. Proljev može započeti malo kasnije, ali ne mora biti uvijek prisutan. Brzo se razvija izrazita dehidracija. Bolesne mačke mogu satima sjediti pokraj posude s vodom, iako ju ne piju. Životinje u terminalnoj fazi bolesti su pothlađene i mogu razviti septički šok i diseminiranu intravaskularnu koagulaciju. Pregledom se obično nalazi duboka depresija, dehidracija, a ponekad i bolovi u trbuhu. Palpacija abdomena, koja može potaknuti trenutno povraćanje, može otkriti zadebljale crijevne petlje i povećane mezenterične limfne čvorove. U slučajevima hipoplazije malog mozga, kod prenatalne infekcije, uočavaju se ataksija i tremor s normalnom mentacijom (SQUIRES, 2013.). Oštećenja mrežnice, ako su prisutna, izgledaju kao diskretna siva žarišta. Trajanje ove bolesti rijetko je duže od pet do sedam dana. Smrtnost je najveća u mačića u dobi mlađoj od pet mjeseci (SQUIRES, 2013.).

1.2.9. PATOANATOMSKI I PTOHISTOLOŠKI NALAZ

Zbog djelovanja virusa na stanice koštane srži analiza krvi pokazuje panleukopeniju (MCGAVIN i ZACHARY, 2008.; MIHOKOVIĆ BUHIN i sur., 2019.). Veće patološko-anatomske promjene vidljive golim okom, prilikom prvog pregleda lešine, u prirodno zaraženih mačaka obično su vrlo male. Na površini jezika mogu se naći žarišne ulceracije. Crijevni trakt je vidno proširen: petlje crijeva su čvrste i mogu biti hiperemične s petehijalnim i ekhilotičnim krvarenjima na seroznim površinama (Slika 3.). Kada je prisutna krv u sadržaju crijeva, on obično ima smrdljiv miris. Prenatalno zaražene mačke mogu imati malen mali mozak, hidrocefalus ili hidranencefaliju. Atrofija timusa je prisutna u svih zaraženih novorođenih mačića (GREENE, 2012.). Patohistološki glavne lezije pronađene su u crijevima, koštanoj srži i limfoidnim organima. Lezije crijeva karakterizirane su degenerativnim promjenama popraćenim pojavom intranuklearnih inkluzija u epitelnim stanicama kripti. U koštanoj srži i limfoidnim organima uočena je hipoplazija, degeneracija parenhima i aktivacija retikuloendotelnog sustava. Intranuklearna inkluzijska tijela povremeno su pronađena također u retikularnim i parenhimskim stanicama koštane srži, limfoidnih organa, jetre, nadbubrežnih žlijezda i gušterače (DOI i sur., 1975.) In situ hibridizacijom potvrđena je prisutnost virusne DNK unutar vakuoliziranih neurona središnjeg živčanog što govori da se FPV može smatrati uzrokom vakuolizacije neurona u mačaka s ataksijom (PFANKUCHE i sur., 2018.).



Slika 3. (A) Virus panleukopenije mačaka kao uzročnik teškog enteritisa. (B) Povećanje mezenterijalnog limfnog čvora. Prilagođeno iz Barrs, 2019.

1.2.10. DIJAGNOSTIKA

Rano otkrivanje virusa pouzdanim dijagnostičkim metodama od presudne je važnosti kako bi se bolesne mačke mogle što prije početi liječiti, ali i odvojiti od zdravih, pogotovo u veterinarskim ambulantama gdje se nalaze druge bolesne i imunokompromitirane životinje (NEUERER i sur., 2008.). Posljednjih godina na tržištu su prisutni *in-house* testovi za detekciju fekalnog antigena psećeg parvovirusa i/ili virusa panleukopenije mačaka. Ti se testovi baziraju na imunoenzimnom testu (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) i imunokromatografiji. Bliska strukturalna i antigenska veza između sojeva protoparvovirusa-1 mesojeda CPV-a i FPV-a omogućuje upotrebu istog dijagnostičkog kita na psima i mačkama (MOCHIZUKI i AKABOSHI, 1988.; PARRISH, 1991.; NEUERER i sur., 2008.). Kitovi imaju ograničenu dijagnostičku vrijednost kod dokaza protutijela s obzirom na to da ne razlikuju protutijela nastala kao posljedica infekcije od onih izazvanih cijepljenjem (FISCUS i sur., 1985.; HOFMANN-LEHMANN i sur., 1996.; TRUYEN i sur., 2009.). Zarazna panleukopenija mačaka može se dijagnosticirati i izolacijom virusa iz krvi ili

izmeta u kulturi stanica CrFK (eng. *Crandell-Rees Feline Kidney*) ili MYA-1 (Miyazawa-1, linijske stanice mačjih T-limfoblastoida), te dokazom hemaglutinacije eritrocita svinje, no te metode se danas vrlo rijetko koriste u rutinskoj dijagnostici (GOTO i sur., 1975.; MIYAZAWA i sur., 1999.; TRUYEN i sur., 2009.). Dijagnostika elektronskim mikroskopom izgubila je na važnosti zbog svoje sporosti, te zbog postojanja drugih, puno preciznijih metoda (TRUYEN i sur., 2009.). PCR test danas se rutinski koristi u mnogim dijagnostičkim laboratorijima. Ta molekularna metoda vrlo je osjetljiva i omogućava razlikovanje pojedinih podtipova virusa (PEREIRA i sur., 2000.). Testira se puna krvi ili izmet, s tim da se puna krv koristi u slučajevima kada mačke nemaju proljev ili uzorak izmeta nije dostupan (SCHUNCK i sur., 1995.; RYSER-DEGIORGIS i sur., 2005.; TRUYEN i sur., 2009.).

1.2.11. TERAPIJA

S obzirom na etiologiju bolesti, liječenje se svodi na simptomatsku i potpurnu terapiju koja za svoj cilj ima nadoknadu tekućine, suzbijanje sekundarnih bakterijskih infekcija i uspostavljanje ravnoteže elektrolita. Zarazna panleukopenija mačaka može imati visoku stopu mortaliteta unatoč ranoj i agresivnoj terapiji, međutim neke mačke prežive, uglavnom one starije dobi (ANON, 2020.). Parenteralna terapija tekućinom služi za nadomještanje izgubljenih elektrolita, suzbijanje dehidracije i kao nadomjestak dnevnih potreba. Uporaba antimikrobnih pripravaka za ulogu ima sprječavanje širenja bakterija u krv i kao posljedicu, razvoj septikemije. Kao uspješna antimikrobna terapija pokazala se kombinacija ampicilina i enrofloksacina tijekom sedam dana (GELATT i sur., 2001.; AWAD i sur., 2019.) U kontroli ustrajnog povraćanja najbolje pomaže metoklopramid (GREENE, 2012.). Nedavno provedeno istraživanje dokazalo je uspješnost korištenja specifičnih neutralizirajućih protutijela u liječenju zarazne panleukopenije mačaka

(AWAD i sur., 2019.).

1.2.12. IMUNOPROFILAKSA

Bolest slična zaraznoj panleukopeniji mačaka poznata je dugi niz godina, te je prvi put zabilježena u literaturi još 1920-ih i 1930-ih godina (VERGE i CHRISTOFORONI, 1928.; MIRANDA i sur., 2016.), unatoč širokoj dostupnosti učinkovitih cjepiva i dalje je vrlo važna zarazna bolest domaćih mačaka. Protutijela majke štite od infekcije virusom divljeg tipa, ali također ometaju cijepljenje i u slučaju modificiranih živih vakcina, inaktiviraju virus neutralizacijom nakon cijepjenja mačića. Cjepiva protiv virusa panleukopenije mačaka pretežno su modificirane žive vakcine koje su prošle brojne pasaže na linijskim stanicama mačaka i nerca. Inaktivirana cjepiva u prošlosti su često korištena, ali daju najslabije rezultate i niske razine protutijela kraćeg životnog vijeka, stoga su zamijenjena sa modificiranim živim cjepivom (TRUYEN i sur., 2009.) koja se temelji na avirulentnim i za replikaciju sposobnim sojevima virusa. Uspješno cijepljenje potiče tvorbu virus neutralizirajućih protutijela koja pružaju zaštitu protiv zarazne panleukopenije mačaka (FASTIER i sur., 1968.; CHALMERS i sur, 1999.; LAPPIN i sur., 2002.; GREENE i sur., 2006.; JAKEL i sur., 2012.). Period kada mačići više nisu zaštićeni od zaraze virusom, ali imaju dovoljno majčinih protutijela koja interferiraju sa živim izmijenjenim cjepivom naziva se imunitetni procjep. Kada sva majčina protutijela oslabe, životinje će tek ona biti prijemljive na infekciju ili cjepivo (SCOTT i sur., 1970.; TRUYEN i sur., 2013.). Preporuča se višekratno cijepljenje mačića u intervalima od dva do tri tjedna počevši u dobi od osam tjedana i završavajući u dobi od 16 tjedana (ANON, 2006.; TRUYEN i sur, 2013.). Trajanje imunosti je najmanje tri godine nakon drugog cijepjenja u mačaka starijih od osam tjedana (GORE i sur., 2006.). Docjepljivanje se provodi svakih tri do pet godina (DAY i sur., 2016.). Nažalost, studije su pokazale da cijepljenje kod nekih mačića biva

neuspješno, iako se poštovao protokol cijepljenja (ADDIE i sur., 1998.; DAWSON i sur., 2001.; DIGANGI i sur., 2012.; TRUYEN i sur., 2013.).

1.2.13. JAVNO ZDRAVSTVO

U literaturi ne postoji zabilježen prijenos virusa panleukopenije mačaka na čovjeka i obrnuto, stoga virus nije od značaja za javno zdravstvo. Međutim, 2010. godine Yang i suradnici izolirali su mutirani FPV soj iz crijevnog sadržaja majmuna sa kliničkim znakovima proljeva. Virus je pokazao podudarnost sa FPV-om od 98,75%, te sa CPV-2 98,15%, a kod životinje je izazvao kliničke znakove tipične za panleukopeniju mačaka.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Do sada na području Republike Hrvatske (RH) ne postoje podaci o sustavnom istraživanju proširenosti sojeva CPPV-1 koji uzrokuju zaraznu panleukopeniju mačaka, iako je bolest kod pasa u RH prvi put opisana još 1980. (CVETNIĆ, 1980.). Stoga su ciljevi istraživanja za potrebe izrade ovog specijalističkog rada:

- 1) Prikupljanje podataka o proširenosti sojeva CPPV-1 na području RH, čimbenicima rizika te kliničkom očitovanju infekcije u cilju lakšeg prepoznavanja infekcije i usmjerenog liječenja od strane veterinara praktičara. Podaci dobiveni u ovom dijelu rada također bi omogućili ciljano provođenje mjera opće profilakse bolesti.
- 2) Filogenetička analiza virusa, koja do sada nije provedena u našoj zemlji, a za cilj ima dati uvid u molekularnu epizootologiju infekcije panleukopenijom mačaka,
- 3) Određivanje smjera evolucije CPPV-1 u mačaka i značaj utjecaja aminokiselinskih izmjena virusnih proteina na patogenost i učinkovitost imunoprofilakse.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. UZORKOVANJE

Za potrebe ovog istraživanja prikupljeno je i obrađeno 211 uzoraka izmeta i obrisaka rektuma mačaka primljenih na Kliniku za zarazne bolesti Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u razdoblju od 2015. do 2020. godine. Podaci iz anamneze, kliničkog pregleda i tijeka liječenja te nacionala 211 mačaka korišteni su za daljnju statističku obradu (Tablica 2). Stanje životinja kod prvog prijema u ambulantu definirano je uz pomoć tzv. kliničkog skora u rasponu od jedan do pet. U obzir su uzeti podaci o trajanju bolesti, ponašanju životinje, pokretnosti, hidracijsko stanje te izmjerena rektalna tjelesna temperatura (MARKOVICH i sur., 2012.) (Tablica 3).

Tablica 2. Podaci o životinjama upotrebljavani u statističkoj obradi

Podaci o vlasniku	Nacional	Anamneza	Klinički pregled	Tijek liječenja	Ishod bolesti
Privatna osoba/Sklonište za nezbrinute životinje	Dob	Razlog dolaska	Proljev	Trajanje hospitalizacije	
	Spol	Podaci o cijepljenju	Krvavi proljev	Hematološke pretrage	
	Pasmina		Povraćanje Imunokromatografski test Lančana reakcija polimerazom		

Tablica 3. Podaci korišteni u procjeni kliničkog skora. Prilagođeno iz MARKOVICH i sur., 2012.

Klinički skor	Trajanje bolesti u danima	Ponašanje životinje	Pokretnost	Utvrđeno hidracijsko stanje	Rektalna tjelesna temperatura
1	<1	bistro, oprezno	normalna	fiziološko	fiziološka
2	1-3	mirno, oprezno, pa do znakova depresije	normalna	dehidracija od 5%	fiziološka do vrućica
3	2-3	znakovi depresije	moguća slabost	dehidracija od 6%-7%	fiziološka do vrućica
4	>3	znakovi depresije	slabost i nevoljko kretanje	dehidracija od 7%-8%	fiziološka do vrućica
5	>3	stuporozno stanje	ležanje	dehidracija 8%-10%	hipotermija

Uzorci su do obrade bili pohranjeni na -80° C u Virološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. MOLEKULARNA METODA DOKAZA UZROČNIKA

Za molekularni dokaz prisutnosti FPV i CPV-2 u uzorku, korištena je ukupna DNK izdvojena iz uzorka izmeta ili obrisaka rektuma. Dokazivanje prisustva virusa učinjeno je primjenom lančane reakcije polimerazom umnažanjem odsječka genoma virusa.

3.2.1. PRIPREMA UZORAKA

Uzorci izmeta ili obrisci rektuma su se u biozaštitnoj komori razrijedili puferiranom solnom otopinom u omjeru 1:10, zatim se dobivena otopina kratkotrajno pomiješala na tresilici te centrifugirala na 3500 okretaja u trajanju od 10 minuta.

3.2.2. IZDVAJANJE VIRUSNE DNK

Za izdvajanje ukupne DNK iz uzorka korišten je komercijalni komplet QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Dusseldorf, Njemačka) prema uputama proizvođača (Tablica 4.).

Tablica 4. Sadržaj kompleta QIAamp DNA Mini Kit

QIAamp cador Pathogen Mini Kit	Količina
QIAamp kolona za centrifugiranje	50 komada
Plastične epruvete zapremine 2 ml	150 komada
Puferska otopina AL	12 ml
Puferska otopina ATL	10 ml
Puferska otopina AW1 (koncentrirana)	19 ml
Puferska otopina AW2 (koncentrirana)	13 ml
Puferska otopina AE	22 ml
Proteinaza K	1,25 ml

3.2.3. POSTUPAK IZVOĐENJA PRETRAGE LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZE (PCR)

Izvođenje PCR metode učinjeno je uz korištenje sljedećih reagenasa:

- voda slobodna od RNK-za i DNK-za (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- reakcijski pufer 10x koncentriran (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- 50 mM MgCl₂ (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- 25 mM dNTP (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- 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. Upotrebljene početnice za umnažanje odsječka genoma FPV i CPV-2. 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'-CCAACATAAAAGAAGTAAACC-3'
V52	5'-AT-TAATGTTCTATCCCATTG-3'

Tablica 6. Sastav reakcijske smjese za izvođenje PCR metode

REAGENS	KOLIČINA ZA JEDAN UZORAK
Voda	5,60 µl
Pufer 10X	1,25 µl
50 mM MgCl ₂	0,75 µl
dNTP (10 mM)	1,0 µl
Početnica Hfor (10 µM)	0,625 µl
Početnica 555rev (10 µM)	0,625 µl
Taq Platinum 5u/µl	0,156 µl

Nakon izračunavanja količine reagensa koja je ovisila o broju uzoraka, reagensi su otopeni u plastičnu epruvetu. Zatim se otopina kratko promiješala na tresilici i centrifugirala. U PCR Eppendorf epruvetice otpipetiralo se 10 µl reakcijske smjese te se dodalo 2,50 µl izdvojene DNK pojedinog uzorka. Uzorci su se posložili u jažice u PCR uređaju programiranom na navedeni temperaturni program:

95°C 5 minuta

95°C 30 sekundi 10x

50°C 1 minuta 10x

72°C 2 minute 10x

95°C 30 sekundi 32x

45°C 1 minuta 32x

72°C 2 minute 32x

72°C 10 minuta

10°C ∞

hlađenje na +4°C

3.2.4. ELEKTROFOREZA U GELU

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

Pribor, oprema i reagensi:

- analitička vaga (PB153) (Mettler Toledo, Kusunacht, Švicarska)
- 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
- mikrovalna pećnica (MO 17 MW) (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- sustav za provođenje elektroforeze (Scie-Plast, Cambridge, Velika Britanija)
- izvor električne struje (CS-300V) (Cleaver Scientific Ltd, Rugby, Velika Britanija)
- marker DNA Ladder 100 pb (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)

- DNA Loading Buffer (6x) (Lonza, Rockland, Maine, SAD)
- boja za gel (Ethidium Bromide Solution 10 mg/ml, Bio-Rad Laboratories, SAD)
- agarozna (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- TAE pufer

3.2.4.1. PRIPREMA TAE PUFERA

Reagensi za pripremu 50x koncentriranog TAE pufera:

- 93,5 g EDTA (EDTA Disodium salt) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- 242 g Tris (TRIZMA baza) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- 57 ml ledene octene kiseline (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Prvo se vrši priprema 0,5 M otopine EDTA tako da se 93,5 g EDTA stavi u 400 ml redestilirane vode uz podešavanje pH na 8,0 dodavanjem kristala NaOH i dopuni redestiliranom vodom do volumena od 500 ml. Zatim, 242 g Tris baze otopi se u 750 ml redestilirane vode te se doda 57 ml ledene octene kiseline i 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) nakon čega se dopuni redestiliranom vodom do 1000 ml. S obzirom na to da je za pripremu gela za elektroforezu potreban TAE pufer koncentracije 1x iz načinjene otopine, potrebna koncentracija priprema se miješanjem 10 ml TAE pufera koncentriranog 50x i 490 ml destilirane vode.

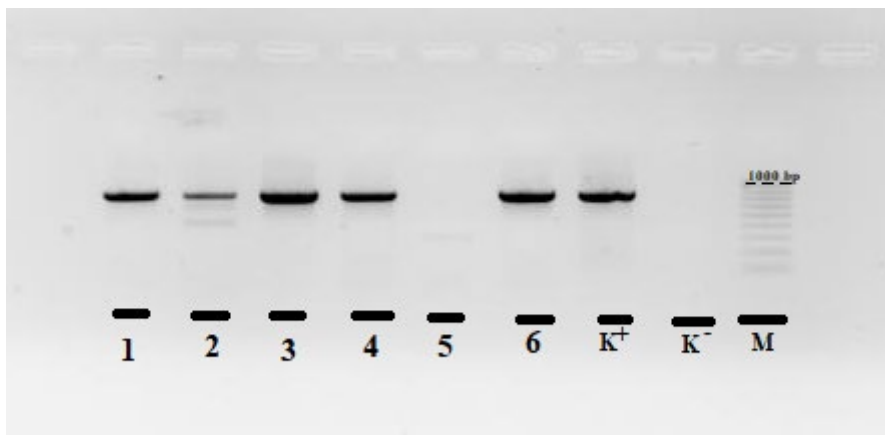
3.2.4.2. PRIPREMA GELA

Gel se pripremao na slijedeći način: odvagane se 0,75 g agaroze za elektroforezu u Erlenmayerovu tikvicu, te se dodaje 75 ml pufera TAE 1x koncentriranog. Agarozna se otapa zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici tijekom 3 minute sve dok otopina nije postala potpuno bistra. U otopinu ohlađenu na 50°C dodano je 5 µl boje za gel. Otopina je zatim izlivena u kalup za gel na kojem su

prethodno postavljene vanjske stranice radi sprečavanja razlijevanja gela, te je umetnut češljic za udubljivanje jažica. Nakon hlađenja i polimerizacije gela češljic je izvađen, a vanjske stranice skinute s rubova kalupa. Postolje sa gelom stavljeno je u kadicu za elektroforezu tako da je dio gela s jažicama bio okrenut prema katodi, a kadica za elektroforezu bila je napunjena TAE-puferom koji je u potpunosti prekrivao gel.

3.2.5. NANOŠENJE UZORAKA U GEL I POSTUPAK ELEKTROFOREZE

Na parafinskom filmu pomiješalo se 3 μ l boje za nanošenje (DNA Loading Buffer 6x, Lonza, Rockland, Maine, SAD) te 2,5 μ l umnožene DNK, za svaki pretraživani uzorak. Mikropipetom uzorci su nanoseni po rednom broju u jažice, a u posljednje tri jažice na gelu, nanosene su pozitivna (cjepivo) i negativna kontrola (destilirana voda) te DNK marker (DNA Ladder 100 pb, Lonza, Rockland, Maine, SAD). Kadica sa gelom, uređaja za elektroforezu, napunjena TAE puferom, bila je zatvorena poklopcem i spojena na istosmjernu električnu struju napona 100 V i jačine 700 mA i snage 750W. Sam postupak elektroforeze trajao je 30 minuta. Po završetku elektroforeze gel je izvađen, a rezultati su očitani i snimljeni uređajem za snimanje gelova. Veličina dobivenih odsječaka mogla se procijeniti usporedbom položaja dobivenog fragmenta s markerom. Pozitivan rezultat podrazumijevao je dokaz virusa PCR metodom (Slika 4). Dobiveni PCR produkti poslani su na određivanje nukleotidnog slijeda. Kod 55 PCR produkata nije bilo moguće odrediti slijed usprkos pozitivnom rezultatu i nekoliko ponavljanja cijelog postupka.



Slika 4. Prikaz produkta PCR reakcije izvedene početnicama za sekvenciranje: od 1 do 6 su pretraživani uzorci, K⁺ pozitivna kontrola, K⁻ negativna kontrola, te M kao oznaka molekularnog biljega. Preuzeto iz arhive Virološkog laboratorija

3.3. ODREĐIVANJE NUKLEOTIDNOG SLIJEDA PROIZVODA PCR-A

U svrhu molekularne tipizacije i filogenetske analize virusa panleukopenije mačaka na području RH određivan je nukleotidni slijed umnoženog odsječka virusne DNK. Slijed nukleotida određen je u tvrtki Macrogen, Amsterdam, Nizozemska, uz pomoć ABI PRISM BigDye terminator kita (Applied Biosystem, Carlsbad, California, SAD) na uređaju 3730 x 1 DNA analyzer istog proizvođača, a iste početnice korištene su kao u opisanom PCR-u (Tablica 5.). 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 njihovo prevođenje u odsječke od 1751 bp dobivenih koristeći početnice za sekvenciranje: V5-V56, V22-V41 i V51-V52 (Tablica 5.). Prvi korak podrazumijevao je prevođenje dobivenog slijeda nukleotida u određeni aminokiselinski slijed koji je zatim uspoređen sa aminokiselinskim slijedovima referentnih slijedova nukleotida preuzetih iz NBCI banke gena. Koristeći metodu najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood*, ML) nukleotidni slijedovi dobivenih odsječaka virusne

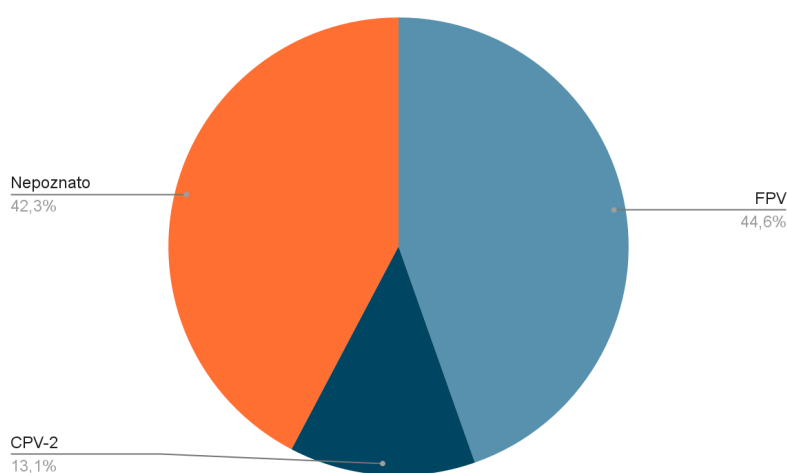
DNK uspoređeni su s dostupnim nukleotidnim slijedovima iz NCBI banke gena za sojeve CPPV-1 dobivenim u prijašnjim istraživanjima, a u cilju izrade filogenetskog stabla. Dostupni slijedovi iz NCBI banke označeni su na slijedeći način: soj virusa, oznaka sekvence u banci gena, država porijekla i godina izolacije. Dok su uzorci korišteni u ovom istraživanju označeni kao oznaka uzorka, država porijekla (HR), te godina izolacije.

3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada pribavljenih podataka provedena je statističkim programom Dell Statistica (data analysis software system), version 12. software.dell.com. (Dell Inc., 2015). Osim parametara deskriptivne statistike izvedena je i statistička analiza rezultata. Kvalitativne varijable, učestalosti, obrađene su hi-kvadrat testom, te Fisherovim egzaktnim testom. S obzirom na to da podaci o broju leukocita nisu pratili normalnu raspodjelu analizirani su Mann-Whitney U-testom, kao i dob oboljelih životinja u odnosu na soj virusa. Također, Mann-Whitney U-testom napravljena je i analiza podataka o trajanju bolesti s obzirom na virusni soj. Studentov t-test korišten je u analizi podataka o vremenu hospitalizacije u odnosu na virusni soj. Granica statističke značajnosti označena je na $p < 0,05$.

4. REZULTATI

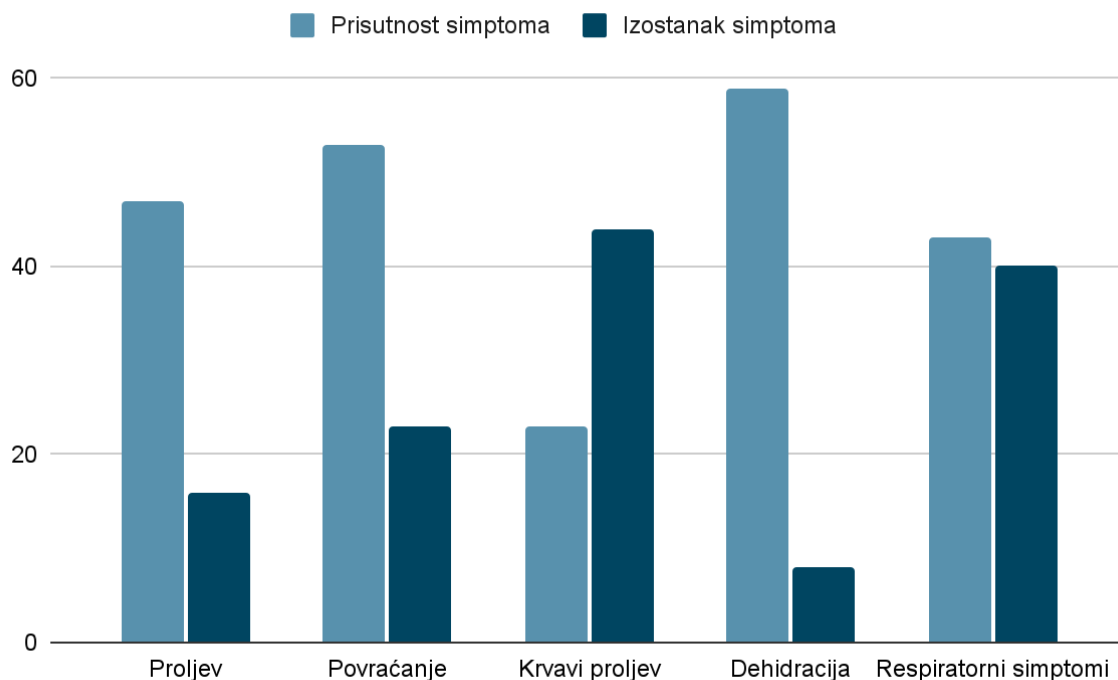
Ovo istraživanje obuhvatilo je 211 životinja u periodu od 2015. do 2020. godine. Uvidom u anamnestičke podatke bilo je vidljivo kako je 146 mačaka bilo u posjedu privatnih vlasnika, 49 mačaka u posjedu skloništa za nezbrinute životinje, a za njih 16 nije bilo podataka. Najviše mačaka bilo je muškog spola, njih 116, ženskog spola bile su 74 mačke, a za 21 životinju spol je ostao nepoznat. Pasminska raznolikost bila vrlo mala, pa ih je zabilježeno samo 10 čistokrvnih, domaćih 178, a za 23 mačke nije bilo podataka o pasmini. Anamnestički podaci mačaka na prvom prijemu otkrili su kako su 63 mačke povraćale, 26 mačaka nije povraćalo, a za njih 122 nije bilo podataka. Nadalje, 89 mačaka imalo je proljev, 40 nije, a za 82 mačke taj podatak ostaje nepoznat. Krvavi proljev razvile su 33 životinje od njih 89 koje su imale proljev. Kod 63 životinje uočeni su klinički znakovi oboljenja dišnog sustava. Od 211 pretraženih uzoraka prisutnost FPV-a ili CPV-2 dokazana je u njih 130, od kojih je zbog nedovoljnog broja uzoraka dobiveno 75 sekvenci te je virus panleukopenije mačaka (FPV) dokazan u 58 sekvenciranih uzoraka (73,33%), a pseći parvovirus (CPV-2) bio je prisutan u 17 uzoraka što je činilo 22,67% (Slika 5.).



Slika 5. Zastupljenost sojeva protoparvovirusa-1 mesojeda u mačaka na području grada Zagreba

Statistička analiza podataka nije pokazala značajnu razliku u broju pozitivnih mačaka koje imaju vlasnika (N=87) od onih koje su u posjedu skloništa za nezbrinute životinje (N=32), te je p-vrijednost iznosila 0,48 (N=119, $\chi^2=0,5$, df=1). Nadalje, spolna dispozicija također nije dokazana s obzirom na to da su i mušjaci i ženke bili pozitivni u gotovo jednakom postotku; od sveukupnog broja mužjaka 60,34% (N=70) su bila pozitivna kao i 60,81% (N=45) od sveukupnog broja ženki (N=115, $\chi^2=0,004$, df=1, p=0,95). Zbog nedovoljnog broja čistokrvnih mačaka (N=10) nije bilo moguće odrediti pasminsku predispoziciju za panleukopeniju mačaka. Nije dokazana značajna razlika između pozitivnih i negativnih mačaka koje su pokazivale kliničke znakove povraćanja. Naime, anamnestički podaci pozitivnih mačaka na prvom prijemu otkrili su kako je sveukupno 47 pozitivnih mačaka povraćalo (74,60%), a 16 mačaka nije imalo znakove povraćanja (25,40%), dok je 16 negativnih mačaka (25,40%) povraćalo, a 11 nije (42,31%) (N=89, $\chi^2=2,49$, df=1, p=0,11). Nadalje, proljev je imalo 59 pozitivnih životinja (66,29%), dok njih 23 pozitivnih nije imalo proljev (57,50%). Broj negativnih mačaka koje su razvile proljev bilo je 30 (33,71%), a 17 negativnih mačaka (42,50%) nije, te nije dokazana statistička značajnost razlike između pozitivnih i negativnih mačaka u odnosu na pojavu proljeva (N=119, $\chi^2=0,92$, df=1, p=0,34). Također, nije dokazana značajna razlika u pojavi krvavog proljeva između pozitivnih i negativnih mačaka. Taj se klinički znak javio kod 23 pozitivne mačke (69,70%) i kod deset (30,30%) negativnih, te je izostao kod 44 pozitivne (61,97%) i 27 negativnih životinja (38,03%) (N=104, $\chi^2=0,59$, df=1, p=0,44). Dehidracija je zabilježena kod 59 (69,41%) pozitivnih mačaka, 8 mačaka nije bilo dehidrirano, dehidriranih negativnih mačaka bilo je 26 (30,59%), a negativnih mačaka bez kliničkih znakova dehidracije bilo je tri (27,27%), te nije utvrđena razlika u pojavnosti dehidracije između pozitivnih i negativnih mačaka (N=96, Fisherov egzaktni test, p=1). Nije dokazana povezanost kliničkih znakova oboljenja dišnog sustava sa dokazom prisutnosti FPV-a; navedeni

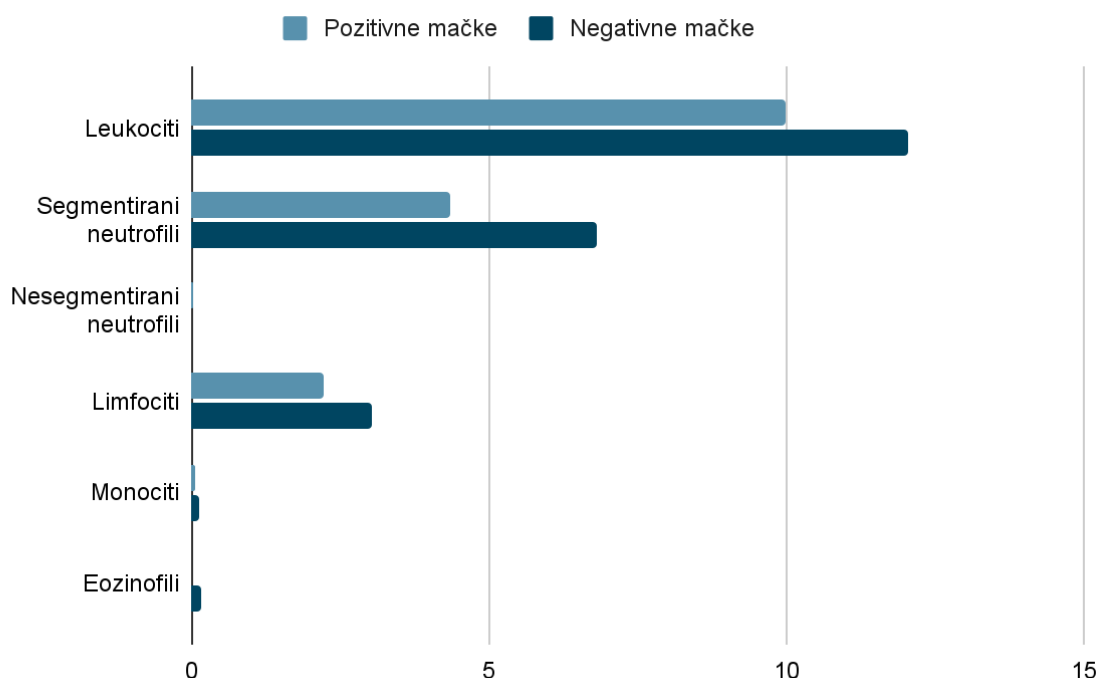
znakovi primijećeni su kod 43 pozitivne mačke (51,81%), a kod 40 (48,19%) mačaka su izostali (N=83, $\chi^2=1,75$, $df=1$, $p=0,19$) (Slika 6.).



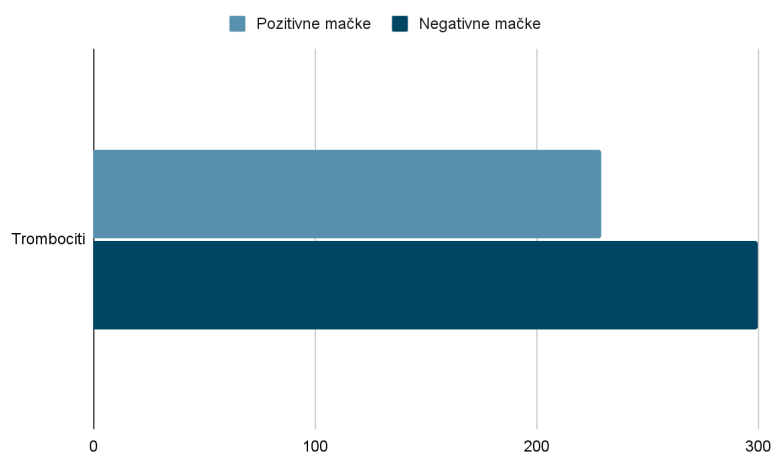
Slika 6. Neki od anamnestičkih podataka pozitivnih mačaka na prvom prijemu

Nije dokazan statistički značajan utjecaj cijepljenja na pojavu bolesti (N=85, $\chi^2=1,86$, $df=1$, $p=0,17$). Ustanovljeno je kako mačke pozitivne na virus mačje imunodeficijencije (FIV) i virus mačje leukemije (FeLV) češće obolijevaju od panleukopenije. Od sveukupno 34 FIV pozitivne mačke njih devet (36,00%) bilo je pozitivno i na panleukopeniju (N=34, $\chi^2=4,33$, $df=1$, $p=0,04$), kao i četiri (23,53%) FeLV pozitivne mačke od ukupno 31 životinje (N=31, $\chi^2=7,52$, $df=1$, $p=0,006$). Stacionirana je 91 (66,91%) pozitivna mačka, te 45 (33,09%) negativnih mačaka, bez potrebe bolničkog liječenja bile su 24 (46,15%) pozitivne mačke, te 28 negativnih (53,85%), što govori u prilog tome kako pozitivan nalaz donosi veću mogućnost za potrebom bolničkog liječenja životinje (N=188, $\chi^2=6,82$, $df=1$, $p=0,009$). Bolest su preživjele 63 pozitivne mačke (55,55%) i 48

negativnih mačaka (71,64%) te nije dokazana povezanost između preživljavanja i bolesti (N=165, $\chi^2=0,98$, df=1, p=0,32). U statističkoj obradi rezultata laboratorijskih pretraga krvi korištena je vrijednost broja leukocita u krvi, te je dokazano kako pozitivne mačke imaju značajno snižen broj eozinofila u krvi (N=134, Mann-Whitneyjev U-test, p=0,03). Zanimljivo je kako broj leukocita nije bio statistički značajno snižen (N=135, Mann-Whitneyjev U-test, p=0,13) (Slika 7.). Ipak, vrijednost trombocita bila je značajno manja kod pozitivnih mačaka (N=130, studentov t-test, p=0,04) (Slika 8.).



Slika 7. Medijan vrijednosti leukocita u pozitivnih i negativnih mačaka izražen u $10^9/L$



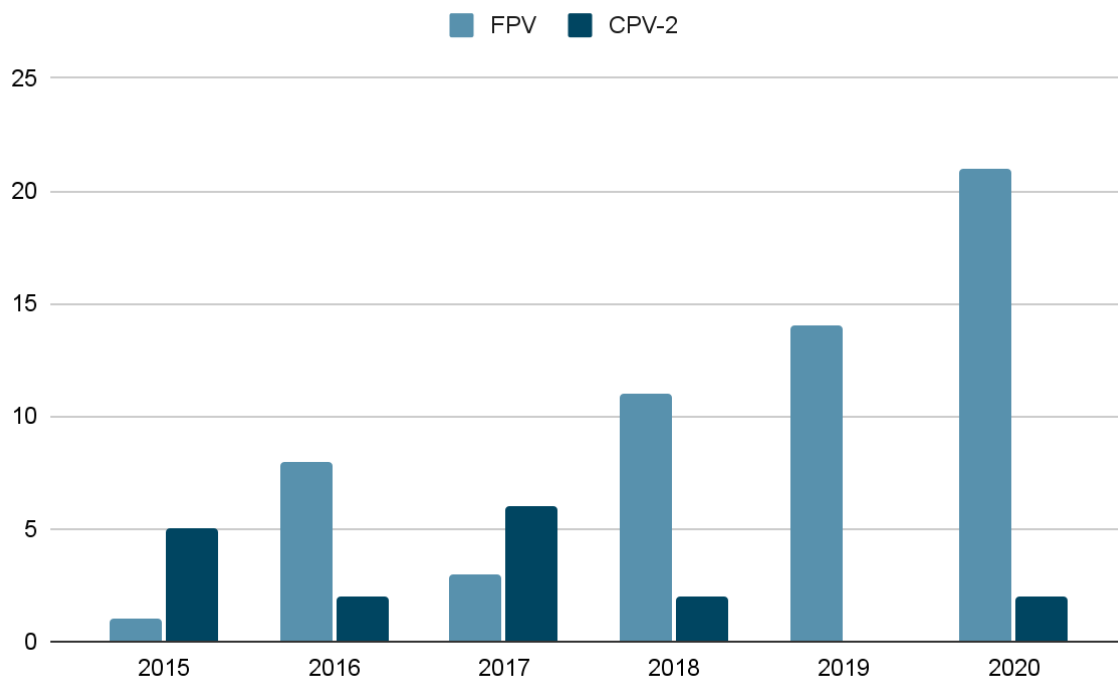
Slika 8. Srednja vrijednost trombocita u pozitivnih mačaka izražena u $10^9/L$

U ispitivanju utjecaja sojeva CPPV-1 na čimbenike rizika dokazana je značajna razlika između sojeva u odnosu na dobnu predispoziciju. Mlađe životinje češće su oboljevale od FPV soja sa medijanom od 0,79 godina, dok je soj CPV-2 bio češći kod starijih životinja i medijan je iznosio 4,5 godine. Rezultati statističke obrade podataka prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Utjecaj sojeva CPPV-1 na ispitivane čimbenike rizika, kliničku sliku i ishod bolesti u mačaka na području grada Zagreba

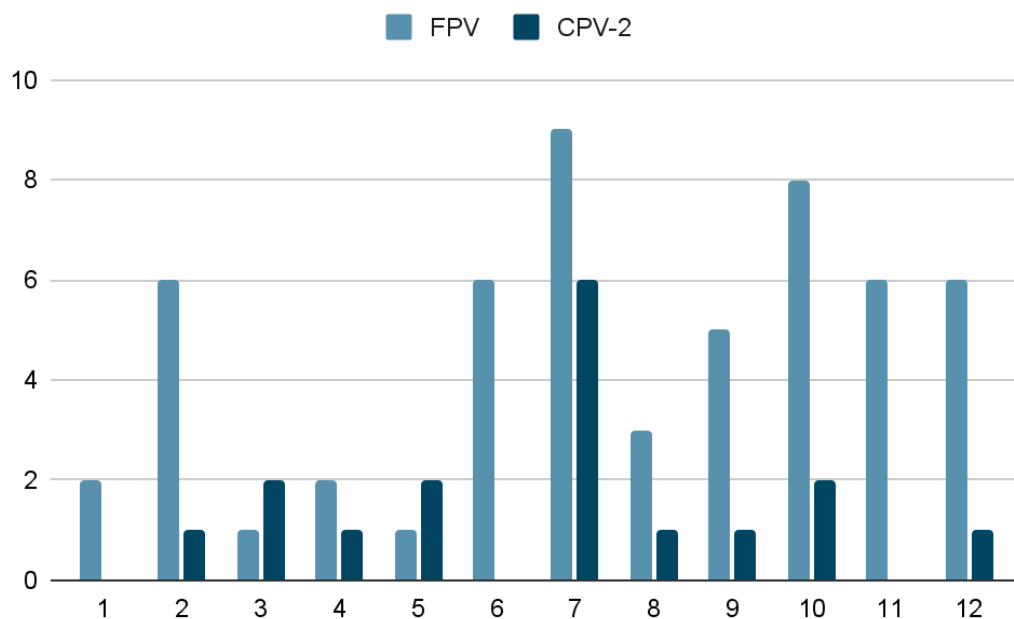
Ispitivani čimbenik	Broj životinja (N)	Test	p-vrijednost
Vlasnik	66	Fisherov egzaktni test	0,21
Dob	50	Mann-Whitney U test	0,03
Spol	62	Fisherov egzaktni test	1
Dehidracija	35	Fisherov egzaktni test	0,56
Povraćanje	36	Fisherov egzaktni test	0,34
Proljev	45	Fisherov egzaktni test	0,13
Krvavi proljev	38	Fisherov egzaktni test	1
Klinički znakovi dišnog sustava	50	Fisherov egzaktni test	0,28
Cijepljenje	25	Fisherov egzaktni test	1
Bolničko liječenje	63	Fisherov egzaktni test	0,4
Preživljavanje	56	Fisherov egzaktni test	0,73
Skor	48	Fisherov egzaktni test	0,49

Zanimljiva je rasprostranjenost sojeva tijekom godina, pa je tako CPV-2 dominirao 2015. godine u pet od ukupno šest sekvenciranih uzoraka (83,33%), dok je 2017. godine izdvojen iz šest od ukupno devet uzoraka (66,66%). FPV soj bio je dominantan 2016. godine sa udjelom od 80% (N=10), zatim ponovno 2018. godine sa čak 84,62% (N=13), da bi 2019. godine u potpunosti preuzeo primat i bio prisutan u svakom sekvenciranom uzorku (N=14). Godine 2020. udio FPV-a među dobivenim sekvencama bio je 91,30% (N=23), (Slika 9.).

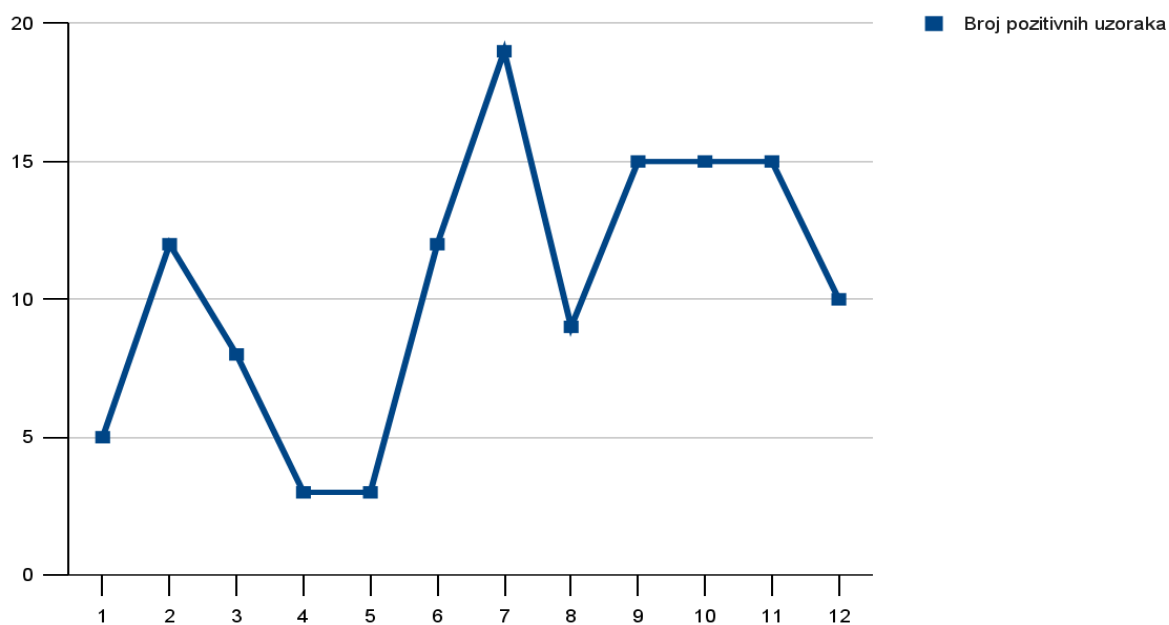


Slika 9. Rasprostranjenost sojeva CPPV-1 u mačaka na području grada Zagreba u periodu od 2015. do 2020. godine

Nije dokazana sezonalnost bolesti, iako je pojavnost oba soja bila najveća svakog srpnja u periodu od 2015. do 2020. godine. Naime, 15 mačaka (20,83%) oboljelo je tijekom srpnja, od čega je devet mačaka bilo inficirano FPV sojem (60,00%), a šest (40,00%) inficirano CPV-2 sojem (N=72, Fisherov egzakti test, $p=0,26$) (Slike 10 i 11.).



Slika 10. Kretanje sojeva CPPV-1 u mačaka na području grada Zagreba unutar kalendarske godine u periodu od 2015. do 2020. godine

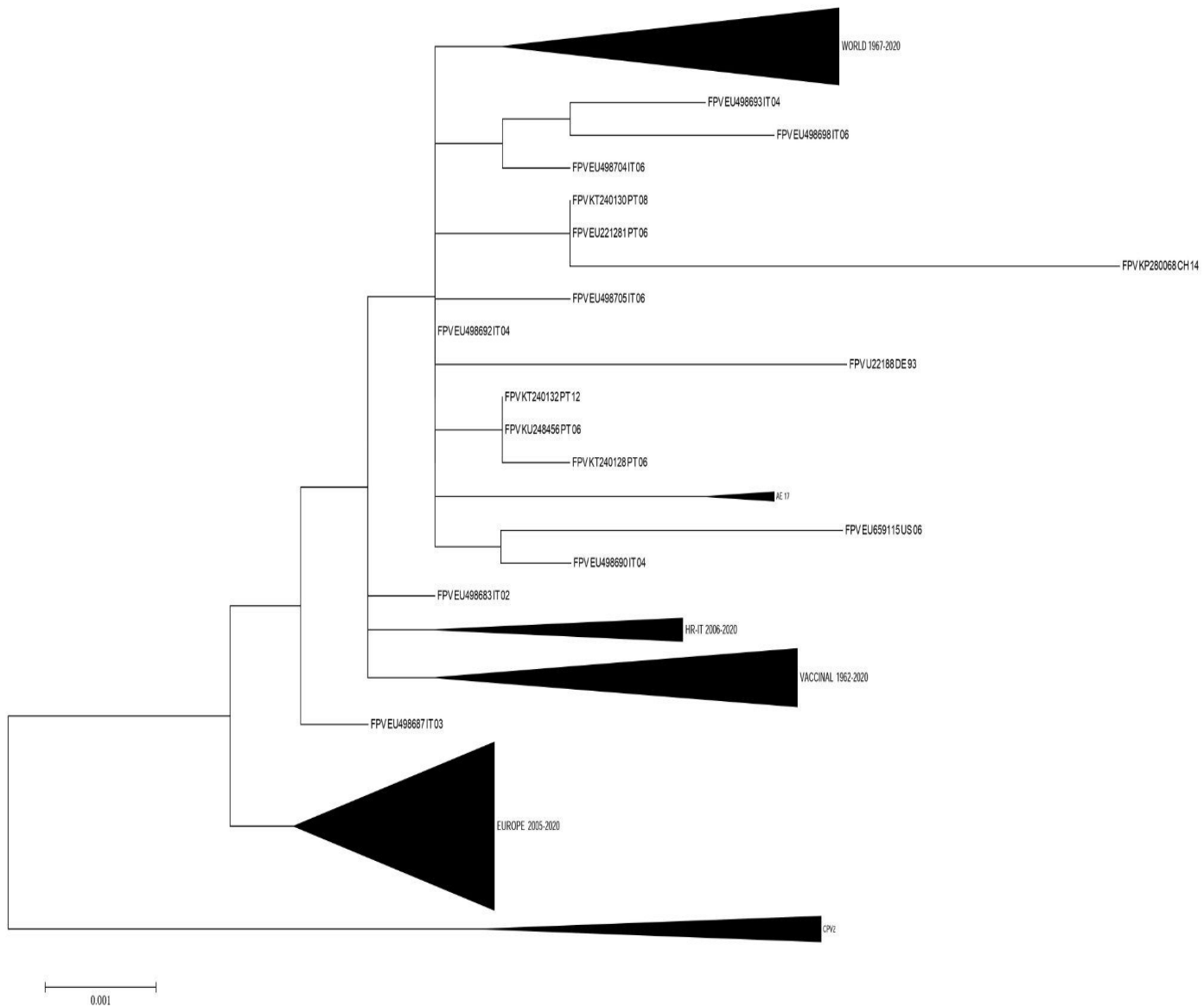


Slika 11. Mjesečna prevalencija pozitivnih uzoraka u periodu od 2015. do 2020. Godine

Genetska raznolikost

Filogenetsko stablo dobiveno je korištenjem ML metode uz pomoć 3-parametarskog Tamura modela (TAMURA, 1992.). Prikazano je drvo s najvećim logaritmom vjerojatnosti. Postotni udio drva u kojem se pojedini taksoni grupiraju zajedno prikazan je na mjestima račvanja grana. Duljina grana proporcionalna je broju izmjena po nukleotidu. Kao vanjska grupa za potrebe postavljanja izvorišta stabla korišteni su CPV-2 sojevi. Analizom dobivenog stabla (Slika 12.) bilo je vidljivo kako su se sojevi FPV-a mogli svrstati u tri različite skupine (hrvatsku, europsku i svjetsku) (Tablice 9., 10., 11. i 12.). Sojevi iz ovog istraživanja uglavnom su grupirani sa sojevima iz europske (lokalne) skupine koja je ujedno i najveća. Uzorci FPV-a nisu razvrstani ovisno o zemlji, već su raspoređeni u dvije velike skupine, lokalnu i međunarodnu, te je ovo stablo prikaz univerzalnog uzorka evolucije nastalog zbog globalizacije. FPV i CPV-2, iako visoko povezani na genetskoj razini, pokazali su potpuno drugačiji obrazac evolucije. Sljedeći korak u analizi nukleotidnih slijedova bilo je ustanoviti prisutnost mutacija koje bi bile svojstvene sojevima FPV i CPV-2 koji cirkuliraju na području RH usporedbom istih sa slijedovima izvornih izolata. Kod FPV soja ustanovljene su izmjene aminokiselina na pozicijama 91, 232, 303 i 562. Aminokiselinski ostaci 91, 232 i 303 tvore trnaste izdanke na trostrukoj osi simetrije, ujedno i mjesta vezanja protutijela, dok aminokiselinski ostatak 562 čini udubine na dvostrukoj osi simetrije, čija je zadaća učiniti kanjone još nedostupnijim za protutijela, te bi mogli neizravno uzrokovati površinske konformacijske promjene (TSAO i sur., 1991.). Nadalje, određivani su tipovi CPV-2 virusa iz sekvenciranih uzoraka, te je ustanovljeno da kod mačaka na području grada Zagreba prevladava CPV-2c tip virusa koji je pronađen u 13 (76,47%) od ukupno 17 uzoraka. CPV-2a pronađen je u dva uzorka (11,76%), a za dva uzorka nije bilo moguće odrediti tip. Oba slijeda podtipa CPV-2a imala su izmjenu ostatka glutaminske kiseline u asparaginski ostatak na

426. mjestu.



Slika 12. Filogenetsko stablo CPPV-1 sojeva. Filogenetsko stablo je načinjeno koristeći Maximum Likelihood metodu na Tamura 3-parameter parametarskom modelu (TAMURA, 1992.). Duljina grana odgovara broju izmjena po mjestu nukleotidnog slijeda. Slijedovi iz svjetske banke gena, koji su korišteni za analizu, označeni su oznakom soja virusa, jdnstvenim brojem slijeda, dvoslovnom oznakom države izolacije te zadnje dvije znamenke godine izolacije virusa.

Tablica 8. Uzorci FPV-a koji pripadaju skupini World 1962-2020

Oznaka uzorka	Zemlja podrijetla	Godina izolacije
FPV AB000064	Japan	1979.
FPV AB000066	Japan	1975.
FPV AB000068	Japan	1975.
FPV AB000052	Japan	1994.
FPV AB000054	Japan	1993.
FPV EU659111	SAD	1967.
FPV M38246	SAD	1967.
FPV EU659113	SAD	1989.
FPV EU659114	SAD	1989.
FPV AB000061	Japan	1995.
FPV AB000059	Japan	1994.
FPV D88286	Japan	1990.
FPV MK570637	Australija	2015.
FPV MK570638	Australija	2015.
FPV MK570639	Australija	2015.
FPV MK570646	Australija	2015.
FPV KT240134	Portugal	2013.
FPV KT240136	Portugal	2014.
v 22	Hrvatska	2018.
v 70	Hrvatska	2019.
GE 231	Hrvatska	2016.
FPV EU498706	Italija	2006.
FPV HS2019	Kina	2019.
v 30	Hrvatska	2019.
FPV EU498699	Italija	2006.
FPV EU360959	Mađarska	2007.
FPV EU360958	Mađarska	2007.
FPV FJ440714	Argentina	2007.
FPV FJ440712	Argentina	2006.
FPV FJ440711	Argentina	2005.
FPV FJ440713	Argentina	2007.
FPV EU498682	Italija	2001.
v 95	Hrvatska	2020.

Tablica 9. Uzorci FPV-a koji pripadaju skupini HR-IT 2006-2020

Oznaka uzorka	Zemlja podrijetla	Godina izolacije
GE 287	Hrvatska	2017.
v 127	Hrvatska	2020.
GE 107	Hrvatska	2020.
GE 106	Hrvatska	2020.
GE 87	Hrvatska	2020.
GE 85	Hrvatska	2020.
GE 248	Hrvatska	2020.
FPV EU498718	Italija	2007.
FPV EU498701	Italija	2006.
FPV EU498707	Italija	2006.

Tablica 10. Uzorci FPV-a koji pripadaju skupini Vaccinal 1962-2020

Oznaka uzorka	Zemlja podrijetla	Godina izolacije
FPV MK570656	Australija	2017.
FPV MK570710	Australija	2017.
FPV MK570664	Australija	2017.
FPV MK570706	Australija	2018.
FPV KX434462	Italija	2015.
FPV U22189	SAD	1962.
FPV M10824	SAD	1966.
GE 98	Hrvatska	2020.
FPV MK570644	Australija	2015.
FPV MK570645	Australija	2015.
FPV EU498716	UK	2007.
FPV EU659112	SAD	1964.
FPV EU498713	UK	2006.
FPV X55115	Australija	1970.
FPV AB000056	Japan	1974.
FPV EU498714	UK	2006.
FPV U22187	SAD	1990.
GE 13	Hrvatska	2017.
FPV Purevax		
FPV Felocell		
FPV MK570703	Novi Zeland	2017.
FPV D88287	Francuska	1968.
FPV EU498717	UK	2007.
FPV MK570709	Australija	2017.
FPV MK570715	Australija	2018.

Tablica 11. Uzorci FPV-a koji pripadaju skupini Europe 2005-2020

Oznaka uzorka	Zemlja podrijetla	Godina izolacije
GE 42 20	Hrvatska	2018.
GE 5 20	Hrvatska	2018.
GE 28 20	Hrvatska	2018.
GE 6 20	Hrvatska	2019.
GE 223	Hrvatska	2018.
GE 181	Hrvatska	2018.
GE 130	Hrvatska	2016.
GE 219	Hrvatska	2018.
v 146	Hrvatska	2019.
v 148	Hrvatska	2019.
GE 13	Hrvatska	2020.
GE 52	Hrvatska	2015.
GE 206	Hrvatska	2018.
v 90	Hrvatska	2019.
GE 169	Hrvatska	2018.
v 38	Hrvatska	2020.
GE 184	Hrvatska	2018.
GE 43 20	Hrvatska	2018.
v 37	Hrvatska	2020.
v 8	Hrvatska	2020.
GE 213	Hrvatska	2018.
GE 26	Hrvatska	2016.
GE 205	Hrvatska	2018.
GE 216	Hrvatska	2018.
GE 17	Hrvatska	2019.
v 132	Hrvatska	2019.
v 114	Hrvatska	2020.
GE 4 20	Hrvatska	2018.
FPV EU498702	Italija	2006.
GE 11	Hrvatska	2016.
v 141	Hrvatska	2020.
GE 10	Hrvatska	2016.
GE 7	Hrvatska	2016.
GE 3	Hrvatska	2016.
GE 36 20	Hrvatska	2019.
GE 30 20	Hrvatska	2019.
GE 27 20	Hrvatska	2019.
v 75	Hrvatska	2019.
GE 159	Hrvatska	2018.
v 121	Hrvatska	2020.

v 111	Hrvatska	2020.
v 116	Hrvatska	2020.
v 122	Hrvatska	2020.
v 124	Hrvatska	2020.
GE 358	Hrvatska	2016.
GE 260	Hrvatska	2018.
v 21	Hrvatska	2018.
v 105	Hrvatska	2020.
v 120	Hrvatska	2020.
GE 256	Hrvatska	2018.
FPV KT240129	Portugal	2007.
FPV KT240131	Portugal	2008.
FPV KU248464	Portugal	2014.
FPV EU221279	Portugal	2005.
FPV KT240135	Portugal	2014.
FPV EU221280	Portugal	2006.
FPV KT240133	Portugal	2013.
FPV EU498697	Italija	2006.
FPV EU498689	Italija	2004.
FPV EU498709	Italija	2006.
FPV KP769859	Belgija	2013.
v 72	Hrvatska	2020.
v 97	Hrvatska	2019.
FPV EU498684	Italija	2002.
FPV EU498694	Italija	2005.
FPV EU498712	Italija	2004.
FPV EU498691	Italija	2004.
FPV EU498700	Italija	2006.
FPV EU498688	Italija	2004.
FPV EU498685	Italija	2003.
FPV EU498695	Italija	2005.
FPV EU498711	Italija	2006.

5. RASPRAVA

Panleukopenija mačaka ili zarazni mačji enteritis danas je jedna od najznačajnijih zaraznih bolesti mačaka sa smrtnošću mačića i do 90% (GREENE, 2012.), te je moguće da kao najstarija poznata virusna bolest mačaka datira još iz 1800-ih godina (FAIRWATER, 1876.; SCOTT, 1987.). Za razliku od pasa, mačke se mogu zaraziti s oba soja CPPV-1 (GREENE, 2012.). Do danas na području RH ne postoje podaci o opsežnijem istraživanju epizootologije panleukopenije mačaka što ovaj specijalistički rad čini posebno zanimljivim. Istraživanje provedeno za potrebe izrade rada daje prve opsežne podatke o molekularnoj epizootologiji infekcije, proširenosti, čimbenicima rizika i kliničkom očitovanju panleukopenije mačaka na području grada Zagreba. Uvidom u podatke prikupljene za potrebe ovog istraživanja u razdoblju od 2015. do 2020. godine, kod 211 mačaka koje su pokazivale kliničke znakove akutnog gastroenteritisa, s područja grada Zagreba, infekcija virusom panleukopenije mačaka dokazana je PCR metodom u njih 130, te vrijednost prevalencije iznosi 61,61%. Vrlo niska prevalencija dokazana je u Seulu, Koreja, gdje su uzorci krvi uzeti od 100 mačaka koje su sa svojim vlasnicima došle u kliniku na preventivni pregled, sterilizaciju ili cijepljenje, te od 100 mačaka lualica uhvaćenih unutar vladinog programa sterilizacije. Dokaz uzročnika učinjen je PCR metodom, te je prevalencija iznosila svega 2% (KIM i sur., 2013.). Podaci iz drugih europskih zemalja govore o vrijednosti seroprevalencije, iako nije bilo moguće usporediti te vrijednosti zbog korištenja različitih dijagnostičkih metoda u otkrivanju FPV-a sve govore da je virus značajno proširen u populaciji mačaka. Na području južne Njemačke seroprevalencija iznosi 70,6% među mačkama kojima je vađena krv na preventivnim pregledima ili zbog bolesti u dijagnostičke svrhe, a imaju vlasnika (MENDE i sur., 2014.). Kod mačaka lualica na području grada Milana u Italiji, koje su uhvaćene za potrebe sterilizacije, seroprevalencija FPV-a iznosila je 45,7% (DALL'ARA i sur., 2019.). Vrlo visoka seroprevalencija od 92,8% zabilježena

je među kostarikanskim mačkama, čiji su vlasnici prilikom posjeta veterinarskoj klinici dobrovoljno sudjelovali u ovom istraživanju ili su uzorci krvi sakupljeni obilazeći domaćinstva (BLANCO i sur., 2009.). Prevalencija dobivena ovim istraživanjem sa svojom vrijednošću od 61,61% dosta je visoka i ukazuje na to koliko je zarazna panleukopenija važna kao uzročnik akutnog gastroenteritisa u mačaka na području RH.

S obzirom na činjenicu da na području RH ne postoje podaci o većem sustavnom istraživanju panleukopenije mačaka, uz pomoć dostupnih anamnestičkih podataka nastojalo se doći do čimbenika dispozicije u populaciji mačaka grada Zagreba, te proširenosti sojeva CPPV-1 i njihovog utjecaja na kliničku sliku. Uvriježeno je mišljenje kako od panleukopenije mačaka najčešće oboljevaju mačići, što je i dokazano tijekom godina mnogim istraživanjima u raznim državama svijeta (SCOTT i sur., 1970.; PORPORATO i sur., 2018.), te je potvrđeno i ovim istraživanjem. Naime, mlađe mačke češće su oboljevale od FPV soja, te je medijan iznosio 0,79 godina. Zanimljiv je medijan soja CPV-2 od 4,5 godine, što dodatno potvrđuje stručni doprinos ovog specijalističkog rada kojim je otkriven do sada nepoznat podatak. Razlozi zbog kojih bolest većinom zahvaća mačiće su afinitet virusa prema brzodijelećim stanicama u S-fazi (GREENE, 2012.), zatim kod mlađih životinja klinička slika je vidljivija s obzirom na to da se jače ispoljava zbog pada kolostralne zaštite prije infekcije FPV-om. Teža klinička slika također će prije navesti vlasnika da zatraži veterinarsku pomoć za svoju životinju. Teško bolesne odrasle mačke imaju običaj odlutati i izolirati se od okoline na neko skrovito mjesto i uginuti, te je za pretpostaviti kako ih se rijede dovodi veterinaru. Povraćanje i proljev smatra se dijelom klasične kliničke slike panleukopenije mačaka (GREENE, 2012.), no ovo istraživanje nije dokazalo bitnu razliku u pojavi proljeva i povraćanja između mačaka kojima je dokazana prisutnost sojeva CPPV-1 i negativnih

mačaka. Istraživanje provedeno na mačkama pozitivnim na zaraznu panleukopeniju, koje su imale vlasnike ili su bile iz skloništa za životinje, pokazalo je pojavu proljeva u 69,3%, povraćanje u 62,7% mačaka, te krvavi proljev u samo 14,1% mačaka. Drugi autori su ovo pojasnili kao mogućnost da su neke mačke uginule u perakutnoj fazi bolesti prije nego su pokazale kliničke znakove probavnog sustava (KRUSE i sur., 2010.). Također, izostanak krvavog proljeva kod mačaka u tolikom postotku objašnjen je tako što crijevne kripte pasa mogu biti podložnije virusnom uništenju i ozbiljnom oštećenju sluznice u usporedbi s enterocitima mačaka. Postoji mogućnost da je lokalni imunitet crijeva kod mačaka (npr. Peyerove ploče) učinkovitiji nego kod pasa (KRUSE i sur., 2010.). Rezultati istraživanja psećeg parvovirusa provedeni na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu slični su dobivenima u ovom radu, te nisu dokazali da se pojava proljeva i/ili povraćanja razlikuje u pasa s akutnim gastroenteritisom i onih pozitivnih na CPV-2. Zanimljivo je i kako prisutnost krvavog proljeva, gotovo sigurnog dokaza parvovirusne infekcije u pasa, nije bila povezana s molekularnim dokazom CPV-2 (MILJAN, 2017.), a nije niti klinički znak koji bi upućivao na zaraznu panleukopeniju mačaka. Sam naziv bolesti govori o leukopeniji kao glavnom kliničkom znaku ove bolesti mačaka, no također nije dokazana statistički značajna razlika u broju leukocita između pozitivnih i negativnih životinja ($p=0,13$), iako su vrijednosti leukocita bile nešto niže u pozitivnih mačaka. Leukopenija se ne mora uvijek javiti, odnosno može biti prikrivena porastom broja neutrofila uslijed istovremene bakterijske infekcije (GREEN i DECARO, 2011.). Ono što bi moglo biti od značaja u dijagnostici za veterinare praktičare jest nalaz eozinopenije i trombocitopenije u pozitivnih mačaka kod prvog kliničkog pregleda. Krvna slika je pokazala statistički značajnu eozinopeniju kod pozitivnih mačaka ($p=0,03$), kao i znatno smanjene vrijednosti trombocita u krvi mačaka kod kojih je potvrđen virus ($p=0,04$). Drugi autori također prijavljuju slične rezultate, pa je tako najčešći nalaz krvne slike u mačaka pozitivnih na sojeve

CPPV-1, uz leukopeniju i trombocitopenija, s tim da je broj leukocita bio značajno snižen kod mačaka koje nisu preživjele bolest u usporedbi s onim životinjama koje su ju preživjele (KRUSE i sur., 2010.). Također, Kruse i suradnici (2010.) napominju kako koncentracija albumina i kalija u serumu isto tako može poslužiti kao prognostički pokazatelji u mačaka koje boluju od zarazne panleukopenije. Sličan nalaz se može naći i u krvnoj slici pasa pozitivnih na CPV-2: srednja vrijednost eozinofila u krvi pasa koji nisu preživjeli bolest 24 i 48 sati nakon zaprimanja na kliniku bila je znatno ispod donje referentne vrijednosti za eozinofile (GODDARD i sur., 2008.). Dakle, iz ovog istraživanja može se zaključiti kako se klinička slika zarazne panleukopenije mačaka bitno razlikuje od dosadašnjih saznanja, pa umjesto proljeva, krvavog proljeva i povraćanja, kao orijentir pri dijagnostici veterinarima praktičarima mogla bi poslužiti krvna slika kojom jasno prevladava eozinopenija i trombocitopenija umjesto leukopenije. Također, povećana potreba za bolničkim liječenjem pozitivnih mačaka ($p=0,009$) dodatno povisuje troškove liječenja životinja. Interesantan je podatak kako mačke pozitivne na FIV i FeLV češće obolijevaju od panleukopenije ($p=0,04$ za FIV, te $p=0,006$ za FeLV) što zapravo i govori u prilog dominantnom patološkom učinku FIV-a i FeLV-a, tj. narušavanju normalnog funkcioniranja imunskog sustava (HARTMANN, 2011.). Ovaj podatak bi mogao biti korisna smjernica vlasnicima FIV i FeLV pozitivnih mačaka da dodatno zaštite svoje životinje od zaraze panleukopenijom mačaka. Stopa preživljavanja među pozitivnim mačkama na području grada Zagreba iznosi zadovoljavajućih 55,55%, te je veća od stope koju navode drugi autori. Preživljavanje mačaka iz velikog skloništa za životinje u sjeverozapadnoj Italiji iznosilo je 20,3% za vrijeme izbijanja epidemije 2010. godine u tom skloništu (POROPATO i sur., 2018.). Stopa preživljavanja među mačkama primljenim na kliniku Sveučilišta u Munchenu, Njemačka, bila je 51,5% (KRUSE i sur., 2010.) i nešto je niža od podataka dobivenih ovim istraživanjem.

Određivanje nukleotidnog slijeda umnoženog odsječka genoma FPV i CPV-2 virusa i filogenetska analiza dobivenih podataka dala je uvid u rasprostranjenost soja CPPV-1 u mačaka na području grada Zagreba, te pregled molekularne epizootologije infekcije panleukopenijom mačaka. Uz pomoć dobivenih podataka bilo je moguće odrediti podtipove soja CPV-2. Poznato je kako se mačke mogu zaraziti sa oba soja CPPV-1, te su dosadašnja istraživanja govorila u prilog FPV-u koji uvelike dominira sa 90%, dok je zaraza sa podtipovima CPV-a otkrivena u oko 10% slučajeva (BARRS, 2019.). Pozitivan rezultat PCR metodom u ovom istraživanju od ukupno 130 uzoraka nukleotidni slijed je bilo moguće pouzdano odrediti za njih 75. Virus panleukopenije mačaka u ovom istraživanju dokazan je u 58 sekvenciranih uzoraka (73,33%), a pseći parvovirus bio je prisutan u 17 uzoraka što je činilo 22,67% od sveukupno 75 dobivenih sekvenci. Prevladao je tip virusa CPV-2c, te je pronađen u 13 (76,47%) od ukupno 17 uzoraka, što se poklapa sa zastupljenošću ovog tipa kod pasa gdje dominira sa udjelom od 59% (MILJAN, 2017.). CPV-2a pronađen je u dva uzorka (11,76%), za razliku od prijašnjih istraživanja koja su pokazala kako je dominantan podtip psećeg parvovirusa kod mačaka upravo CPV-2a (BARRS, 2019.). Naime, CPV-2a bio je jedini tip virusa izoliran u Japanu u istraživanju provedenom među mačkama koje su pokazivale kliničku sliku u kojem je 6% uzoraka izmeta bilo pozitivno na soj CPV-2 (MOCHIZUKI i sur., 1996.). U njemačkoj studiji iz ukupno 8% izoliranih uzoraka fecesa bolesnih mačaka koji su sadržavali CPV-2, nađena su dva tipa virusa: CPV-2a i CPV-2b (TRUYEN i sur., 1996b). Istraživanja u Kini također otkrivaju mali broj soja CPV-2 među pozitivnim uzorcima fecesa, krvi i sekreta mačaka sa znakovima proljeva i krvavog proljeva, samo 6% sa dominacijom CPV-2a tipa virusa (WU i sur., 2015.). U Indiji CPV-2a pronađen je u 25% uzoraka fecesa uzetih od domaćih mačaka sa kliničkim znakovima proljeva i bez njih, kao jedini tip virusa, međutim

ukupan broj uzoraka bio je samo četiri (MUKHOPADHYAY i sur., 2017.). Istraživanje koje je pokazalo sličnost sa rezultatima ovog rada provedeno je u Italiji među mačkama sa kliničkom dijagnozom panleukopenije i otkriva kako se u 8% uzoraka fecesa ili crijeva mačaka pozitivnih na CPV-2 soj nalaze CPV-2a i CPV-2c tipovi virusa (BATTILANI i sur., 2013.). Virusni sojevi razlikuju se između država, a vrlo vjerojatno i između područja unutar države, te navedeni rezultati govore u prilog važnosti istraživanju lokalne epizootiološke situacije. Dakle, postotak udjela CPV-a među pozitivnim uzorcima nešto je veći nego što su pokazala prethodna istraživanja, a razlog tome bi mogla biti onečišćenje nastalo zbog mjerenja temperature na klinici istim toplomjerom psima i mačkama i mogućnost da se na toplomjeru nalazio pseći parvovirus. Međutim od 2018. godine koriste se jednokratne zaštitne navlake za toplomjere, pa je sasvim sigurno da postoji zaraza sojem CPV-2 u mačaka na području RH.

Filogenetsko stablo za potrebe ovog rada napravljeno je prilikom filogenijske analize dobivenih nukleotidnih slijedova. Analiza stabla pokazala je svrstavanje postojećih sojeva FPV-a u tri različite skupine (hrvatsku, europsku i svjetsku). Sojevi iz ovog istraživanja uglavnom su grupirani sa sojevima iz europske (lokalne) skupine koja je ujedno i najveća. Nedavna istraživanja FPV-a u Kini govore o sličnim saznanjima, naime filogenetska analiza gotovo pune duljine genoma FPV-a pokazala je da se povijesni sojevi (izolirani 1970-ih i 1980 -ih) uglavnom ne nalaze u podnožju filogrupa, nego su ravnomjerno pomiješani s nedavno izoliranim sojevima (LEAL i sur., 2020.). Uzorci FPV-a nisu razvrstani ovisno o zemlji, već su raspoređeni u dvije velike skupine, lokalnu i međunarodnu, što se može objasniti postojanjem univerzalnog modela evolucije ili su posljedica globalizacije, pa su tako sojevi s različitih kontinenata međusobno slični. U prilog tome govori i istraživanje iz 2008. gdje je utvrđeno kako su sojevi FPV-a otkriveni u Italiji i Ujedinjenom

Kraljevstvu (UK) bili međusobno usko povezani, s nukleotidnom istovjetnošću od 99,1–100% i 99,4–99,8% među talijanskim i britanskim sojevima, te sa sličnošću među svim analiziranim nukleotidnim slijedovima od čak 98,6–100 % (DECARO i sur., 2008.). Sojevi izolirani iz populacije mačaka u Portugalu bili su u bliskoj vezi s talijanskim sojevima, jedan je bio usko povezan s izolatima iz Vijetnama i Kine, a dva su bila povezana sa starijim sojevima iz Sjedinjenih Američkih Država (SAD) (MIRANDA i sur., 2015.). Nadalje, FPV i CPV-2, iako genetski povezani, pokazuju potpuno različit obrazac evolucije. Evolucijski obrazac FPV-a u mačaka razlikuje se od obrasca CPV-2 u pasa. S obzirom na to da je došlo do usporavanja u evoluciji FPV-a u mačaka, on uglavnom evoluira slučajnim genskim pomakom (promjenom frekvencije alela u populaciji zbog slučajnog uzorkovanja). Za razliku od FPV-a, evolucija CPV-2 u psima odvija se pod određenom pozitivnom selekcijom na VP2 proteinu (HORIUCHI i sur., 1998.; IKEDA i sur., 2000.). Ono što je jedna od osnovnih značajki CPV-2 soja jest velika izmjenjivost njegovog genetskog materijala sa učestalosti od 10^{-4} izmjena po mjestu godišnje, što inače nije uobičajeno za DNK viruse (SHACKELTON i sur., 2005.).

Na osnovu aminokiselinskog slijeda FPV-a u ovom istraživanju ustanovljene su izmjene na pozicijama 91, 232, 303 i 562. Aminokiselinski ostaci 91, 232 i 303 tvore trnaste izdanke na trostrukoj osi simetrije, ujedno i mjesta vezanja protutijela, te je njihova funkcija izbjegavanje imunskog odgovora. Aminokiselinski ostatak 562 čini udubine na dvostrukoj osi simetrije, a njegova je zadaća činjenje kanjona još nedostupnijim za protutijela domaćina (TSAO i sur., 1991.). S obzirom na to da se spomenuti aminokiselinski ostatak ne nalazi na površini, njegova zadaća nije imunogena, već ima ulogu u izmjeni konformacije virusa. Što govori u prilog tome da evolucija ima učinak na veću stabilnost ili na bolje umnažanje virusa, a u ovom slučaju na bolje

prikrivanje kanjona za protutijela. Soj FPV iz ovog istraživanja ima aminokiselinske izmjene na mjestima 232, te se kod njega nalazi aminokiselina valin, a kod CPV-2 izoleucin, na 562. mjestu je valin, kod CPV-2 nalazi se serin. Mjesta 91 i 303 jednaka su u oba soja, 91. mjesto zauzima alanin, te 303. mjesto pripada fenilalaninu. Kod psećeg parvovirusa u pasa na području grada Zagreba dokazane su aminokiselinske izmjene u kapsidi terenskih sojeva CPV-2 na mjestima 297 i 373 koje su ustaljene, te također mogu utjecati na izbjegavanje imunosnog odgovora domaćina (MILJAN, 2017.). Vrlo vjerojatno izmjena aminokiseline na 297. mjestu djelomično sudjeluje u izbjegavanju imunosnog odgovora u cijepjenih pasa (MILJAN, 2017.), jer ona je sastavni dio trnastog izdanka na čije se epitope stvaraju protutijela u zaraženoj životinji (TSAO i sur., 1991.; PARKER i PARRISH, 1997.; TRUYEN, 2006.). Izmjena na 373. mjestu kod CPV-2c podtipa virusa također ima sličnu funkciju zbog uloge ovog aminokiselinskog ostatka u građi epitopa kapside virusa te izbjegavanja imunosnog odgovora (TSAO i sur., 1991.), a došlo je do izmjene aspartata u asparagin (MILJAN, 2017.). Kako je podudarnost nukleotidnih slijedova gena kapsidnih proteina sojeva FPV i CPV-2 veća od 98% (RHODE, 1985.; REED i sur., 1988.; PARRISH i sur., 1991.), potrebna je vrlo mala promjena unutar regije gena proteina omotača kako bi FPV postao sposoban replicirati se u pasa (PARRISH i sur.; 1988.; CHANG i sur., 1992.). Razlike između sojeva CPPV-1, kao što su raspon domaćina in vivo i in vitro, te antigenost, uvjetovane su izmjenama aminokiselinskih ostataka na proteinu ovojnice (PARRISH i sur., 1988.; PARRISH, 1991.; CHANG i sur., 1992.). Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako je izbjegavanje imunosnog odgovora glavni pokretač evolucije FPV-a, slično kao i kod CPV-2, međutim, izmjene u kapsidi su sporije nego kod pasa. Rezultati istraživanja molekularne epizootiologije, koji su prikazani i u ovom radu, neophodni su za praćenje pojave novih mutacija sojeva virusa FPV koji mogu dovesti do znatne izmjene u epizootiologiji infekcije, kako je to bio

i slučaj s pojavom CPV-2c u pasa (BUONAVOGLIA i sur., 2001.). Isto tako, praćenje mutacija virusa koje dovode do izbjegavanja imunosnog odgovora neophodno je da bi se po potrebi mogli mijenjati sojevi virusa u cjepivima u cilju pružanja optimalne zaštite.

Ovaj specijalistički rad donosi vrijedne zaključke o jednoj od najčešćih zaraznih bolesti mačaka, te ukazuje na probleme kliničkog prepoznavanja iste. Ustaljeno mišljenje o klasičnoj kliničkoj slici zarazne panleukopenije mačaka može voditi veterinara praktičara na krivi put prema odgovarajućoj dijagnozi i profilaksi. Stoga nova saznanja iznesena u ovom radu o drugačijoj kliničkoj slici i novom pristupu pri interpretaciji krvnih nalaza mogu biti od koristi veterinarima praktičarima. Kroz filogenetsku analizu sojeva CPPV-1 i njegovo praćenje, prati se i smjer evolucije, te način obrane domaćina od virusa, što može biti uvelike korisno kod usmjeravanja profilakse i imunoprofilakse ove bolesti. S obzirom na činjenicu kako je kod CPV-2 soja od njegovog prvog opisa do pojave tri različita podtipa (koji su u potpunosti zamijenili originalni tip 2 virusa), prošlo svega malo više od 20 godina, preporučljivo je nastaviti pratiti evoluciju FPV soja u mačaka, te se tako pripremiti na moguću pojavu novih sojeva kako bi bili spremni proizvesti cjepiva s odgovarajućim novim sojevima.

6. ZAKLJUČCI

1. Prevalencija zarazne panleukopenije mačaka u životinja koje su pokazivale kliničke znakove akutnog gastroenteritisa na području grada Zagreba iznosi visokih 61,61% sa stopom preživljavanja od 55,55%
2. U populaciji mačaka na području grada Zagreba prisutna su oba soja CPPV-1, FPV je dokazan u 73,33% sekvenciranih uzoraka, dok je CPV-2 bio prisutan u 22,67% uzoraka.
3. Tip CPV-2 soja virusa koji prevladava kod mačaka na području grada Zagreba je CPV-2c koji je pronađen u 76,47%, CPV-2a pronađen je u 11,76% uzoraka.
4. Mlađe životinje češće su oboljevale od FPV soja s medijanom od 0,79 godina, dok je soj CPV-2 bio češći kod starijih životinja i medijan je iznosio 4,5 godine.
5. Nije dokazana sezonalnost bolesti, iako je pojavnost oba soja bila najveća svakog mjeseca srpnja u periodu od 2015. do 2020. godine.
6. Krvna slika je pokazala statistički značajnu eozinopeniju kao i znatno smanjene vrijednosti trombocita u krvi pozitivnih mačaka, što bi moglo poslužiti u dijagnostici veterinarima praktičarima.
7. Kod FPV soja ustanovljene su izmjene aminokiselina na pozicijama 91, 232, 303 i 562. Aminokiselinski ostaci 91, 232 i 303 mjesta su vezanja protutijela, dok aminokiselinski

ostatak 562 ima zadaću činjenja kanjona još nedostupnijim za protutijela, te je dokazano kako je izbjegavanje imunskog odgovora glavni pokretač evolucije FPV soja.

8. Filogenetska analiza stabla dala je uvid u postojanje univerzalnog modela evolucije nastalog zbog globalizacije, što čini sojeve s različitih kontinenata međusobno sličnim.

7. LITERATURA

ADDIE, D. D., S. TOTH, H. THOMPSON, N. GREENWOOD, J. O. JARRETT (1998): Detection of feline parvovirus in dying pedigree kittens. *Vet. Rec.* 142, 353–356.

AGBANDJE, M., R. MCKENNA, M. G. ROSSMANN, M. L. STRASSHEIM, C. R. PARRISH (1993): Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles. *Proteins.* 16, 155-171.

ALLISON, A. B., D. J. KOHLER, A. ORTEGA, E. A. HOOVER, D. M. GROVE, E. C. HOLME, C. R. PARRISH (2014): Host-specific parvovirus evolution in nature is recapitulated by in vitro adaptation to different carnivore species. *PLoS Pathog.* 10, E1004475.

ALLISON, A. B., L. J. ORGANTINI, S. ZHANG, S. L. HAFENSTEIN, E. C. HOLMES, C. R. PARRISH, S. R. ROSS (2015): Single mutations in the VP2 300 loop region of the three-fold spike of the carnivore parvovirus capsid can determine host range. *J. Virol.* 2, 753-767.

ANONIMUS (2006): ABCD guidelines on Feline Panleukopenia. Dostupno na: http://abcdvets.org/guidelines/feline_panleukopenia/. Pristupljeno 29. rujna 2020.

ANONIMUS (2020): Feline Panleukopenia: Prevention, Management & Treatment. Dostupno na: <https://www.aspcapro.org/resource/feline-panleukopenia-prevention-management-treatment> Pristupljeno 20. rujna 2020.

AWAD, R. A., S. A. HASSAN, B. MARTENS (2019): Treatment of feline panleukopenia virus infection in naturally infected cats and its assessment. *J. Biol. Sci.* 19, 155-160.

BARRS, V. (2019): Feline panleukopenia: a re-emergent disease. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 49, 651-670.

BATTILANI, M., A. BALBONI, M. USTULIN, M. GIUNTI, A. SCAGLIARINI, S. PROSPERI (2011): Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in naturally infected cats. *Vet. Res.* 42, 1-43.

BATTILANI, M., A. BALBONI, M. GIUNTI, S. PROSPERI (2013): Co-infection with feline and canine parvovirus in a cat. *Vet. Ital.* 49, 127–9.

BLANCO, K., J. PRENDAS, R. CORTES, C. JIMENEZ, G. DOLZ (2009): Seroprevalence of viral infections in domestic cats in Costa Rica. *J. Vet. Med. Sci.* 71, 661-663.

- BUONAVOGLIA, C., V. MARTELLA, A. PRATELLI, M. TEMPESTA, A. CAVALLI, D. BUONAVOGLIA, G. BOZZO, G. ELIA, N. DECARO, L. CARMICHAEL (2001): Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82, 3021-3025.
- CARLSON, J. H., F. W. SCOTT, J. R. DUNCAN (1977): Feline panleukopenia I. Pathogenesis in germfree and specific pathogen-free cats. *Vet. Pathol.* 14, 79-88.
- CAVE, T. A., H. THOMPSON, S. W. J. REID, D. R. HODGSON, D. D. ADDIE (2002): Kitten mortality in the United Kingdom: a retrospective analysis of 274 histopathological examinations (1986 to 2000). *Vet. Rec.* 151, 497-501.
- CHALMERS, W. S., U. TRUYEN, N. M. GREENWOOD, W. BAXENDALE (1999): Efficacy of feline panleukopenia vaccine to prevent infection with an isolate of CPV2b obtained from a cat. *Vet. Microbiol.* 69, 41-45.
- CHANG, S. F., J. Y. SGRO, C. R. PARRISH (1992): Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *J. Virol.* 66, 6858 – 6867.
- COTMORE, S. F., M. AGBANDJE-MCKENNA, J. A. CHIORINI, D. V. MUKHA, D. J. PINTEL, J. QIU, M. SODERLUND-VENERMO, P. TATTERSALL, P. TIJSSEN, D. GATHERER, A. J. DAVIDSON (2014): The family Parvoviridae. *Arch. Virol.* 159, 1239-1247.
- CVETNIĆ, S. (1980): Parvovirusna infekcija pasa. *Praxis vet.* 28, 163-167.
- DALL'ARA P., C. LABRIOLA, E. SALA, E. SPADA, S. MAGISTERELLI, S. LAUZI (2019): Prevalence of serum antibody titres against feline panleukopenia, herpesvirus and calicivirus infections in stray cats of Milan. *Preventive Veterinary Medicine.* 167, 32-38.
- DAWSON, S., K. WILLOUGHBY, R. M. GASKELL, G. WOOD, W. S. CHALMERS (2001): A field trial to assess the effect of vaccination against feline herpesvirus, feline calicivirus and feline panleukopenia virus in 6-week-old kittens. *J. Feline Med. Surg.* 3, 17-22.
- DAY, M. J., M. C. HORZINEK, R. D. SCHULTZ, R. A. SQUIRES (2016): Guidelines for the vaccination of dogs and cats. Compiled by the vaccination guidelines group (VGG) of the 50 world small animal veterinary association (WSAVA). *J. Small Anim. Pract.* 57, E1-E45.
- DECARO, N., C. DESARIO, G. ELIA, V. MARTELLA, V. MARI, A. LAVAZZA, M. NARDI, C. BUONAVOGLIA (2008): Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol.* 31, 125-130.

DIGANGI, B., J. K. LEVY, B. GRIFFIN, M. J. REESE, P. A. DINGMAN, S. J. TUCKER, E. J. DUBOVI (2012): Effects of maternally-derived antibodies on serologic responses to vaccination in kittens. *J. Feline Med. Surg.* 14, 118–123.

DOI, K., H. OKAWA, S. SAKUMA, A. OKANIWA (1975): Histopathology of feline panleukopenia in domestic cats. *National Institute of Animal Health Quarterly.* 15, 76-85.

FAIRWEATHER, J. (1876): Epidemic among cats in Delhi, resembling cholera. *Lancet.* 2, 115–150.

FASTIER, L. B. (1986): Feline panleucopenia – a serological study. *Vet. Rec.* 83, 653–654.

FISCUS, S. A., M. M. MILDBRAND, J. C. GORDON, Y. A. TERAMOTO, S. WINSTON (1985): Rapid enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to canine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.* 46, 859–863.

GASKELL, R. M., B. TENNANT, M. BENNETT, K. WILLOUGHBY (1996): Feline and canine infectious diseases (Gaskell, R. M., ur.), Iowa State Press, Ames, Iowa, str. 190.

GELATT, K. N., A. VAN DER WOERDT, K. L. KETRING, S. E. ANDREW, D. E. BROOKS, D. J. BIROS, H. M. DENIS, T. J. CUTLER (2001): Enrofloxacin associated retinal degeneration in cats. *Vet. Ophthalmol.* 4, 99-106.

GODDARD, A., A. L. LEISEWITZ, M. M. CHRISTOPHER, N. M. DUNCAN, P. J. BECKER (2008): Prognostic usefulness of blood leukocyte changes in canine parvoviral enteritis. *J. Vet. Intern. Med.* 22, 309-316.

GORE, T. C., N. LAKSHMANAN, J. R. WILLIAMS, F. F. JIRJIS, S. T. CHESTER, K. L. DUNCAN, M. J. COYNE, M. A. LUM, F. J. STERNER (2006): Three-year duration of immunity in cats following vaccination against feline rhinotracheitis virus, feline calicivirus and feline panleukopenia virus. *Vet. Ther.* 7, 213–222.

GOTO, H. (1975): Feline panleukopenia in Japan. II. Hemagglutinability of the isolated virus. *Nippon Juigaku Zasshi.* 37, 239–245.

GOVINDASAMY, L., K. HUEFFER, C. R. PARRISH, M. AGBANDJE-MCKENNA (2003): Structures of host range-controlling regions of the capsids of canine and feline parvoviruses and mutants. *J. Virol.* 77, 12211–12221.

GREENE, C. E., D. D. ADDIE (2006): Feline parvovirus infections. U: Infectious diseases of the dog and cat (Greene, C.E., ur.), Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, str. 78-88.

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. 67-75.

GREEN, C. E. (2012): Feline enteric viral infections. U: Infectious diseases of the dog and the cat, 4th ed (Green C. E., ur.), Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, str. 80-88.

HAMMON, W. D., J. F. ENDERS (1939a): A virus disease of cats, principally characterized by aleucocytosis, enteric lesions and the presence of intranuclear inclusion bodies. *J. Exp. Med.* 69, 327-353.

HARTMANN, K. (2011): Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 143, 190-201.

HOFMANN-LEHMANN, R., D. FEHR, M. GROB, M. ELGIZOLI, C. PACKER, J. S. MARTENSON, S. J. O'BRIEN, H. LUTZ (1996): Prevalence of antibodies to feline parvovirus, calicivirus, herpesvirus, coronavirus and immunodeficiency virus and of feline leukemia virus antigen and the interrelationship of these viral infections in free-ranging lions in east Africa. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3, 554-62.

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.

HOSOKAWA, S., S. ICHIJO, H. GOTO (1987): Clinical, hematological, and pathological findings in specific pathogen-free cats experimentally infected with feline panleukopenia virus. *Jap. J. Vet. Sci.* 49, 43-50.

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

ICHIJO, S., S. OSAME, T. KONISHI, H. OGATA (1976): Clinical and hematological findings and myelograms on feline panleukopenia. *Jap. J. Vet. Sci.* 38, 197-205.

IKEDA, Y., M. MOCHIZUKI, R. NAITO, K. NAKAMURA, T. MIYAZAWA, T. MIKAMI, E. TAKAHASHI (2000): Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology.* 278, 13-19.

JAKEL, V., K. CUSSLER, K. M. HANSCHMANN, U. TRUYEN, M. KÖNIG, E. KAMPHUIS, K. DUCHOW (2012): Vaccination against Feline Panleukopenia: implications from a field study in kittens. *BMC Vet. Res.* 8, 62.

KIM, S. G., K. I. LEE, H. J. KIM, H. M. PARK (2013): Prevalence of feline panleukopenia virus in stray and household cats in Seoul, Korea. *J. Vet. Clin.* 30, 333-338.

KRUSE, B. D., S. UNTERER, K. HORLACHER, C. SAUTER-LOUIS, K. HARTMANN (2010): Prognostic factors in cats with feline panleukopenia. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 1271-1276.

KUMAR, S., STECHER G., K. TAMURA (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874.

LAPPIN M. R., J. ANDREWS, D. SIMPSON, W. A. JENSEN (2002): Use of serologic tests to predict resistance to feline herpesvirus 1, feline calicivirus, and feline parvovirus infection in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220, 38–42.

LARSEN, S., A. FLAGSTAD, B. AALBAK (1976): Experimental feline panleukopenia in the conventional cat. *Vet. Pathol.* 13, 216-240.

LAWRENCE, J. S., J. T. SYVERTON (1938): Spontaneous agranulocytosis in the cat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 38, 914-918.

LAWRENCE, J. S., J. T. SYVERTON, J. S. SHAW, F. P. SMITH (1940): Infectious feline agranulocytosis. *Am. J. Pathol.* 16, 333-354.

LEAL, É., R. LIANG, Q. LIU, F. VILLANOVA, L. SHI, L. LIANG, J. LI, S. S. WITKIN, S. CUI (2020): Regional adaptations and parallel mutations in Feline panleukopenia virus strains from China revealed by nearly-full length genome analysis. *PloS One.* 15, e0227705.

LEASURE, E. E., H. F. LIENARDT, F. R. TABERNER (1934): Feline infectious enteritis. *North Am. Vet.* 15, 30–34.

MACLACHLAN, N. J., E. J. DUBOVI (2011): Parvoviridae. U: *Fenner's veterinary virology*, 4th ed, (MacLachlan, N. J., E. J. Dubovi, ur.), Saunders Elsevier, Oxford, UK, str. 225-235.

MARKEY, B., F. LEONARD, M. ARCHAMBAULT, A. CULLINANE, D. MAGUIRE (2013): Parvoviridae. U: *Clinical veterinary Microbiology* 2nd ed. (Markey, B., ur.), Mosby Elsevier, Edinburg, UK, str. 541-547.

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.

McGAVIN, M. D., J.F. ZACHARY (2008): Probavni sustav - Crijevne bolesti mesoždera. U: *Specijalna veterinarska patologija*, 4th ed, (Grabarević, Ž., ur.), Stanek, Varaždin, str. 79-80.

MENDE, K., B. STUETZER, U. TRUYEN, K. HARTMANN (2014): Evaluation of an in-house dot enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against feline panleukopenia virus. *J. Feline Med. Surg.* 16, 805-811.

MIHOKOVIĆ BUHIN, I., L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, D. HUBER, V. STEVANOVIĆ (2019): Panleukopenija mačaka. *Hr. Vet. Vjesnik*, 5/6, 50-53.

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

MIRANDA, C., C. R. PARRISH, G. THOMPSON (2016): Epidemiological evolution of canine parvovirus in the Portuguese domestic dog population. *Vet. Microbiol.* 183, 37-42.

MIYAZAWA, T., Y. IKEDA, K. NAKAMURA, R. NAITO, M. MOCHIZUKI, Y TOHYA, D. VU, T. MIKAMI, E. TAKAHASHI (1999): Isolation of feline parvovirus from peripheral blood mononuclear cells of cats in northern Vietnam. *Microbiol. Immunol.* 43, 609–612.

MOCHIZUKI, M., T. AKABOSHI (1988): Structural polypeptides of feline parvovirus subspecies viruses. *Jap. J. Vet. Sci.* 50, 1207-1214.

MOCHIZUKI, M., M. HORIUCHI, H. HIRAGI, M. C. SAN GABRIEL, N. YASUDA, T. UNO (1996): Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2101-2105.

MUKHOPADHYAY, H. K., M. NOOKALA, N. R. THANGAMANI, A. SIVAPRAKASAM, P. X. ANTONY, J. THANISLASS, M. V. SRINIVAS, R. M. PILLAI (2017): Molecular characterisation of parvoviruses from domestic cats reveals emergence of newer variants in India. *J. Feline Med. Surg.* 19, 846–852.

MUZYCZKA, N., K. I. BERNS (2001): Parvoviridae: the viruses and their replication. U: *Fundamental virology*, vol. 4. (Knipe D. M., P. M. Howley, ur.), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. str. 1089-1121.

NAKAMURA, M., Y. TOHYA, T. MIYAZAWA, M. MOCHIZUKI, H. T. PHUNG, N. H. NGUYEN, L. M. HUYNH, L. T. NGUYEN, P. N. NGUYEN, P. V. NGUYEN, N. P. NGUYEN, H. AKASHI (2004): A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch. Virol.* 149, 2261-2269.

NANDI, S., K. KUMAR (2010): Canine Parvovirus: Current perspective. *Indian J. Virol.* 21, 31-44.

NEUERER, F. F., K. HORLACHER, U. TRUYEN, K. HARTMANN (2008): Comparison of different in-house test systems to detect parvovirus in faeces of cats. *J. Feline Med. Surg.* 10, 247-251.

PARKER, J. S., C. R. PARRISH (1997): Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. *J. Virol.* 71, 9214-9222.

PARKER, J. S., W. J. MURPHY, D. WANG, S. J. O'BRIEN, C. R. PARRISH (2001): Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. *J. Virol.* 75, 3896–3902.

PARRISH, C. R., P. H. O'CONNELL, J. F. EVERMANN, L. E. CARMICHAEL (1985): Natural variation of canine parvovirus. *Science.* 230, 1046-1048.

PARRISH, C. R., P. HAVE, W. J. FOREYT, J. F. EVERMANN, M. SENDA, L. E. CARMICHAEL (1988): The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J. Gen. Virol.* 69, 1111-1116.

PARRISH, C. R., C. F. AQUADRO, M. L. STRASSHEIM, J. F. EVERMANN, J. Y. SGRO, H. O. MOHAMMED (1991): Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J. Virol.* 12, 6544- 6552.

PARRISH, C. R. (1995): Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Baillieres. Clin. Haematol.* 8, 57-71.

PEREIRA, C. A., T. A. MONEZI, D. U. MEHNERT, M. D'ANGELO, E. L. DURIGON (2000): Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.* 75, 127-133.

PFANKUCHE, V. M., W. K. JO, E. VAN DER VRIES, N. JUNGWIRTH, S. LORENZEN, A. OSTERHAUS, W. BAUMGÄRTNER, C. PUFF (2018): Neuronal vacuolization in feline

panleukopenia virus infection. *Vet. Pathol.* 55, 294-297.

PORPORATO, F., M. C. HORZINEK, R. HOFMANN-LEHMANN, F. FERRI, G. GERARDI, B. CONTIERO, T. VEZZOSI, P. ROCCHI, E. AURIEMMA, H. LUTZ, E. ZINI (2018): Survival estimates and outcome predictors for shelter cats with feline panleukopenia virus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2, 188-195.

POVEY, R.C. (1973): Feline panleukopenia – which vaccine? *J. Small Anim. Pract.* 14, 399–406.

REED, A. P., E. V. JONES, T. J. MILLER (1988): Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J. Virol.* 62, 266-276.

REYNOLDS, H. A. (1970): Pathological changes in virus enteritis of mink. *Can. J. Comp. Med.* 34, 155-163.

RHODE, S. L. III. (1985): Nucleotide sequence of the coat protein gene of canine parvovirus. *J. Virol.* 54, 630-633.

ROHOVSKY, M. W., R. A. GRIESEMER (1967): Experimental feline infectious enteritis in the germfree cat. *Pathol. Vet.* 4, 391-410.

RYSER-DEGIORGIS, M. P., R. HOFMANN-LEHMANN, C. M. LEUTENEGGER, C. H. SEGERSTAD, T. MÖRNER, R. MATTSSON, H. LUTZ (2005): Epizootiologic investigations of selected infectious disease agents in free-ranging Eurasian lynx from Sweden. *J. Wildl. Dis.* 41, 58–66.

SCHUNCK, B., W. KRAFT, U. TRUYEN (1995): A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *J. Virol. Methods.* 55, 427–33.

SCOTT, F. W., C. K. CSIZA, J. H. GILLESPIE (1970): Maternally derived immunity to feline panleukopenia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 156, 439–453.

SCOTT, F. W. (1987): Viral diseases - panleukopenia. U: Diseases of the cat, vol. 1. (Holzworth J., ur.), Saunders, Philadelphia, str. 182–193.

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.

STUETZER, B., K. HARTMANN (2014): Feline parvovirus infection and associated diseases. *Vet. J.* 20, 150–155.

SQUIRES, R. A. (2013): Feline Panleukopenia (Feline Infectious Enteritis, Feline Parvoviral Enteritis). Dostupno na: <https://www.msdtvetmanual.com/generalized-conditions/feline-panleukopenia/overview-of-feline-panleukopenia>
Pristupljeno 16. rujna 2020.

TAMURA, K. (1992): Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9, 678-687.

TRUYEN, U., C. R. PARRISH (1992): Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *J. Virol.* 66, 5399–5408.

TRUYEN, U., A. GRUENBERG, S. F. CHANG, B. OBERMAIER, P. VEIJALAINEN, C. R. PARRISH (1995): Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J. Virol.* 69, 4702-4710.

TRUYEN, U., J. F. EVERMANN, E. VIELER, C. R. PARRISH (1996a): Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology.* 215, 186-189.

TRUYEN, U., G. PLATZER, C. R. PARRISH (1996b): Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. *Vet. Rec.* 138, 365–366.

TRUYEN, U. (2006): Evolution of canine parvovirus - a need for new vaccines? *Vet. Microbiol.* 117, 9-13.

TRUYEN, U., D. ADDIE, S. BELÁK, C. BOUCRAUT-BARALON, H. EGBERINK, T. FRYMUS, T. GRUFFYDD-JONES, K. HARTMANN, M. J. HOSIE, A. LLORET, H. LUTZ, F. MARSILIO, M. G. PENNISI, A. D. RADFORD, E. THIRY, M. C. HORZINEK (2009): Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 11, 538-546.

TRUYEN, U., C. R. PARRISH (2013): Feline panleukopenia virus: Its interesting evolution and current problems in immunoprophylaxis against a serious pathogen. *Vet. Microbiol.* 165, 29-32.

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.

VERGE, J., CRISTOFORONI, N. (1928): La gastroenterite infectieuse des chats est elle due a un virus filtrable? Comptes rendus des seances de la Societe de biologie. Paris. 99, 312–314.

YANG, S., S. WANG, H. FENG, L. ZENG, Z. XIA, R. ZHANG, X. ZOU, C. WANG, Q. LIU, X. XIA (2010): Isolation and characterization of feline panleukopenia virus from a diarrheic monkey. *Vet. Microbiol.* 143, 155-159.

WU, J., X. T. GAO, S. H. HOU, X. Y. GUO, X. S. YANG, W. F. YUAN, T. XIN, H. F. ZHU, H. JIA (2015): Molecular epidemiological and phylogenetic analyses of canine parvovirus in domestic dogs and cats in Beijing, 2010-2013. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 1305–1310.

ZHOU, P., W. ZHENG, X. ZHANG, S. LI (2017): The genetic evolution of canine parvovirus - a new perspective. *PloS One.* 12, e0175035.

Popis skraćenica

Ala = alanin

Asn = asparagin

Asp = asparaginska kiselina

bp = bazni parovi

CPPV-1 = (lat. *carnivore protoparvovirus-1*) protoparvovirus mesojeda 1

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

CrFK = (eng. *Crandell-Rees Feline Kidney*) Crandell-Rees stanice mačjeg bubrega

DNK = deoksiribonukleinska kiselina

FeLV = (eng. *feline leukemia virus*) virus mačje leukemije

FIV = (eng. *feline immunodeficiency virus*) virus mačje imunodeficijencije

FPV = (eng. *feline panleukopenia virus*) virus panleukopenije mačaka

ELISA = (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) enzimski povezani imunosorbentni test

EDTA = etilendiamintetraoctena kiselina

Glu = glutamin

Gly = glicin

Ile = izoleucin

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

MLV = (eng. *modified live vaccines*) modificirana živa cjepiva

mRNA = (eng. *messenger RNA*), glasnička ribonukleinska kiselina

MYA-1 = Miyazakijeve linijske stanice mačjih T-limfoblastoida

NS = nestrukturalni protein

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

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

Phe = fenilalanin

SAD = Sjedinjene Američke Države

Ser = serin

TAE = tris acetat etilendiamintetraoctena kiselina

TfR = (*eng. transferrin type-1 receptor*) transferinski receptor tipa 1

UK = Ujedinjeno Kraljevstvo

Val = valin

VP = strukturalni kapsidni protein

8. ŽIVOTOPIS

Nina Vukelić Dasović, dr.med.vet., rođena je 7. kolovoza 1983. u Zagrebu gdje je nakon završene I. gimnazije upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Nakon stjecanja diplome 2012. seli u Rijeku gdje odrađuje jednogodišnji staž u dvije ambulante male prakse u Matuljima i Viškovu, te provodi 3 mjeseca na Hrvatskom Veterinarskom Institutu, Veterinarski zavod Rijeka, u Laboratoriju za mikrobiologiju hrane i hrane za životinje. Godinu 2015. i 2016. provodi u Corku, Irska, radeći i razne poslove van struke. Povratkom u Rijeku zapošljava se u ambulanti male prakse, ljekarni i pet shopu "HOP" na Viškovu u kojoj je provela dio staža. Seli u Zagreb i 2018. godine konačno upisuje dugo željeni poslijediplomski studij Mikrobiologija i epizootiologija na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U ljeto 2019. provodi tri mjeseca na Zavodu za parazitologiju i parazitarne bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta Federico II u Napulju u sklopu Erasmus+ stručne prakse. Aktivno govori engleski, španjolski i talijanski jezik, služi se slovenskim i osnovama njemačkog jezika.