

Epizootiološki čimbenici infekcije respiratornim koronavirusom pasa u Republici Hrvatskoj



Ritoša, A.¹, I. Benvin², Lj. Barbić², V. Stevanović²

Sažetak

Virus psećeg respiratornog koronavirusa (engl. *Canine respiratory coronavirus*, CRCoV), iz porodice betakoronavirusa, opisan je diljem svijeta i jedan je od uzročnika iz kompleksa psećih zaraznih respiratornih bolesti (engl. *Canine infectious respiratory disease complex*, CIRDC). Virus se širi izlučevinama dišnog sustava, a brzom širenju pridonose mjesta na kojima se nalazi mnogo pasa, poput skloništa za životinje i izložbi pasa.

U ovom su istraživanju pretraženi obrisci nosa i ždrijela 258 pasa, od kojih je 68 imalo kliničke znakove bolesti dišnog sustava. Od 258 pasa, njih 88 bilo je iz skloništa za nezbrinute životinje, dok su ostali bili vlasnički psi. Za dokazivanje prisutnosti

uzročnika u pretraživanom materijalu primijenjena je molekularna metoda lančane reakcije polimerazom s obrnutom transkripcijom (engl. *Reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR).

Virus CRCoV dokazan je u 3,87 % pretražvanih pasa. Infekcija je bila znatno češća u pasa iz skloništa za nezbrinute životinje u odnosu na vlasničke pse, dok spol i dob nisu znatnije utjecali na rezultate pretrage. CRCoV češće je bio dokazan u pasa bez kliničkih znakova bolesti dišnog sustava što bi moglo upućivati na to da CRCoV nije važan kao samostalan uzročnik dišnih bolesti pasa odnosno CIRDC-a.

Ključne riječi: CRCoV, pas, CIRDC, epizootiološki čimbenici, RT-PCR

UVOD

Zarazni traheobronhitis, zarazni kašalj ili kašalj štenare (engl. *Canine infectious respiratory disease complex*, CIRDC) akutna je i vrlo kontagiozna bolest dišnog sustava pasa (Appel i Binn, 1987.). Bolest je najčešće opisana u pasa smještenih u skupinama kao što su skloništa, uzgajivačnice ili centri za obuku pasa, no vrlo se često dijagnosticira u kućnih ljubimaca koji dolaze u kontakt s drugim psima na mjestima poput izložbi pasa, veterinarskih ambulanti i slično (Buonavoglia i Martella, 2007.; Mochizuki i sur., 2008.; Singleton i sur., 2019.). Etiologija CIRDC-a je multikauzalna. Primarnim se virusnim uzročnicima smatraju virus parainfluence pasa, pseći adenovirus 2, virus štenećaka i pseći herpesvirus 1 (Ditchfield i sur., 1962.; Karpas i sur.,

1968.; Appel i Percy, 1970.; Ronsse i sur., 2002.; Day i sur., 2020.). U protekla su dva desetljeća u etiologiju CIRDC-a dodani novi uzročnici, među kojima i Pseći respiratorni koronavirus (engl. *Canine respiratory coronavirus*, CRCoV) (Erles i sur., 2003.).

Virus CRCoV prvi je put izoliran 2003. godine u pasa oboljelih od CIRDC-a, smještenih u skloništu u Ujedinjenom Kraljevstvu. Najčešće je dokazan u pasa s blagim kliničkim znakovima bolesti dišnog sustava (Erles i sur., 2003.). Pretpostavlja se da se virus širi dišnim sekretima izravnim kontaktom ili neizravno, kontaminiranim površinama, a njegovo brzo širenje među psima u skloništimu upućuje na to da je virus izrazito kontagiozan (Erles i Brown-

¹ Ana Ritoša, dr. med. vet., Veterinarska ambulanta za male životinje „Buba“, Ul. Dore Pfanove 11, 10110, Zagreb
* e-adresa: anaritosa9@gmail.com

² Iva Benvin, dr. med. vet., prof. dr. sc. Ljubo Barbić, izv. prof. dr. sc. Vladimir Stevanović, Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

lie, 2005.). U prošlosti su se koronavirusi dijelili na skupinu jedan, skupinu dva i skupinu tri. CRCoV bio je smješten u skupinu dva u kojoj se nalazio i goveđi koronavirus (engl. *Bovine coronavirus*, BCoV) koji mu je genetski najrodniji (Erles i Brownlie, 2008.). Prema sadašnjoj podjeli porodica *Coronaviridae* dijeli se u potporodice *Coronavirinae* i *Torovirinae*, a potporodica *Coronavirinae* podijeljena je i na rodove *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* i *Gammacoronavirus* (Payne, 2017.). Betakoronavirusi su ekvivalentni skupini dva, stoga CRCoV pripada u rod *Betacoronavirus*.

Ovaj je virus opisan diljem svijeta (Kaneshima i sur., 2006.; Priestnall i sur., 2006.; Yachi i Mochizuki, 2006.; Decaro i sur., 2007.; Priestnall i sur., 2007.; Erles i Brownlie, 2008.; Knesl i sur., 2009.; Spiss, 2012.; Schulz i sur., 2014.; More i sur., 2020.) i jedan je od važnijih patogena CIRDC-a. Nemoguće je pisati o kliničkoj slici koju CRCoV uzrokuje bez spominjanja kliničke slike CIRDC-a jer u slučajevima u kojima je CRCoV prisutan obično su prisutni i drugi patogeni mikroorganizmi CIRDC-a (Erles i Brownlie, 2008.).

Zbog uključenosti više patogena u etiologiju CIRDC-a CRCoV kao jednog od njih nije moguće dijagnosticirati samo na osnovi kliničkih znakova bolesti dišnog sustava (Erles i Brownlie, 2008.). Najprikladniji dijagnostički test za dokaz CRCoV jest RT-PCR koji umnaža dio gena za S-protein ili protein hemaglutinirajuće i esterazne aktivnosti (Erles i sur., 2003.; Yachi i Mochizuki, 2006.).

MATERIJALI I METODE

U ovom su istraživanju korišteni uzorci 258 pasa zaprimljenih u Virološki laboratorij Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u razdoblju od 2018. do 2021. godine. Od ukupnog broja, 88 pasa bilo je iz skloništa za nezbrinute životinje grada Zagreba Dumovec i ti su psi uzorkovani dva puta, s tim da je 30 pasa uzorkovano 2019. godine, dok je 58 pasa uzorkovano 2021. godine (slika 1). U 68 pasa prilikom uzimanja obrisaka bili su prisutni klinički znakovi bolesti dišnog sustava.

Pri izdvajanju ukupne virusne ribonukleinske kiseline (RNK) upotrijebljen je komercijalni kom-



Slika 1. Prikupljanje obrisaka nosa i ždrijela u skloništu za nezbrinute životinje grada Zagreba Dumovec 2021. godine

plet QIAamp cador Pathogen Mini Kit (250) (QIAGEN, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. Molekularna metoda RT-PCR primijenjena je za dokazivanje prisutnosti nukleotidnog odsječka specifičnog za CRCoV. Za izvođenje metode RT-PCR koristili su se voda slobodna od RNK-za (QIAGEN), reakcijski pufer 5x koncentriran, 25 mM dNTP, početnice F2–R1 (tablica 1), One Step Enzym 2μ/reaction (QIAGEN) te RNK izolirana iz obrisaka nosa i ždrijela zasebno ili nosa i ždrijela iste životinje zajedno.

Pripremljene PCR reakcijske smjese u Eppendorf epruveticama posložile bi se u PCR uređaj za izvođenje lančane reakcije polimerazom prema sljedećem protokolu: reverzna transkripcija pri temperaturi od 50 °C u trajanju od 30 minuta, inicijalna denaturacija DNA pri temperaturi od 95 °C u trajanju od 15 minuta, zatim denaturacija pri 94 °C tijekom 30 sekundi, sparivanje početnica pri 49 °C tijekom 90 sekundi te produživanje lanca

Tablica 1. Početnice za umnažanje odsječka genoma S-proteina CRCoV upotrijebljene za izvođenje metode RT-PCR

F2	TGCAGCATGTAAATCACAGT
R1	GGCAACACTTTTGATACCATT

pri 72 °C tijekom 30 sekundi. Reakcija se zbivala tijekom 45 ciklusa, nakon čega je uslijedilo konačno produživanje lanca u trajanju od 9 minuta pri 72 °C.

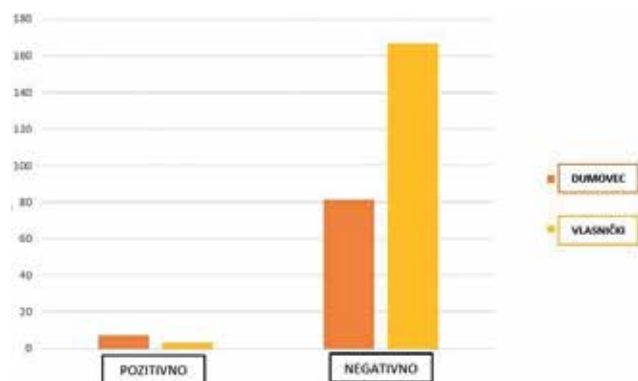
Uspješnost umnažanja virusnog genoma provjeren je elektroforezom u gelu. Određivanje nukleotidnog slijeda proizvoda RT-PCR učinjeno je u tvrtki MacroGen, Amsterdam, Nizozemska pomoću ABI PRISM BigDye terminator kita (Applied Biosystem, Carlsbad, California, SAD) na uređaju 3730 x 1 DNA analyzer istog proizvođača. Pri statističkoj obradi podataka primijenjen je Fisherov egzaktni test uz razinu značajnosti $p = 0,05$. Podaci koji su korišteni bili su godina uzimanja uzoraka, pasmina, spol, dob, prisutnost kliničkih znakova bolesti dišnog sustava i rezultati metode RT-PCR.

REZULTATI

Od 258 uzorkovanih pasa, njih 10 bilo je pozitivno (3,87 %) (tablica 2). Prevalencija CRCoV u pasa iz skloništa (7,95 %) bila je veća od prevalencije CRCoV utvrđene u vlasničkih pasa (1,76 %) (slika 2). Statističkom analizom ustanovljeno je da je ova razlika u prevalenciji statistički značajna ($p = 0,0344$). Također je ustanovljeno da godina uzimanja uzoraka statistički značajno utječe na prevalenciju CRCoV infekcije u skloništu ($p = 0,0057$). U 2019. godini prevalencija CRCoV u pasa iz skloništa iznosila je 20 %, dok je u 2021. iznosila 1,7 %.

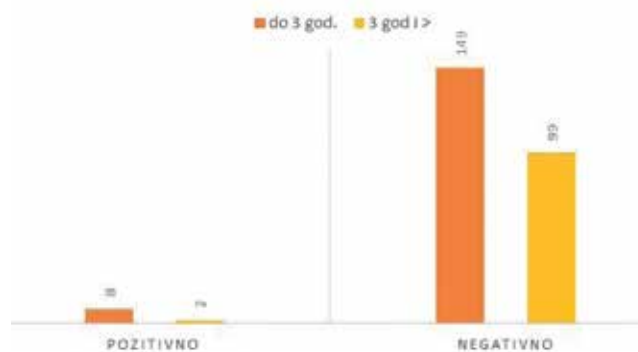
Tablica 2. Broj pasa uključenih u istraživanje, podijeljen na pozitivne i negativne na CRCoV, te vlasničke pse i pse iz skloništa

	DUMOVEC	VLASNIČKI PSI	UKUPNO
CRCoV POZITIVNI	7	3	10
CRCoV NEGATIVNI	81	167	248
UKUPNO	88	170	258



Slika 2. Zastupljenost vlasničkih pasa i pasa iz skloništa kod CRCoV pozitivnih i CRCoV negativnih jedinki

Pasminsku predispoziciju nije bilo moguće utvrditi zbog nedovoljnog broja jedinki određene pasmine. Prilikom podjele pasa na križance i čistokrvne pasmine nije utvrđena značajna razlika ($p = 0,1039$). Prema dobi psi su podijeljeni na mlađe od tri godine i na stare tri godine i više, ali dob nije značajno utjecala na rezultate testa RT-PCR ($p = 0,324$) (slika 3), kao ni spol ($p = 0,1962$).

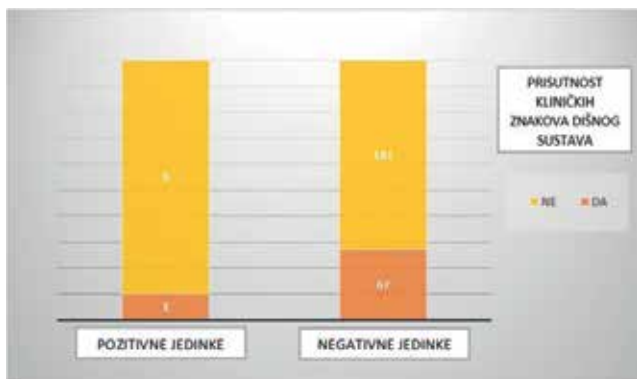


Slika 3. Zastupljenost pozitivnih i negativnih jedinki na CRCoV u odnosu na njihovu dob

Od ukupno 68 pasa s kliničkim znakovima bolesti dišnog sustava samo je jedna jedinka bila pozitivna (1,47 %) (slika 4) te je ustanovljeno da prisutnost kliničkih znakova bolesti dišnog sustava nije statistički značajan klinički znak u pozitivnih u odnosu na negativne pse ($p = 0,4628$).

RASPRAVA

Od ukupno 258 pasa koji su bili uključeni u istraživanje, 10 pasa bilo je pozitivno na CRCoV te je prevalencija iznosila 3,87 %. Uspoređujući



Slika 4. Zastupljenost kliničkih znakova bolesti dišnog sustava u CRCoV pozitivnih i CRCoV negativnih jedinki

rezultate iz drugih država, utvrđena je prevalencija CRCoV u Hrvatskoj bila manja. Primjerice u Italiji je prevalencija 8,97 % (Decaro i sur., 2016.), u Austriji 8,8 % (Spiss, 2012.) te 9,8 % u Njemačkoj (Schulz i sur., 2014.). Spiss (2012.), uz obriske ždrijela, upotrijebio je i obriske konjunktiva. Isti je autor koristio PCR u stvarnom vremenu (engl. *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*, qRT-PCR). Decaro i suradnici (2016.) te Schulz i suradnici (2014.) primijenili su qRT-PCR, no s obzirom na to da qRT-PCR nije osjetljiviji od RT-PCR-a (Bastien i sur., 2020.), primjena qRT-PCR-a ne bi trebala utjecati na prevalenciju. Početnice korištene u ovom istraživanju dizajnirane su za umnažanje konzerviranih odsječaka S-gena te su se razlikovale od početnica korištenih kod Spissa (2012.), gdje su početnice dizajnirane za RdRp gen, te kod Schulza i suradnika (2014.) gdje su upotrijebili početnice za protein-hemaglutinirajuće i esterazne aktivnosti. Potrebno je ispitati osjetljivost i specifičnost različitih molekularnih metoda da bi se utvrdilo koja od njih daje maksimalnu pouzdanost dokaza uzročnika. Najvjerojatniji je uzrok uočene razlike u prevalenciji u ovom istraživanju vrijeme uzorkovanja. Dokazana je izrazita sezonalnost infekcije CRCoV, koja se češće pojavljuje u zimskim mjesecima (Erles i Brownlie, 2005.). Za razliku od ranije navedenih istraživanja, uzorci za potrebe ovog istraživanja uzimani su tijekom cijele godine. Psi u skloništima uzorkovani su dvokratno, 2019. i 2021. godine. Prevalencija CRCoV u pasa iz skloništa 2019. godine iznosila je 20 %, dok je u 2021. iznosila 1,7 %. Na tako veliku razliku može se pretpostaviti da je utjecalo vrijeme uzimanja obrisaka, jer su

2019. godine životinje bile uzorkovane u veljači, odnosno za vrijeme zime, a 2021. godine obrisci su skupljani krajem rujna. Od obrisaka pasa koji su imali kliničke znakove bolesti dišnog sustava samo je jedan pas bio pozitivan na CRCoV, odnosno prevalencija je iznosila 1,47 %. Kod pokusnih CRCoV infekcija zaključeno je da se virus obilno izlučuje drugi dan nakon zaraze te da izlučivanje završava već šestog dana (Mitchell i sur., 2013.), dok klinički znakovi CIRDC-a obično traju dulje od šest dana, odnosno do dva tjedna (Reagan i Sykes 2020.). Pri uzorkovanju pasa s kliničkim znakovima bolesti dišnog sustava, ovisno o danu bolesti kad je uzet obrisak, moguće je da jedinka više ne izlučuje virus. To je osobito važno ako se zna patogeneza kliničkog očitovanja CIRDC-a. Bolest je uglavnom blagog tijeka u početku te većina vlasnika ne odlazi veterinaru u tom periodu. Ipak, kako ni ostale pozitivne jedinke nisu imale kliničke znakove bolesti dišnog sustava, moglo bi se zaključiti da je infekcija CRCoV blagog kliničkog tijeka te da su za razvoj kliničkih znakova CIRDC-a potrebni i drugi patogeni ili oslabljena imunost jedinke. U istraživanju u Njemačkoj, u 90 zdravih pasa ni jedna jedinka nije bila pozitivna na CRCoV (Schulz i sur., 2014.), ali su u ovom istraživanju psi bez kliničkih znakova dišnih bolesti zaprimljeni na klinike Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zbog neke druge bolesti, što je moglo utjecati na njihov imunostni sustav i predispoziciju za razvoj infekcije ovim virusom.

Prevalencija CRCoV u pasa iz skloništa u ovom je istraživanju iznosila 7,95 % i bila je statistički značajno veća u odnosu na vlasničke pse, gdje je iznosila 1,76 %. Psi u uzgajivačnicama, skloništima i trgovinama za kućne ljubimce izloženi su povećanom riziku od CIRDC-a zbog povećane gustoće populacije i priljeva novih životinja i patogena zbog velikog prometa životinja te katkad neadekvatnih uvjeta (Appel i Percy, 1970.; Bemis i sur., 1977. Buonavoglia i Martella, 2007.; Mochizuki i sur., 2008.; Singleton i sur., 2019.).

Zaključno, CRCoV nepobitno je prisutan u Republici Hrvatskoj, i to osobito u pasa u skloništima za nezbrinute životinje. Ovo je važan podatak jer može usmjerivati mjere opće profilakse koje bi zaštitile zdravlje pasa. Iako ovo istraživanje govori u prilog tomu da je infekcija CRCoV u terenskim

uvjetima blaga ili supklinička, njime je ustanovljena veća zastupljenost virusa u životinja bez kliničkih znakova bolesti dišnog sustava. Upravo je zbog toga važno dalje pratiti ovaj virus i njegovu ulogu u sinergizmu s drugim mikroorganizmima s obzirom na to da je CIRDC jedna od najučestalijih zaraznih bolesti pasa.

LITERATURA

- APPEL, M. J., D. H. PERCY (1970): SV-5-like parainfluenza virus in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 156, 1778-1781.
- APPEL, M. J., L. N. BINN (1987): Canine infectious tracheobronchitis. U: *Virus Infections of Carnivores* (Appel, M. J., ur.). Elsevier Science. Amsterdam. str. 201-211.
- BASTIEN, P., G. W. PROCOP, U. REISCHL (2008): Quantitative Real-Time PCR Is Not More Sensitive than "Conventional" PCR. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1897-1900.
- BEMIS, D. A., L. E. CARMICHAEL, M. J. G. APPEL (1977): Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. *Cornell Vet.* 67, 282-293.
- BUONAVOGLIA, C., V., MARTELLA (2007): Canine respiratory viruses. *Vet. Res.* 38, 355-373.
- DAY, M. J., S. CAREY, C. CLERCX, B. KOHN, F. MARSILIO, E. THIRY, L. FREYBURGER, B. SCHULZ, D. J. WALKER (2020): Aetiology of Canine Infectious Respiratory Disease Complex and Prevalence of its Pathogens in Europe. *J. Comp. Pathol.* 176, 86-108.
- DECARO, N., C. DESARIO, G. ELIA, V. MARI, M. S. LUCENTE, P. CORDIOLI, M. L. COLAIANNI, V. MARTELLA, V., C. BUONAVOGLIA (2007): Serological and molecular evidence that canine respiratory coronavirus is circulating in Italy. *Vet. Microbiol.* 121, 225-230.
- DITCHFIELD, J., L. W. MACPHERSON, A. ZBITNEW (1962): Association of Canine Adenovirus (Toronto A 26/61) with an Outbreak of Laryngotracheitis ("Kennel Cough"): A Preliminary Report. *Can. Vet. J.* 3, 238-247.
- ERLES, K., C. TOOMEY, H. W. BROOKS, J. BROWNLIE (2003): Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology.* 310, 216-223.
- ERLES, K., J. BROWNLIE (2005): Investigation into the causes of canine infectious respiratory disease: antibody responses to canine respiratory coronavirus and canine herpesvirus in two kennelled dog populations. *Arch. Virol.* 150, 1493-1504.
- ERLES, K., J. BROWNLIE (2008): Canine respiratory coronavirus: an emerging pathogen in the canine infectious respiratory disease complex. *Vet. Clin. N. A. Small Anim. Pract.* 38, 815-825.
- KANESHIMA, T., T. HOHDATSU, K. SATOH, T. TAKANO, K. MOTOKAWA, H. KOYAMA (2006): The prevalence of a group 2 coronavirus in dogs in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 21-25.
- KARPAS, A., F. G. GARCIA, F. CALVO, R. E. CROSS (1968): Experimental production of canine tracheobronchitis (kennel cough) with canine herpesvirus isolated from naturally infected dogs. *Am. J. Vet. Res.* 29, 1251-1257.
- KNESL, O., F. J. ALLAN, S. SHIELDS, (2009): The seroprevalence of canine respiratory coronavirus and canine influenza virus in dogs in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 57, 295-298.
- MITCHELL, J. A., H. W. BROOKS, B. SZLADOVITS, K. ERLES, R. GIBBONS, S. SHIELDS, J. BROWNLIE (2013): Tropism and pathological findings associated with canine respiratory coronavirus (CRCoV). *Vet. Microbiol.* 162 582-594.
- MOCHIZUKI, M., A. YACHI, T. OHSHIMA, A. OHUCHI, T. ISHIDA (2008): Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 563-569.
- MORE, G., M. DUNOWSKA, E. ACKE, N. CAVE (2019): A serological survey of canine respiratory coronavirus in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 68, 54-59.
- PAYNE, S. (2017): Family *Coronaviridae*. *Viruses From Understanding to Investigation*, 1st edition, Department of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University, College Station, Texas, United States. Str. 150-180
- PRIESTNALL, S. L., A. PRATELLI, J. BROWNLIE, K. ERLES (2007): Serological prevalence of canine respiratory coronavirus in southern Italy and epidemiological relationship with canine enteric coronavirus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 176-180.
- PRIESTNALL, S. L., J. BROWNLIE, E. J. DUBOVI, K. ERLES (2006): Serological prevalence of canine respiratory coronavirus. *Vet. Microbiol.* 115, 43-45.
- REAGAN, K. L., J. E. SYKES (2020): Canine Infectious Respiratory Disease. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 50, 405-418.
- RONSE, V., J. VERSTEGEN, K. ONCLIN, A. L. GUIOT, C. AEBERLE, H. J. NAUWYNCK (2002): Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 1997-1998. *Reprod. Dom. Anim.* 37, 299-304.
- SCHULZ, B. S., S. KURZ, K. WEBER, HJ. BALZER, K. HARTMANN (2014b): Detection of respiratory viruses and *Bordetella bronchiseptica* in dogs with acute respiratory tract infections. *Vet. J.* 201, 365-369.
- SINGLETON, D. A., J. STAVISKY, C. JEWELL, S. SMYTH, B. BRANT, F. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, S. AWSON, G. L. PINCHBECK, P. J. M. NOBLE, A. D. RADFORD (2019): Small animal disease surveillance 2019: respiratory disease, antibiotic prescription and canine infectious respiratory disease complex. *Vet. Rec.* 184, 640-645.
- SPISS, S. (2012): Enteric and respiratory coronavirus infections in Austrian dogs: serological and virological investigations of prevalence and clinical importance in respiratory and enteric diseases. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift.* 99, 67-81.
- YACHI, A., M. MOCHIZUKI (2006): Survey of dogs in Japan for group 2 canine coronavirus infection. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2615-2618.

Epizootiological Factors of Canine Respiratory Coronavirus Infection in Croatia

Abstract

Canine respiratory coronavirus (CRCoV) from the beta-coronavirus family, has been described worldwide and is most commonly associated with the early stage of CIRDC (Canine infectious respiratory disease complex). The main CRCoV multiplication site is the respiratory system, so it is assumed that the virus spreads through the excretions of the respiratory tract. Places with a large number of dogs, such as animal shelters, dog shows and similar, contribute to the spread of the virus.

Nasal and pharyngeal swabs of 258 dogs were screened during this study. Amongst them, 68 had clinical signs of respiratory disease. Out of 258 dogs, 88 of them were from shelters for neglected animals, while the rest belonged to private owner. Reverse

transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to confirm the presence of CRCoV.

CRCoV was detected in 3.87% of the examined dogs. There was a significantly higher rate of infection in dogs from the animal shelters compared to privately owned dogs, while gender and age did not have a significant influence on RT-PCR test results. Interestingly, CRCoV was detected more frequently in dogs without clinical signs of respiratory disease, which leads to the conclusion that CRCoV is not significant as an independent cause of respiratory diseases in dogs, or CIRDC.

Key words: *CRCoV; dog; CIRDC; epizootiological factors; RT-PCR*