

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

ZBORNİK PREDAVANJA
XLII SEMINARA
ZA INOVACIJE
ZNAJJA VETERINARA



UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

**ZBORNİK PREDAVANJA XLII SEMINARA
ZA INOVACIJE ZNANJA VETERINARA**

Beograd, 2021

**XLII SEMINAR ZA INOVACIJE ZNANJA VETERINARA
18-19.02.2021, BEOGRAD**

Organizator:

Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu

Organizacioni odbor:

Predsednik: Prof. dr Mirilović Milorad

Članovi: prof. dr Krstić Vanja, prof. dr Jovanović B. Ivan, prof. dr Milanović Svetlana,
prof. dr Petrujković Branko, dr Vejnović Branislav, Gabrić Maja

Programski odbor:

Predsednik: Prof. dr Kirovski Danijela

Članovi: prof. dr Aleksić-Kovačević Sanja, prof. dr Karabasil Neđeljko, prof. dr Šefer Dragan,
prof. dr Radojičić Sonja, prof. dr Vujanac Ivan, prof. dr Andrić Nenad



Izdavač:

Fakultet veterinarske medicine, Beograd
Centar za izdavačku delatnost i promet učila



Za izdavača:

Prof. dr Mirilović Milorad, v.d. dekan FVM

Urednik:

Prof. dr Lazarević Miodrag

Lektura i korektura:

Prof. dr Jovanović B. Ivan
Prof. dr Lazarević Miodrag

Dizajn korica:

Prof. dr Jovanović B. Ivan

Tehnički urednik:

Lazarević Gordana

Štampa:

Naučna KMD, Beograd, 2021.

Tiraž: 450 primeraka

ISBN 978-86-80446-41-7

KORONAVIRUSNE INFEKCIJE KOD ŽIVOTINJA – DIJAGNOSTIKA I IMUNOPROFILAKSA

Nišavić Jakov, Milić Nenad, Radalj Andrea*

Koronavirusne infekcije životinja i oboljenja koja nastaju kao njihove posledice su odavno poznate u veterinarskoj medicini. Koronavirusi predstavljaju veliku grupu RNK virusa koji izazivaju respiratorna, digestivna i neurološka oboljenja velikog broja životinjskih vrsta. Infektivni peritonitis mačaka, transmisibilni gastroenteritis svinja, infektivni bronhitis pilića ili epidemična dijareja svinja su samo neke od infekcija izazvanih koronavirusima u čijem lečenju ili preveniranju pojave ključnu ulogu imaju lekari veterinarske medicine. Imajući u vidu raširenost koronavirusnih infekcija u populacijama različitih vrsta životinja, poseban značaj se pridaje njihovoj laboratorijskoj dijagnostici, odnosno sprovođenju imunopofilakse u cilju sprečavanja pojave oboljenja izazvanih različitim vrstama koronavirusa. Laboratorijska dijagnostika koronavirusnih infekcija kod životinja podrazumeva primenu više klasičnih i molekularnih metoda kao što su izolacija virusa u kulturi ćelija, lančana reakcija polimeraze sa reverznom transkripcijom, odnosno metoda real-time RT-PCR. Danas je u upotrebi više vrsta komercijalno dostupnih vakcina koje se koriste u prevenciji pojave koronavirusnih infekcija kod različitih životinja. Kod onih koronavirusnih infekcija, kod kojih je predviđena vakcinacija životinja, koriste se uglavnom inaktivisane i žive atenuisane vakcine.

Ključne reči: imunopofilaksa, koronavirusne infekcije, laboratorijska dijagnostika

Koronavirusne infekcije životinja, odnosno oboljenja koja nastaju kao njihova posledica, odavno su poznate u veterinarskoj medicini. Infektivni peritonitis mačaka, koronavirusna infekcija teladi i pasa, infektivni bronhitis pilića ili epidemična dijareja svinja su samo neke od infekcija izazvanih koronavirusima u čijem lečenju ili preveniranju pojave, ključnu ulogu imaju lekari veterinarske medicine.

* Dr Nišavić Jakov, redovni profesor, dr Milić Nenad, redovni profesor, dr Radalj Andrea, docent, Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Familija *Coronaviridae* je podeljena na dve podfamilije *Orthocoronavirinae* i *Letovirinae*. Dalje se podfamilija *Orthocoronavirinae* deli na četiri roda virusa: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* i *Deltacoronavirus*. Rod *Alphacoronavirus* obuhvata koronavirus izazivače oboljenja kod pasa i mačaka, odnosno kod svinja. Goveđi koronavirus (BCoV), koronavirus konja (ECoV) i respiratoni koronavirus pasa (CRCoV) pripadaju rodu *Betacoronavirus*. U rod *Gammacoronavirus* svrstani su koronavirusi živine i ptica, dok rodu *Deltacoronavirus* pripadaju uglavnom koronavirusi ptica i novootkriveni deltakoronavirus svinja (PDCoV)(Nišavić i sar. 2020).

Koronavirusi su jednolančani RNK virusi koji poseduju spoljašnji omotač. U sastavu spoljašnjeg omotača se nalaze glikoproteini koji imaju značajnu ulogu u procesu virusne infekcije ćelije i virusne replikacije. Koronavirusi su osetljivi na delovanje povišene temperature i rastvarače masti. U ćelijskim linijama se dobro replikuju, ali ne izazivaju jasne citopatogene promene tako da se njihovo prisustvo može dokazati indirektno, drugim metodama. Veoma su adaptibilni i skloni mutacijama u genomu tako da se danas, na primer, gotovo pouzdano može reći da virusi SARS-CoV-1 i MERS-CoV vode poreklo od životinja (Nišavić i sar. 2020).

Virus transmisibilnog gastroenteritisa (TGEV) izaziva uginuća prasadi neposredno po rođenju, odnosno prasadi starosti do tri nedelje. Klinički simptomi oboljenja se manifestuju povraćanjem, profuznom prolivom, dehidracijom i gubitkom telesne mase. Virus u organizam životinja ulazi ingestijom, a prenošenje se odvija fekalno-oralnim putem. Za virus epidemične dijareje svinja (PEDV) se smatra da vodi poreklo od slepih miševa. On se prenosi direktnim kontaktom, ali i indirektnim putem. Ovaj virus izaziva kontagiozno oboljenje svinja sa pojavom proliva i povraćanja, a dovodi i do visokog mortaliteta prasadi na sisi (Nišavić i sar. 2020).

Koronavirus goveda izaziva infekcije goveda i malih preživara praćene prolivom teladi, dok kod odraslih životinja dolazi do hemoragične dijareje ili respiratorne infekcije. Koronavirus goveda se prenosi direktnim i indirektnim kontaktom, a izlučuje se iz organizma preko sekreta i ekskreta iz respiratornog, odnosno digestivnog sistema (Boileau i Kapil 2010).

Koronavirus konja je srodan koronavirusu goveda i kod obolelih životinja izaziva proliv, anoreksije i letargije sa povišenom telesnom temperaturom (Goodrich i sar. 2020).

Do danas su opisana dva različita genotipa koronavirusa pasa (CCoV-I i CCoV-II), a virus je genetski i antigenski sličan koronavirusu mačaka. On dovodi do proliva kod inficiranih životinja, ali su uginuća retka, tako da se životinje oporave najčešće posle 7 do 10 dana od pojave kliničkih simptoma. Respiratoni koronavirus pasa (CRCoV) uglavnom izaziva blagu respiratornu infekciju koja se brzo širi putem aerosola naročito u većim skupinama pasa (Ntafis i sar. 2013).

Koronavirus mačaka (FeCoV) izaziva oboljenja kod domaćih i divljih mačaka. Do danas su opisana dva patotipa ovog virusa od kojih jedan izaziva promene u digestivnom sistemu, a drugi izaziva oboljenje pod nazivom infektivni peritonitis

mačaka. Koronavirus mačaka se u populaciji životinja prenosi fekalno-oralnim putem, ali je utvrđen i indirektan način prenošenja. Infektivni peritonitis mačaka se karakteriše gubitkom apetita, žuticom i dijarejom sa nagomilavanjem proteinskog eksudata u abdomenu i grudnoj duplji. Ovo oboljenje se javlja u efuzionoj i neefuzionoj formi. Kod oba oblika bolesti, dolazi do fokalnih gnojno-granulomatoznih promena na unutrašnjim organima i seroznim membranama, pri čemu se kod efuzione forme pojavljuje nakupljanje tečnosti u peritonealnoj duplji (Nišavić i sar. 2020).

Najznačajniji koronavirus ptica je virus infektivnog brohinitisa (IBV) koji izaziva visoko kontagiozno oboljenje koje se najčešće javlja kod kokošaka, a izolovan je i kod golubova i fazana. Kod pilića, starosti od 1 do 4 nedelje, dolazi do povišene telesne temperature, letargije, kašlja i respiratornih poremećaja sa iznendanim uginućima, dok kod nekih životinja navedeni virus izaziva promene u jajovodima, bubrezima i gastrointestinalnom sistemu. Infekcija ptica i živine, izazvana ovim virusom, se prenosi u jatima direktnim i indirektnim kontaktom, a virus se iz organizma izlučuje sekretom iz respiratornog sistema pri čemu se može izolovati i iz fecesa i jaja inficiranih životinja (de WJJ i sar. 2011).

Laboratorijska dijagnostika virusnih infekcija podrazumeva primenu klasičnih i molekularnih metoda. Kada se govori o klasičnim metodama virusološke dijagnostike svakako je najznačajnija izolacija virusa u ćelijskoj liniji. Međutim, da bi se primenom ove metode izvršila izolacija i identifikacija virusa u ispitivanom uzorku, neophodan je određeni vremenski period koji u proseku iznosi 5 do 7 dana, a nekada i duže. U slučajevima epidemija ili pandemija koje su izazvane određenom vrstom virusa, kao što je trenutno slučaj sa pandemijom izazvanom SARS koronavirusom 2 (SARS-CoV-2), ova metoda ne može biti metoda izbora. Iz ovog razloga se danas u laboratorijskoj dijagnostici navedenog virusa, ali i u slučajevima epidemija izazvanih drugim vrstama virusa kod životinja i ljudi, uglavnom koriste molekularne metode. One imaju poseban značaj u dijagnostici virusa koji na ćelijskim linijama ne dovode do pojave citopatogenog efekta. Primenom molekularnih metoda i to pre svega metoda *real-time* PCR ili *real-time* RT-PCR moguće je za relativno kratko vreme dobiti rezultate ispitivanja većeg broja uzoraka koji će kasnije opredeliti i primenu odgovarajućih epidemioloških, odnosno epizootioloških mera. Ovde treba napomenuti da primena molekularnih metoda nosi određene rizike u smislu dobijanja lažno negativnih ili lažno pozitivnih rezultata, što se može sprečiti pre svega adekvatnim uzimanjem uzoraka, njihovim brzim transportom do laboratorije i preciznim izvođenjem metoda, odnosno primenom odgovarajućih protokola za njihovo izvođenje uz korišćenje pozitivnih i negativnih kontrolnih uzoraka.

U laboratorijskoj dijagnostici koronavirusnih infekcija goveda koriste se iste virusološke metode koje se koriste u dijagnostici koronavirusnih infekcija ljudi. Pogodne uzorke za ispitivanje predstavljaju nosni brisevi, uzorci dobijeni traheobronhijalnom lavažom kao i uzorci fecesa. Prilikom obdukcije uginulih životinja potrebno je uzorkovati delove traheje, pluća ili debelog creva. Infekcija goveđim koronavirusom je akutnog karaktera, a izlučivanje virusa je kratkotrajno i često u vezi sa izlaganjem životinja određenim faktorima stresa (npr. transport). Iz tih ra-

zloga je u slučaju oboljevanja životinja neophodno izvršiti pravovremeno uzorkovanje materijala za ispitivanja. Metodu *multiplex semi-nested RT-PCR* za identifikaciju goveđeg koronavirusa i rotavirusa A grupe u ispitivanim uzorcima su koristili Asanoa i sar. (2010). Za izvođenje ove metode korišćeni su prajmeri za N gen koronavirusa goveda i za VP1 gen rotavirusa. U cilju realizacije istraživanja ispitano je ukupno 75 uzoraka fecesa goveda (53 uzorka fecesa teladi i 22 uzorka fecesa krava) prikupljenih od životinja, sa i bez kliničkih simptoma. Dobijeni rezultati su dokazali da je *multiplex semi-nested RT-PCR* veoma osetljiva i specifična metoda za istovremenu detekciju kako goveđeg koronavirusa, tako i rotavirusa A goveda. Tizzard (2020a) navodi da je trenutno u SAD, na tržištu dostupno nekoliko veoma efikasnih vakcina protiv goveđeg koronavirusa. Kako se kod teladi, koronavirusna infekcija najčešće javlja u prvim danima života, zaštita novorođene teladi od infekcije je veoma značajna. Iz tog razloga se pojedine vakcine aplikuju kravama u visokoj steonosti što omogućava da telad uzimanjem kolostruma bude zaštićena od koronavirusne infekcije. Pored ovakvog načina zaštite, danas se u cilju vakcinacije goveda koriste žive atenuisane vakcine koje se teladima aplikuju intranazalno prvog dana života. One stimulišu i nespecifični imunski odgovor organizma stvaranjem interferona koji omogućava ograničavanje virusne infekcije. Pored ovih vakcina, danas su u upotrebi i vakcine koje se govedima aplikuju intranazalno u vidu injekcija između trećeg i četvrtog dana života. Intranazalne vakcine se mogu aplikovati i starijoj teladi na početku tova. U cilju prevencije pojave koronavirusne infekcije, kod goveda se koriste i polivalentne inaktivisane vakcine koje pored antigena goveđeg koronavirusa, sadrže i antigene klostridija i *E. coli* pri čemu je za navedene vakcine tokom studija efikasnosti dokazano da značajno smanjuju težinu, odnosno dužinu trajanja kliničkih simptoma koronavirusne infekcije.

Koronavirusi svinja koji izazivaju oboljenja gastrointestinalnog trakta (TGEV, PEDV i PDCoV) dovode do pojave sličnih simptoma kod obolelih jedinki i često se ne mogu razlikovati na osnovu kliničke slike. Laboratorijska dijagnostika koronavirusnih oboljenja svinja se vrši na osnovu identifikacije virusnih antigena ili nukleinskih kiselina u uzorcima fecesa, odnosno na osnovu detekcije specifičnih antitela u krvnom serumu svinja. Slične metode se koriste i za dijagnostiku infekcija izazvanih respiratornim koronavirusom svinja (PRCoV), a od obolelih jedinki se prikupljaju uzorci nosnih briseva ili pluća. Xin Huang i sar. (2019) su primenom metode *multiplex real-time RT-qPCR* vršili istovremenu detekciju prisustva enteričnih koronavirusa svinja. Ovi virusi kod prasadi izazivaju prolive. U cilju razvoja brzog, pouzdanog i preciznog protokola za brzu istovremenu dijagnostiku ovih virusa, korišćeni su specifični prajmeri i probe koji su dizajnirani na osnovu visoko konzerviranog M gena virusa transmisibilnog gastroenteritisa svinja i virusa epidemične dijareje svinja, odnosno N gena deltakoronavirusa svinja i svinjskog enteričnog alfa-koronavirusa. U ispitivanjima su korišćeni uzorci fecesa prikupljeni od prasadi sa dijarejom u periodu između 2015. i 2018. godine u nekoliko kineskih provincija. Ukupno je prikupljeno i ispitano 354 uzorka fecesa prasadi. Rezultati ovih ispitivanja su dokazali da je uspostavljeni protokol za izvođenje ove metode imao visoku osetljivost i specifičnost kao i odličnu ponovljivost, što omogućava

njegovo šire korišćenje u brzom i pouzdanoj dijagnostici svinjskih enteričnih koronavirusa. Kako je zabeležen porast prevalencije infekcija svinja izazvanih svinjskim respiratornim koronavirusom (PRCoV) i posledičnog opadanja prevalencije infekcija izazvanih TGEV, postepeno se smanjuje i potreba za vakcinacijom protiv TGEV. Pored toga, pojava PRCoV u populacijama svinja je, pored smanjenja prevalencije TGEV, najverovatnije dovela i do pojave unakrsnog protektivnog imuniteta. Svinjski respiratorni koronavirus (PRCoV) dovodi do pojave blage respiratorne infekcije tako ne postoji potreba za razvojem vakcine protiv njega. Danas su dostupne modifikovane žive i inaktivisane vakcine protiv TGEV pri čemu se modifikovane žive vakcine najčešće koriste za imunizaciju gravidnih krmača u cilju razvoja pasivne zaštite njihove novorođene prasadi od infekcije i posledičnog oboljevanja. Sprovedene terenske studije bezbednosti i efikasnosti vakcina su dokazale da, za razliku od infekcije divljim sojem TGEV, atenuisani vakcinalni sojevi virusa ne dovode do adekvatne stimulacije sekretornog imunološkog odgovora (Tizzard 2020b). Inaktivisane vakcine se najčešće aplikuju prasadima intramuskularno u slučajevima pojave enzootija. U manjim populacijama svinja, imunitet zapata se postiže izlaganjem gravidnih krmača crevnom sadržaju inficiranih svinja, odnosno virulentnim sojevima virusa TGEV. Navedena metoda ima za cilj da stimuliše razvoj imuniteta i smanji mortalitet novorođene prasadi. Međutim, nedostatak ovakvog pristupa predstavlja mogućnost širenja drugih patogena potencijalno prisutnih u korišćenom sadržaju creva (Tizard 2020a).

Trenutno postoji veći broj komercijalnih inaktivisanih i modifikovanih živih vakcina protiv virusa epidemične dijareje svinja. One se često koriste u kombinaciji sa vakcinama protiv TGEV i rotavirusa za imunizaciju gravidnih krmača. Kako se prasad inficira već u prvim danima života, većina ovih vakcina se aplikuje krmačama od dve do četiri nedelje pre partusa, tako da njihova prasad posledično stiče adekvatnu zaštitu kolostralnim antitelima. Primenom modifikovanih živih vakcina protiv PEDV, smanjuje se stopa mortaliteta novorođene prasadi, međutim, ne sprečava se infekcija navedenim virusom, niti njegovo izlučivanje. U slučajevima peroralne aplikacije vakcine, prisustvo specifičnih antitela (IgA) u crevima krmača može blokirati apsorpciju vakcinalnog antigena tako da se revakcinacija inaktivisanim vakcinama najčešće vrši parenteralno. Kliničke studije dokazuju da ove vakcine često ne indukuju zadovoljavajući protektivni imunitet (Tizzard 2020a). Ova pojava se može objasniti antigenskim, odnosno genetskim razlikama u okviru glikoproteina S između terenskih i vakcinalnih sojeva PEDV što iziskuje konstantnu potrebu za pripremom novih vakcina formulisanih na bazi terenskih varijanti virusa (Liu i sar. 2019). U cilju poboljšanja efikasnosti vakcinacije, može se koristiti više različitih protokola tako da se žive i inaktivisane vakcine aplikuju u određenim intervalima i to na sledeći način: živa-inaktivisana-inaktivisana ili živa-živa-inaktivisana-inaktivisana (Song i sar. 2015). Druge vakcine, razvijene u cilju kontrole epidemične dijareje svinja, uključuju različite vektorske i subjedinične vakcine, ali se ekonomska opravdanost njihove primene dovodi u pitanje. Liu i sar. (2019) su pripremili inaktivisanu vakcinu od terenskog soja PEDV pod nazivom CH/HNPJ/2017 koji pripada G2b genotipu. Ovi autori su ispitivali

efikasnost pripremljene vakcine u ogledu na eksperimentalnoj prasadi pri čemu je dokazano da ona indukuje jak humoralni imunološki odgovor sa zadovoljavajućim titrom virus-neutrališućih antitela u krvnom serumu ogleđnih jedinki. Pored toga, u ogledu veštačke infekcije prasadi imunizovane virulentnim sojem PEDV, dokazana je protektivna moć pripremljene vakcine kod 3 od 5 eksperimentalnih životinja. Ovde treba napomenuti da se poslednjih godina visoko virulentni terenski sojevi PEDV često dovode u vezu sa izbijanjem epizootija epidemične dijareje svinja. Ovo je zapaženo kod svinja na teritoriji Kine, uz značajne ekonomske gubitke što opravdava ovakva ispitivanja.

Postavljanje sumnje na infekciju konja izazvanu konjskim koronavirusom (ECoV) se vrši na osnovu anamneze, kliničke slike, odnosno rezultata laboratorijskih ispitivanja prikupljenih uzoraka. U krvi konja, inficiranih koronavirusom, su utvrđene neutropenija i/ili limfopenija. Pored uzoraka krvi, ispituju se i uzorci fecesa sumnjivih ili obolelih životinja. Danas je poznato, da izlučivanje virusa iz organizma fecesom inficiranih konja traje u proseku od 3. do 25. dana posle infekcije. Ovde napominjemo da je često potrebno uzeti više uzoraka tokom nekoliko dana, jer se u slučaju staze crevnog sadržaja u početnom stadijumu bolesti, ne može detektovati dovoljna količina virusnih čestica u fecesu. Izolacija ECoV se može vršiti na HRT-18 ćelijskoj liniji, međutim u cilju postavljanja precizne i pravovremene dijagnoze rutinski se koristi RT-PCR. Sanz i sar. (2019) su ispitivali da li klinički zdravi konji i konji sa gastrointestinalnim smetnjama izlučuju konjski koronavirus u fecesu u vreme prijema u bolnicu i posle 48 časova. Uzorci fecesa 130 konja su prikupljeni u trenutku prijema životinja u bolnicu, odnosno posle 48 časova i ispitivani primenom lančane reakcije polimeraze uz korišćenje prajmera za N gen koronavirusa konja i metode elektronske mikroskopije. Kod samo jednog, od ukupno 258 uzoraka fecesa, primenom metode RT-PCR je utvrđeno prisustvo nukleinske kiseline konjskog koronavirusa, dok je metodom elektronske mikroskopije njegovo prisustvo utvrđeno kod svega devet uzoraka. Dobijeni rezultati ispitivanja su ukazali da je prisustvo konjskog koronavirusa kod hospitalizovanih konja bilo zanemarljivo. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja, autori su zaključili da je prisustvo konjskog koronavirusa u fecesu u vezi sa pojavom kliničkih simptoma oboljenja kod životinja i da ovaj nalaz ima određenu dijagnostičku relevantnost. Vakcina protiv koronavirusa konja nije dostupna, međutim Nemoto i sar. (2017) su kod konja ispitivali delovanje vakcine protiv antigenski srodnog goveđeg koronavirusa. U krvnom serumu vakcinisanih konja utvrđen je porast titra anti-ECoV antitela. Ovde treba naglasiti da efikasnost ovog pristupa vakcinaciji konja protiv koronavirusa još uvek nije ispitana u ogledu veštačke infekcije.

Erles i sar. (2007) su iz uzoraka respiratornog sistema pasa izvršili izolaciju psećeg koronavirusa, a zatim i analizu sekvenci izolovanih sojeva virusa. Autori su uspeli da izvrše izolaciju CRCoV na kulturi ćelija HRT-18, ali ne i na drugim ćelijskim linijama. Analizom genomskih sekvenci je utvrđen visok stepen sličnosti između CRCoV i goveđeg koronavirusa. Filogenetska analiza nestrukturnog regiona genoma virusa, smeštenog između S i E gena respiratornog koronavirusa pasa, potvrdila je visok stepen sličnosti sa istim regionom genoma goveđeg koro-

navirusa. Ovo je autorima dalo za pravo da pretpostave da su ovo srodni virusi i da je verovatno došlo do prelaska BCoV sa goveda na pse. Ntafis i sar. (2013) su izvršili molekularnu karakterizaciju i analizirali genetičku raznovrsnost pojedinih sojeva psećeg koronavirusa na teritoriji Grčke. Između decembra 2007. i decembra 2009. godine sakupljeno je 206 uzoraka fecesa pasa koji su ispitani primenom metode RT-PCR i *real-time* RT-PCR. Kod 65,1 procenta ispitanih uzoraka, poreklom od pasa sa dijarejom, utvrđeno je prisustvo psećeg koronavirusa pri čemu je kod 47 posto uzoraka dokazano više genotipova CCoV.

Imunizacija pasa, u cilju zaštite od koronavirusne infekcije, podrazumeva upotrebu dostupnih inaktivisanih i modifikovanih živih vakcina. Međutim, njihova upotreba uglavnom nije preporučena zbog toga što koronavirus pasa kod obolelih životinja izaziva najčešće blage oblike enteritisa. Većina navedenih vakcina štiti pse od oboljevanja, ali ne i od infekcije (Vlasova i sar. 2020). Pored toga, kod parenteralno vakcinisanih pasa ne dolazi do razvoja sekretornog imunološkog odgovora, odnosno sinteze IgA u crevima. Modifikovana živa vakcina, pripremljena od soja 257/98-3c psećeg koronavirusa, je ispitivana na psima nakon intramuskularne i oro-nazalne aplikacije (Pratelli i sar. 2004). Autori su dokazali da intramuskularno imunizovane ogleadne životinje nisu izlučivale vakcinalni virus za razliku od pasa vakcinisanih oro-nazalnim putem. Pored toga, posle izvedenog ogleada veštačke infekcije virulentnim sojem psećeg koronavirusa (CCoV), nijedna vakcinisana životinja nije ispoljila kliničke simptome oboljenja, niti je utvrđeno izlučivanje virusa. Postoji i veliki broj inaktivisanih polivalentnih vakcina koje pored CCoV sadrže i druge značajne patogene pasa kao što su parvovirus, adenovirus, virus štenećaka i parainfluence pasa. Antitela protiv CCoV nisu unakrsno protektivna prema psećem respiratornom koronavirusu (CRCoV), pri čemu CRCoV nije uključen ni u jednu dostupnu multivalentnu vakcinu za pse, jer je oboljenje koje izaziva, od manjeg kliničkog značaja i infekcija se suzbija izolacijom obolelih životinja ukoliko se nalaze u većim grupama.

Tekelioglu i sar. (2015) su ispitivali prisustvo specifičnih antitela protiv koronavirusa mačaka u uzorcima krvnog seruma, poreklom od 169 mačaka koje su hirurški tretirane u Istanbulu, u periodu od 2009. do 2014. godine. Dobijeni rezultati ispitivanja su dokazali prevalenciju koronavirusa mačaka od oko 37 procenta i to uglavnom u populaciji mačaka do dve godine starosti. U ovim istraživanjima je vršeno i ispitivanje uzoraka krvnog seruma primenom brzog testa na prisustvo antitela protiv koronavirusa mačaka. Osetljivost i specifičnost ovog testa su upoređivane sa metodom indirektno imunofluorescencije. Dobijene vrednosti za osetljivost i specifičnost testa su iznosile 96%, odnosno 97,9 posto.

Infektivni peritonitis mačaka je virusno oboljenje za koje je karakteristično da specifična antitela protiv S proteina spoljašnjeg omotača FeCoV u krvnom serumu mačaka stimulacijom makrofaga dovode do pogoršavanja kliničkih simptoma oboljenja, odnosno pojačavaju infektivnost virusa (Olsen i sar. 1992). Iz tog razloga, primena konvencionalnih vakcina nema značajan efekat u prevenciji infektivnog peritonitisa mačaka, tako da se pribegava alternativnim rešenjima. Vakcina namenjena za intranazalnu aplikaciju koja sadrži temperaturno osetljivi mutant soj

DF2-FIPV mačijeg koronavirusa, koji se replikuje u mukozi gornjih respiratornih puteva indukujući lokalni sekretorni imunološki odgovor, dala je zadovoljavajuće rezultate u sprečavanju infekcije mačaka. Nedostatak ovakve vakcine je u njenoj ograničenoj efikasnosti, jer se aplikuje mačićima u uzrastu od 16 nedelja što je često prekasno imajući u vidu da do infekcije mačijim koronavirusom dolazi u prvim danima života, naročito u većim populacijama ovih životinja gde je virus endemski prisutan (Tizzard 2020a).

Naguiba i sar. (2017) su dokazali da dva genotipa virusa infektivnog bronhitisa trenutno veoma nepovoljno utiču na razvoj živinarske proizvodnje na teritoriji Egipta. U ovim ispitivanjima su korišćene metode RT-PCR sa prajmerima za hipervarijabilni region S gena virusa i metoda *real-time* RT-PCR uz korišćenje prajmera za N gen virusa. Primenom navedenih metoda ispitano je 50 terenskih uzoraka poreklom od ptica (brisevi traheje, alanotisne tečnosti i tkiva živine) u kojima je utvrđivano prisustvo virusa infektivnog bronhitisa. Dobijeni rezultati su potvrdili opravdanost korišćenja molekularnih metoda u dijagnostici ove značajne koronavirusne infekcije živine.

Vakcinacija predstavlja jedini metod kontrole infektivnog bronhitisa i rutinski se sprovodi u intenzivnom uzgoju živine. Poznato je da vakcinalni imunitet kod živine nije dugotrajan i da je revakcinacija neophodna, a uz to je od velikog značaja i izbor vakcinalnog soja virusa imajući u vidu velike antigenske varijacije među sojevima virusa infektivnog bronhitisa (IBD). Danas su u upotrebi žive i inaktivisane vakcine, a programi vakcinacije se razlikuju od zemlje do zemlje, nekada i između različitih živinarskih farmi (Tizzard 2020a). Žive atenuisane vakcine se pripremaju pasiranjem sojeva IBV u embrioniranim kokošijim jajima u cilju smanjenja njihove virulencije. One se uglavnom aplikuju jednodnevnoj piladi, međutim, ukoliko se radi o visoko atenuisanim sojevima virusa, titar antitela kod vakcinisanih jedinki opada već oko 9. nedelje posle vakcinacije. Primena živih atenuisanih vakcina nosi određene rizike od povratka virulencije, rekombinacije ili mutacije vakcinalnih sojeva virusa. Inaktivisane vakcine se mogu koristiti samostalno ili u kombinaciji sa modifikovanim živim vakcinama kod roditeljskih jata u cilju indukovanja maternalnog imuniteta koji predstavlja zaštitu pilićima od najranijeg uzrasta (Tizzard 2020a). Kod kokoši nosilja i jata roditelja, primena inaktivisanih vakcina sprečava smanjenje produkcije jaja i predstavlja zaštitu za piliće kroz sintezu maternalnih antitela. Brojleri koji se gaje u kratkim turnusima, dobijaju jednu dozu za razliku od starijih kategorija živine koje se višekratno revakcinišu (Tizzard 2020b). U praksi vakcinacije roditeljskih jata i kokoši nosilja se najčešće primenjuju dve ili tri doze živih atenuisanih vakcina, a zatim se vrši imunizacija višekratnom primenom inaktivisanih vakcina. Eksperimentalne rekombinantne vakcine protiv IBV, zasnovane na korišćenju virusa boginja živine i adenovirusa, daju zadovoljavajuće rezultate, ali se dovodi u pitanje ekonomska isplativost njihove primene (Chen i sar. 2010).

Kao što je prethodno navedeno, kontrola i prevencija infektivnog bronhitisa živine su veoma otežane činjenicom da se neprekidno otkrivaju novi genotipovi, serotipovi i varijante IBV nastali različitim mutacijama virusnog genoma. Pojavu novih serotipova virusa indukuju veoma male razlike u aminokiselinskim sekven-

cama S proteina. Do danas je identifikovano preko 50 serotipova i nekoliko stotina varijanti IBV čija je pojava posledica promena u nukleotidnoj sekvenci hipervarijabilnog regiona koji kodira sintezu glikoproteina S. Imajući u vidu činjenicu da je unakrsni imunitet među različitim serotipovima pomenutog virusa veoma slab, neophodan je konstantan razvoj novih vakcina protiv ove značajne infekcije živine (Tizzard 2020a, Tizzard 2020b).

Pandemija izazvana SARS-CoV-2 kod ljudi, koja je započela krajem 2019. godine i još uvek traje bez skoro izvesnog završetka, dovela je i dovešće u budućnosti do niza društveno-socijalnih promena. Društvena svest i zrelost jedne zajednice ljudi se najbolje ogleda u ovakvim kriznim situacijama. Tada se može videti koliko je jedno društvo odgovorno i solidarno, koliko su institucije jedne države razvijene i koliko ljudi poštuju odluke i mere državnih institucija. Imajući ovo u vidu, onda postaje sasvim jasno kakve su razlike između pojedinih država u pogledu rezultata borbe za sprečavanje širenja ove pandemije.

SARS koronavirus 2 koji je prouzrokovao trenutnu pandemiju, pripada familiji *Coronaviridae*. Neophodno je naglasiti da kada se određena vrsta novootkrivenog virusa svrsta u jednu familiju, to znači da ta vrsta virusa deli sve druge biološke karakteristike familije u koju je svrstana. Tu se pre svega misli na građu virusa, njegovu otpornost, način infekcije ćelije, laboratorijsku dijagnostiku i dr. SARS-CoV-2 deli sve osnovne biološke osobine sa drugim koronavirusima koji izazivaju oboljenja kod ljudi i životinja. Ovaj virus je od početka pandemije predmet obimnih istraživanja, tako da je, za relativno kratak vremenski period, prikupljeno mnogo podataka o njegovim osnovnim biološkim karakteristikama i patogenezi. Na primer, utvrđeno je da kod teških oblika infekcije dolazi do pojave prekomernog nivoa zapaljenskog odgovora organizama na infekciju sa pojavom tzv. citokinske oluje koja je praćena povećanjem koncentracije različitih medijatora – citokina, kao što su: IL-1 β , IFN- γ , IL-10, IL-2, TNF- α ili IL-4. Ova pojava, prema nekim literaturnim podacima, značajno pogoršava kliničke simptome bolesti. Pored toga je, kod pacijenata sa težim kliničkim simptomima infekcije, utvrđena redukcija broja T limfocita.

Laboratorijska dijagnostika SARS-CoV-2 se uglavnom zasniva na molekularnim i serološkim metodama. Kao što je napomenuto u prethodnom delu teksta, u slučajevima epidemija ili pandemija neophodno je u dijagnostičke svrhe koristiti one metode koje će biti pouzdane i precizne i čijom primenom će rezultati ispitivanja većeg broja uzoraka biti relativno brzo dostupni. U te svrhe se, tokom ove pandemije, najviše koristi metoda real-time RT-PCR. Njom se otkriva prisustvo nukleinske kiseline koronavirusa u uzorcima nosnih briseva i briseva farinksa. Pored ove metode, u upotrebi su i još neke serološke metode laboratorijske dijagnostike (ELISA) koje se koriste za otkrivanje specifičnih antitela protiv SARS-CoV-2, odnosno utvrđivanje visine titra navedenih antitela u uzorcima krvnog seruma. Relativno brza dostupnost rezultata ispitivanja primenom metode *real-time* RT-PCR je, u uređenim zemljama, veoma bitan element predlaganja i sprovođenja odgovarajućih epidemioloških mera u cilju stavljanja epidemije, odnosno pandemije pod kontrolu.

Pored izuzetnog značaja koji pravovremena laboratorijska dijagnostika uzročnika ima u suzbijanju epidemije, drugi važan aspekt je priprema kvalitetne vakcine čija će primena imati za cilj zaustavljanje širenja infekcije. Neophodno je napomenuti da vakcinacija predstavlja najefikasniji poznati način za preventivno delovanje u cilju sprečavanja pojave oboljenja izazvanih virusima. Imajući u vidu da je SARS-CoV-2 novi virus koji se prethodno nije javljao kao uzročnik infekcija kod ljudi i da je do kraja 2020. godine izazvao smrt velikog broja ljudi, ceo svet iščekuje pojavu efikasne i bezbedne vakcine protiv navedenog virusa.

Prema literaturnim podacima, do jula 2020. godine u svetu je bilo 115 kandidata za vakcine protiv oboljenja poznatog pod nazivom KOVID-19, od čega se dejstvo 78 pripremljenih preparata aktivno klinički ispituje. Među njima se, kao najozbiljniji kandidati za vakcine koje bi se zatim masovno proizvodile, izdvajaju mRNA 1273 vakcina proizvođača kompanije Moderna, RNK vakcina proizvođača kompanija Fajzer i Biontek, zatim Sputnik V vakcina proizvođača Istraživačkog instituta za epidemiologiju i mikrobiologiju Gamaleja iz Moskve, odnosno ChAdOx1nCoV-19 vakcina pripremljena na Univerzitetu u Oksfordu u saradnji sa kompanijom Astra Zeneca. Pored ovih vakcina, u Kini su u toku završna ispitivanja primene vektorske vakcine proizvođača CanSino Biologics, odnosno inaktivisane vakcine proizvođača Sinovac Biotech i CNBG.

Kao što je navedeno, vakcine proizvođača kompanija Moderna i Fajzer (u saradnji sa Biontek-om) su RNK vakcine. Njihovo delovanje se zasniva unošenju u organizam informacione RNK koja nosi gen za sintezu S proteina virusa prema kome zatim organizam razvija imunološki odgovor. Na isti način deluje i vakcina proizvođača Moderna.

Vakcina koja je pripremljena na Univerzitetu Oksford, u saradnji sa kompanijom Astra Zeneca i vakcina pripremljena u Istraživačkom institutu za epidemiologiju i mikrobiologiju Gamaleja u Moskvi su vektorske vakcine. To su vakcine pripremljene na platformi vakcinalnog soja humanog adenovirusa u čiji genom je integrisan deo genoma SARS-CoV-2 koji kodira sintezu strukturnog (S) proteina spoljašnjeg omotača virusa koji je ključan za vezivanje virusa za ACE2 receptore na površini ćelije domaćina. Posle aplikacije vakcine, organizam prema sintetisanom S proteinu virusa razvija imunološki odgovor. Na isti način deluje i kineska vakcina proizvođača Can Sino Biologics (vakcina pod nazivom Ad5-nCoV).

Izuzetno je značajno da vakcine koje bi se koristile u prevenciji pojave infekcije izazvane SARS-CoV-2 budu bezbedne i efikasne za upotrebu u humanoj populaciji i da ne izazivaju neke drastične neželjene efekte. Odgovornost društvenih zajednica širom sveta jeste da prihvate vakcinaciju kao najbolji način da se čovečanstvo oslobodi ove pandemije koja je već do sada ostavila izuzetno teške posledice u celom svetu.

Zahvalnica

Rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-68/2020-14/200143)

LITERATURA

1. Asanoa KM, de Souza SP, de Barros IN, Ayres GR, Souza Silva SO, Richtzenhain LJ et al, 2010, Multiplex semi-nested RT-PCR with exogenous internal control for simultaneous detection of bovine coronavirus and group A rotavirus, *J Virol Met*, 169, 375–9.
2. Boileau MJ, Kapil S, 2010, Bovine coronavirus associated syndromes, *Vet Clin N Am Food A*, 26, 123–46.
3. Chen HY, Yang MF, Cui BA, Cui P, Sheng M, Chen G et al, 2010, Construction and immunogenicity of a recombinant fowlpox vaccine coexpressing S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus and chicken IL-18. *Vaccine*, 28, 8112–9.
4. de WJJ S, Cook JKA, van der Heijden HMJF, 2011, Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures, *Avian Pathol*, 40, 223–35.
5. Erles K, Shiu K, Brownlie J, 2007, Isolation and sequence analysis of canine respiratory coronavirus, *Vir Res*, 124, 78–87.
6. Goodrich EL, Mittel LD, Glaser A, Ness SL, Radcliffe RM, Divers TJ, 2020, Novel findings from a beta coronavirus outbreak on an American Miniature Horse breeding farm in upstate New York, *Equine Vet Educ*, 32, 150–4.
7. Huang X, Chen J, Yao G, Guo Q, Wang J, Liu G, 2019, A TaqMan – probe- based multiplex real-time RT-qPCR for simultaneous detection of porcine enteric coronaviruses, *Appl Microbiol Biotechnol*, 103, 4943-52.
8. Liu X, Zhang Q, Zhang L, Zhou P, Yang J, Fang Y et al., 2019, A newly isolated Chinese virulent genotype G11b porcine epidemic diarrhea virus strain: Biological characteristics, pathogenicity and immune protective effects as an inactivated vaccine candidate, *Vir Res*, 259, 18–27.
9. Nemoto M, Kanno T, Bannai H, Tsujimura K, Yamanaka T, Kokado H, 2017, Antibody response to equine coronavirus in horses inoculated with a bovine coronavirus vaccine, *J Vet Med Sci*, 79, 1889–91.
10. Naguib MM, El-Kady MF, Lüschow D, Hassan KE, Arafa A, El-Zanaty A et al., 2017, New real time and conventional RT-PCRs for updated molecular diagnosis of infectious bronchitis virus infection (IBV) in chickens in Egypt associated with frequent co-infections with avian influenza and Newcastle Disease viruses, *J Virol Meth*, 245, 19–27.
11. Nišavić J, Milić N, Radalj A, 2020, Overview of the most significant coronavirus infections in veterinary medicine, *Veterinarski Glasnik*, 74, 1, 1-17.
12. Ntafis V, Mari V, Decaro N, Papanastassopoulou M, Pardali D, Rallis TS et al., 2013, Canine coronavirus, Greece. Molecular analysis and genetic diversity characterization, *Infection, Gen Evol*, 16, 129–36.
13. Olsen CW, Corapi WV, Ngichabe CK, Baines JD, Scott FW, 1992, Monoclonal antibodies to the spike protein of feline infectious peritonitis virus mediate antibody-dependent enhancement of infection of feline macrophages, *J Virol*, 66, 2, 956–65.
14. Pratelli A, Tinelli A, Decaro N, Martella V, Camero M, Tempesta M, et al., 2004, Safety and efficacy of a modified live canine coronavirus vaccine in dogs, *Vet Microbiol*, 99, 43–9.
15. Sanz MG, Kwon S, Pusterla N, Gold JR, Bain F, Evermann J, 2019, Evaluation of equine coronavirus fecal shedding among hospitalized horses, *J Vet Int Med*, 33, 918-22.
16. Song D, Moon H, Kang B, 2015, Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines, *Clin Exp Vacc Res*, 4, 166–76.

17. Tekelioglu T, Berriatua E, Turan N, Helps CR, Kocak M, Yilmaz H, 2015, A retrospective clinical and epidemiological study on feline coronavirus (FCoV) in cats in Istanbul, Turkey, *Prev Vet Med*, 119, 41–7.
18. Tizard IR, 2020a, Vaccination against coronaviruses in domestic animals, *Vaccine*, 38, 5123–30.
19. Tizard IR, 2020b, *Vaccines for Veterinarians*, Elsevier, 236.
20. Vlasova AN, Wang Q, Jung K, Langel SN, Malik YS, Saif LJ, 2020, Porcine Coronaviruses, *Emerging and Transboundary Animal Viruses*, 79 –110.

CORONAVIRUS INFECTIONS OF ANIMALS - DIAGNOSTICS AND IMMUNOPROPHYLAXIS

Nišavić Jakov, Milić Nenad, Radalj Andrea

Coronavirus infections in animals have been recognized in veterinary medicine for a long time. Coronaviruses are a large group of RNA viruses causing respiratory, enteric, and neurologic disease in diverse animal species. Feline infectious peritonitis, transmissible gastroenteritis of swine, infectious bronchitis, and porcine epidemic diarrhea are only a few among many coronavirus diseases treated and prevented by veterinarians. Having in mind that coronavirus infections are very common in different animal species, the use of proper diagnostic tests, as well as determining efficient immunoprophylactic methods, is very important. Laboratory diagnostics of coronavirus infections is based on the application of several standard and molecular methods such as virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR or real-time RT-PCR). Today, the prevention of these infections in different animal species relies on many commercially available coronavirus vaccines. Most of these products are inactivated and live-attenuated vaccines.

Key words: coronavirus infections, immunoprophylaxis, laboratory diagnostics

Organizaciju XLII simpozijuma za inovacije znanja veterinara, finansijski su podržale sledeće organizacije i preduzeća:

Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede – Uprava za veterinu

Veterinarska komora Srbije

Naučni institut za veterinarstvo Srbije

Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad

Institut za higijenu i tehnologiju mesa

Veterinarski institut dr Vaso Butozan

Veterinarski specijalistički institut Kraljevo

Veterinarski specijalistički institut Šabac

Veterinarski specijalistički institut Požarevac

Veterinarski specijalistički institut Sombor

Veterinarski specijalistički institut Jagodina

Veterinarski specijalistički institut Niš

Veterinarski specijalistički institut Zaječar

Veterinarski specijalistički institut Subotica

Veterinarski specijalistički institut Pančevo

Veterinarski specijalistički institut Zrenjanin

Veterinarski zavod Subotica – Labiana

Veterinarska stanica Zoolek

Veterinarska stanica Mladenovac

Veterinarska stanica Bujanovac

Beoveterina

Kinološki savez Srbije

Superlab

Promedia

Elixir feed aditives

Sano – savremena ishrana životinja

Biochem Balkan

Primavet

Korvet team

Fish Corp. 2000 feed

Royal Vet

Vetanova

Krka farm

CIP - Каталогизација у публикацији - Народна библиотека Србије, Београд
636.09(082)

СЕМИНАР за иновације знања ветеринара (42 ; 2021 ; Београд)
Zbornik predavanja XLII Seminara za inovacije znanja veterinara,
Beograd, 2021 / [urednik Lazarević Miodrag]. - Beograd : Fakultet
veterinarske medicine, Centar za izdavačku delatnost i promet učila, 2021
(Beograd : Naučna KMD). - [8], 195 str. : ilustr. ; 24 cm

Na vrhu nasl. str.: Univerzitet u Beogradu. - Tiraž 450. - Str. [3]:
Predgovor / Milorad Mirilović, Danijela Kirovski. - Bibliografija uz svaki
rad. - Summeries. - Registar.

ISBN 978-86-80446-41-7

а) Ветерина - Зборници

COBISS.SR-ID 31706889

ISBN 978-86-80446-41-7



МИНИСТАРСТВО ПОЉОПРИВРЕДЕ,
ШУМАРСТВА И ВОДОПРИВРЕДЕ
РЕПУБЛИКЕ СРБИЈЕ



ВСИ ЈАГОДИНА



ВСИ ЗРЕЊАНИН