

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

Radoš D. Miković

MOLEKULARNA DETEKCIJA I
FILOGENETSKA ANALIZA VIRUSA
AUJECKIJEVE BOLESTI, PARVOVIRUSA I
SVINJSKOG CIRKOVIRUSA TIP 2 KOD SVINJA
U CRNOJ GORI

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.godina

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Radoš D. Miković

MOLECULAR DETECTION AND
PHYLOGENETIC ANALYSIS OF AUJESZKY'S
DISEASE VIRUS, PARVOVIRUS AND PORCINE
CIRCOVIRUS TYPE 2 OF SWINE IN
MONTENEGRO

Doctoral dissertation

Belgrade, 2017.

Mentor

Dr Jakov Nišavić, vanredni profesor Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

1. Dr Jakov Nišavić, van.profesor
 2. Dr Nenad Milić, red.profesor
 3. Dr Dejan Krnjaić, red.profesor
 4. Dr Aleksandra Knežević, van.profesor
- Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane _____

MOLEKULARNA DETEKCIJA I FILOGENETSKA ANALIZA VIRUSA AUJECKIJEVE
BOLESTI, PARVOVIRUSA I SVINJSKOG CIRKOVIRUSA TIP 2 KOD SVINJA U CRNOJ
GORI

REZIME

Primenom metode PCR u ispitanim uzorcima svinja ustanovljeno je prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti, parvovirusa svinja i svinjskog cirkovirusa tip 2. Metodom direktnog sekvenciranja po Sanger-u određen je redosled nukleotida dela gB gena virusa Aujeckijeve bolesti. Tri nukleotidne sekvence virusa Aujeckijeve bolesti uključene u filogenetsku analizu su pokazale visok stepen sličnosti sa sekvencama navedenog virusa izolovanim u u Mađarskoj, Grčkoj i SAD. Na osnovu rezultata filogenetske analize ustanovljeno je da sva tri virusa Aujeckijeve bolesti identifikovana kod svinja u Crnoj Gori pripadaju genotipu I navedenog virusa. Metodom direktnog sekvenciranja po Sanger-u određen je redosled pet odabranih parvovirusa svinja identifikovana u Crnoj Gori. Na osnovu rezultata filogenetske analize parvovirusi svinja identifikovani u Crnoj Gori grupisani su zajedno sa sojevima navedenog virusa poreklom Velike Britanije, Kine, Brazila i SAD. Dobijeni rezultati filogenetske analize su pokazali da svinjski parvovirusi poreklom od svinja sa teritorije Crne Gore pripadaju klasteru E navedenog virusa. Primenom metode direktnog sekvenciranja po Sanger-u određen je redosled nukleotida dela ORF1 regiona genoma virusa PCV2. Nukleotidne sekvence identifikovanih PCV2 virusa imale su visok stepen sličnosti sa sojevima navedenog virusa izolovanim u Italiji, Austriji, Srbiji, Nemačkoj i Kini. Dobijeni rezultati filogenetske analize šest identifikovanih virusa PCV2 su potvrdili da njih pet pripada genotipu PCV2b, a jedan genotipu PCV2c.

Ključne reči: virus Aujeckijeve bolesti, parvovirus svinja, virus PCV2, PCR, filogenetska analiza

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Mikrobiologija sa imunologijom

UDK broj:

MOLECULAR DETECTION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF AUJESZKY'S DISEASE VIRUS, PARVOVIRUS AND PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 OF SWINE IN MONTENEGRO

SUMMARY

The presence of Aujeszky's disease virus, porcine parvovirus and porcine circovirus type 2 were detected by PCR method. Nucleotide sequences of Aujeszky's disease virus identified in swine in Montenegro were determined by direct sequencing method according to Sanger. Three nucleotide sequences included in phylogenetic analysis were highly similar with nucleotide sequences of Aujeszky's disease virus strains identified in Hungary, Greece and USA. According to results of phylogenetic analysis, it was concluded that all three viruses belongs to genotype I. Nucleotide sequences of five porcine parvoviruses identified in Montenegro were determined by direct sequencing method according to Sanger and were highly similar with nucleotide sequences of porcine parvovirus strains isolated in United Kingdom, China, Brasil and USA. Phylogenetic analysis of five porcine parvoviruses revealed that all of them belongs to cluster E. The nucleotide sequences of six porcine circovirus type 2 identified in Montenegro were determined by direct sequencing method according to Sanger and were highly similar with nucleotide sequences of PCV2 strains isolated in Italy, Austria, Serbia, Germany and China. The phylogenetic analysis of six porcine circovirus type 2 showed that five of them belongs to genotype PCV2b, and one to genotype PCV2c.

Key words: Aujeszky's disease virus, porcine parvovirus, PCV2, PCR, phylogenetic analysis

Major Field of Study: Veterinary medicine

Special Field of Study: Microbiology and immunology

UDK Number:

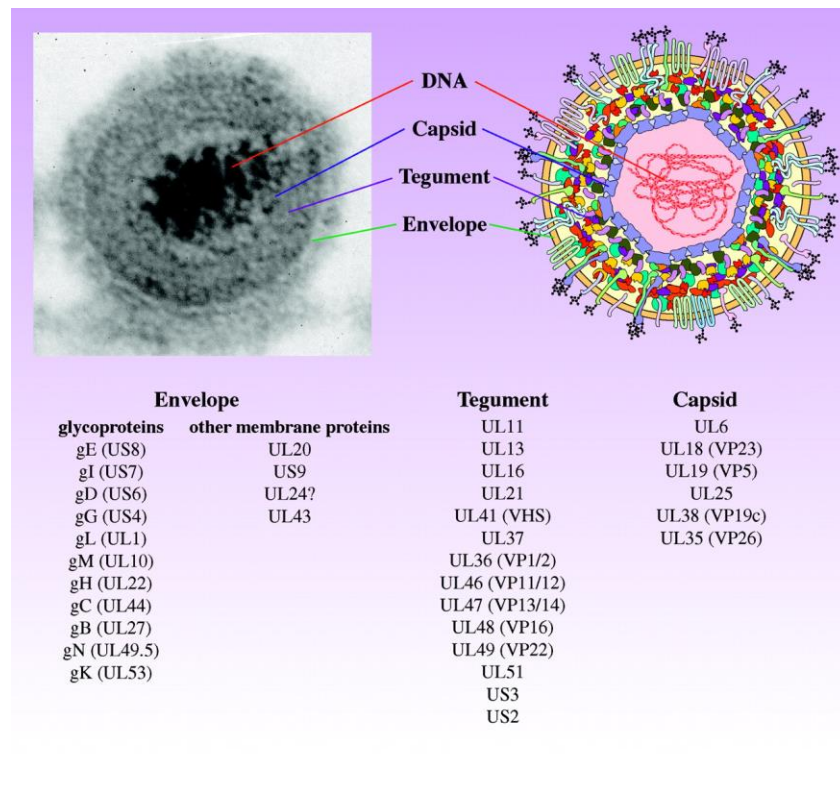
SADRŽAJ

UVOD.....	1
PREGLED LITERATURE.....	10
CILJ I ZADACI ISPITIVANJA.....	39
MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA.....	40
REZULTATI ISPITIVANJA.....	50
DISKUSIJA.....	70
ZAKLJUČCI.....	84
SPISAK LITERATURE.....	86

1. UVOD

1.1. Virus Aujeckijeve bolesti

Virus Aujeckijeve bolesti, pseudorabijes virus ili herpesvirus 1 svinja (SuHV-1) pripada rodu *Varicellovirus*, podfamiliji *Alphaherpesvirinae* i familiji *Herpesviridae*. Genom virusa čini linearni dvolančani molekul DNK od 143kb. Genom virusa sadrži 72 gena (Slika 1.). Virus Aujeckijeve bolesti poseduje spoljašnji omotač u čijem sastavu se nalaze glikoproteinski antigeni virusa koji su ključni za odvijanje procesa uspostavljanja virusne infekcije ćelije, među kojima je glikoprotein B (gB) jedan od najznačajnijih. Infekcija izazvana virusom Aujeckijeve bolesti je prvi put opisana 1813.godine. Od 1960.godine se posebna pažnja obraća na suzbijanje infekcija svinja izazvanih navedenim virusom.



Slika 1. Virus Aujeckijeve bolesti (mibr.asm.org)

Do danas su opisana četiri genotipa i nekoliko podtipova virusa Aujeckijeve bolesti. Kod evropskih divljih svinja ustanovljeno je prisustvo sojeva virusa Aujeckijeve bolesti koji pripadaju genotipu 1 virusa, dok je kod domaćih životinja na teritoriji Evrope utvrđeno dominantno prisustvo sojeva virusa koji pripadaju genotipovima 1 i 2. Prisustvo sojeva virusa koji pripadaju genotipovima 3 i 4 virusa je ustanovljeno na teritorijama Severne Amerike i Azije.

Pseudorabijes virus, odnosno virus Aujeckijeve bolesti je otporan prema uticajima spoljašnje sredine. U stočnoj hrani tokom leta može opstati do mesec dana, a zimi i duže. Direktna sunčeva svetlost inaktivira ga za 6 časova a UV zraci za 1 min. Više dezinfekcionih sredstava inaktivira virus među kojima je isti najosetljiviji prema delovanju natrijum hidroksida (3%) i formalina (1%).

Virus Aujeckijeve bolesti u ćelijskim linijama poreklom od različitih vrsta životinja izaziva pojavu citopatogenog efekta. Može se umnožavati i u kokošijim embrionima kada izaziva uginuće embriona.

Virus se prenosi kapljičnim putem i posle infekcije u organizmu se najpre umnožava u sluzokoži nazofarinksa i u tonzilama. Sa primarnog mesta replikacije virus dospeva do regionalnih limfnih čvorova i centralnog nervnog sistema preko aksona kranijalnih nerava. Virulentni sojevi virusa Aujeckijeve bolesti izazivaju kratkotrajnu viremiju kojom se distribuiraju po celom organizmu, a posebno u respiratornom sistemu. Kod velikog broja inficiranih životinja dolazi do razvoja latentnog oblika infekcije sa lokalizacijom virusa u trigeminalnim ganglijama i tonzilama. Za vreme latentne infekcije organizma ne dolazi do izlučivanja virusa u spoljašnju sredinu. Delovanje stresa ili imunosupresivnih lekova može dovesti do reaktivacije virusa i njegovog ponovnog izlučivanja u spoljašnju sredinu.

Svinje su prirodni domaćini virusa Aujeckijeve bolesti. Ostale vrste životinja su osetljive na infekciju virusom Aujeckijeve bolesti koja se kod njih ispoljava u vidu lažnog besnila ili pseudorabijesa i završava uglavnom sa smrtnim ishodom. Ljudi su otporini na infekciju ovim virusom. Kod prasadi na sasi posle infekcije virusom Aujeckijeve bolesti mortalitet dostiže i do 100%. Inkubacija kod prasadi traje svega 36 časova, za razliku od starijih svinja kod kojih iznosi pet dana. Ovde treba naglasiti da težina kliničkih simptoma kod obolelih svinja zavisi od virulencije soja virusa koji je izazvao infekciju kao i od starosti svinja. Kod mladih svinja inficiranih virusom Aujeckijeve bolesti dolazi do pojave nekordinisanog kretanja, tremora i

konvulzija (Slika 2.). Obolele životinje uginu u roku od dva dana. Kod infekcije zalučene prasadi mortalitet je značajno manji. Oboljenje prasadi odbijene od sise se manifestuje razvojem neuroloških i respiratornih kliničkih simptoma bolesti. Kod svinja u tovu oboljenje izazvano virusom Aujeckijeve bolesti se manifestuje pojavom povišene temperature i groznice, gubitkom težine, kijanjem, kašljanjem, iscetkom iz nosa i otežanim disanjem. Kod ovih životinja uglavnom ne dolazi do razvoja nervnih simptoma bolesti. Infekcija krmača u toku ranog graviditeta obično dovodi do resorpcije fetusa i pojave estrusa. U kasnijoj fazi graviditeta kod obolelih krmača dolazi do pojave abortusa, odnosno rađanja mrtvorodne prasadi. U zapaćtima sa endemićnom pojavom infekcije svinja, prasad su zašćićena prisustvom maternalnih antitela u krvi. Infekcija ostalih vrsta domaćih životinja izazvana virusom Aujeckijeve bolesti se javlja sporadićno i karakterišu je nervni simptomi slični besnilu. Kod obolelih životinja dolazi do ispoljavanja izrazitog svraba koji može dovesti i do samopovređivanja. Ovo se posebno odnosi na preživare. Klinićki tok bolesti je kratak, a obolele životinje sa klinićkim simptomima bolesti uginu u roku od nekoliko dana. Kod inficiranih pasa dolazi do pojave svraba i paralize farinksa i vilice koje prati pojava pljuvaćke na njušći slična onoj kod besnila. Ali, psi u ovom slućaju ne napadaju druge životinje. Kod maćaka je klinićki tok bolesti veoma brz.



Slika 2. Infekcija svinja izazvana virusom Aujeckijeve bolesti (www.thepigsite.com)

Infekcija svinja izazvana virusom Aujeckijeve bolesti je endemična u većini zemalja u svetu. Ukoliko dođe do infekcije, ona se veoma brzo širi u zapatu svinja. Iz obolelog organizma virus se izlučuje putem sekreta iz nosa i očiju, mleka i semena. Prenosenje bolesti se najčešće odvija direktnim kontaktom između obolele i zdrave svinje ili putem kapljica sekreta. Takođe, utvrđena je mogućnost transplacentarnog prenošenja virusa sa inficirane majke na plod. Izvor infekcije virusom Aujeckijeve bolesti mogu biti i abortirani fetusi svinja. Ovce su veoma osetljive na infekciju virusom Aujeckijeve bolesti i inficiraju se direktnim kontaktom sa inficiranim ili obolelim svinjama ili putem kapljica sekreta kada se nalaze u istoj prostoriji sa svinjama. Karnivore lešinari se inficiraju konzumiranjem kontaminisanog svinjskog mesa. Psi i mačke su osetljivi na infekciju prethodno navedenim virusom. Inficiraju se ingestijom zaraženog svinjskog mesa. Mogućnost prenošenja infekcije sa ovih životinja na druge je ograničena zbog kratkog perioda inkubacije i brzog kliničkog toka bolesti koji se, bez izuzetka, završava letalno.

U cilju dijagnostike infekcije životinja izazvane virusom Aujeckijeve bolesti koristi se više laboratorijskih metoda koje obuhvataju izolaciju virusa u kulturi ćelija i/ili otkrivanje prisustva virusnih antigena u uzorcima suspektog materijala (imunofluorescencija), zatim otkrivanje prisustva specifičnih antitela protiv svinjskog herpesvirusa 1 u uzorcima krvnog

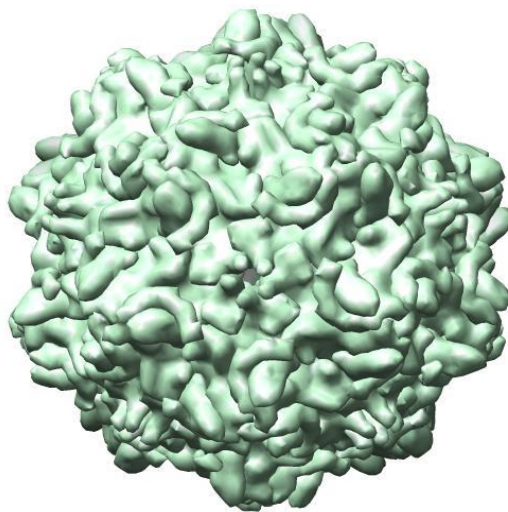
seruma (ELISA), odnosno histopatološki pregled uzoraka. Pored navedenih metoda, u dijagnostici Aujeckijeve bolesti se koristi se i lančana reakcija polimeraze (PCR).

U cilju sprečavanja izbijanja infekcije u zaptima svinja primenjuju se mere aktivne veštačke imunizacije svinja primenom odgovarajućih modifikovanih živih, inaktivisanih i specifičnih genetski modifikovanih vakcina. Preboljenjem životinje stiču imunitet koji traje od nekoliko meseci do 3 godine. Ovde treba napomenuti da se u mnogim zemljama u svetu primenjuju mere iskorenjavanja infekcije životinja izazvane virusom Aujeckijeve bolesti.

1.2. Parvovirus svinja

Parvovirus svinja (PPV) pripada familiji *Parvoviridae*, subfamiliji *Parvovirinae* i rodu *Parvovirus*. Genom parvovirusa svinja poseduje linearni jednolančani molekul DNK. DNK parvovirusa svinja je veličine od 5kb. Virus ne poseduje spoljašnji omotač (Slika 3.).

Parvovirus svinja je prilično otporan na rastvarače masti. Može da izdrži delovanje temperature od 56°C tokom vremenskog perioda od 30 minuta do 1 čas.



Slika 3. Parvovirus svinja (www.rcsb.org)

Infekcije svinja izazvane parvovirusom izazivaju značajne ekonomske gubitke u proizvodnji svinja širom sveta. Kod životinja izaziva reproduktivne poremećaje koji se manifestuju pojavom uginuća embriona i abortusom. Priplodne nazimice su najosetljivije na infekciju izazvanu parvovirusom svinja.

Infekcija svinja izazvana parvovirusom svinja oronazalnim putem ili putem sperme dovodi do lokalne replikacije virusa na mestu ulaska u organizam što je praćeno pojavom viremije. Virus pokazuje naročiti tropizam prema mitotički aktivnim ćelijama fetusa.

Kod krmača koje nisu immune na infekciju virusom u broj trećini graviditeta dolazi do pojave uginuća ploda i njegove resorpcije. Ukoliko do infekcije dođe oko 70. dana graviditeta, virus prolazi transplacentarnu barijeru i dovodi do uginuća i mumifikacije fetusa (Slika 4.). Infekcija svinja posle 70. dana graviditeta dovodi do rađanja seropozitivne prasadi.

Infekcija svinja izazvana parvovirusom se u inficiranim zaptima manifestuje pojavom oprašivanja manjeg broja prasadi, zatim pojavom mumificiranih plodova u različitim fazama intrauterinog razvića. Novorođena prasadi su slabo vitalna, a kod krmača je uočena pojava lažnog graviditeta.



Slika 4. Mumificirani fetusi svinja (www.pig333.com)

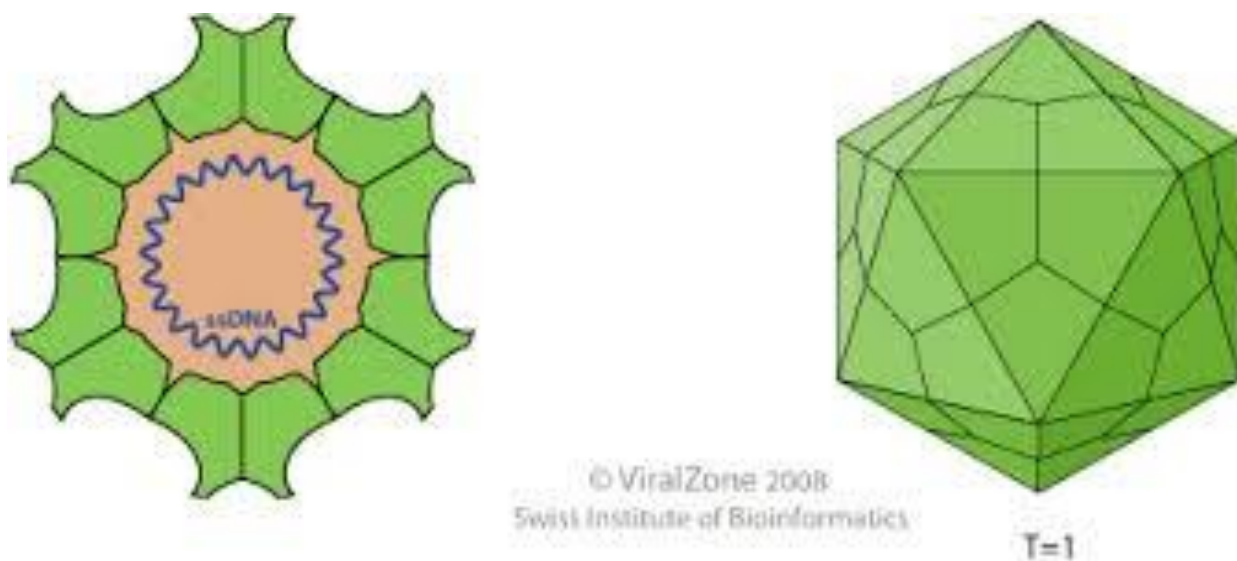
Laboratorijska dijagnostika parvovirusne infekcije svinja se zasniva na primeni više klasičnih i molekularnih metoda. Od klasičnih metoda u upotrebi su metoda izolacije virusa u

ćelijskim linijama i virus neutralizujući test, zatim testovi hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije, odnosno tehnike imunofluorescencije. Od molekularnih metoda danas su najviše u primeni konvencionalni PCR i Real – time PCR.

Vakcinacija svinja protiv infekcije izazvane svinjskim parvovirusom se vrši primenom vise komercijalnih vakcina dostupnih na tržištu.

1.3. Svinjski cirkovirus tip 2

Cirkovirus 2 svinja pripada rodu *Circovirus* i familiji *Circoviridae*. Genom virusa čini jednolančani cirkularni molekul DNK. Virus PCV2 ne poseduje spoljašnji omotač (Slika 5.). Cirkovirus svinja tip 2 je veoma otporan u spoljašnjoj sredini. Na temperaturi od 60°C zadržava infektivnost 30 min. Dobro podnosi i različite vrednosti pH.



Slika 5. Svinjski cirkovirus tip 2 (education.expasy.org)

Do danas je utvrđeno postojanje četiri genotipa: PCV2a, PCV2b, PCV2c i PCV2d.

Svinjski cirkovirus tip 2 izaziva oboljenja kod svih starosnih kategorija svinja, ali najčešće oboljevaju prasadi. Virus nije infektivan za druge vrste životinja. Prvi put je izolovan 1997. godine i danas je jedan od najznačajnijih uzročnika infekcija kod svinja.

Virus ulazi u organizam ingestijom ili inhalacijom, a u zapatu svinja se prenosi direktnim kontaktom između životinja. Izlučuje se iscetkom iz nosa, zatim pljuvačkom i sekretom iz očiju

inficiranih svinja kao i preko mokraće i fecesa. Ovde treba napomenuti da infekcija i klinička slika oboljenja svinja izazvana virusom PCV2 zavisi od starosne kategorije i načina uzgoja životinja kao i od virulencije soja virusa prisutnog u zapatu.

Infekcija svinja izazvana svinjskim cirkovirusom tip 2 može se ispoljiti na nekoliko načina:

- subklinička infekcija je po mnogim autorima najčešći vid infekcije svinja virusom PCV2 i manifestuje smanjenim dnevnim prirastom u telesnoj težini inficirane životinje;
- multisistemski sindrom kržljivosti prasadi posle zalučenja (PMWS) koji se manifestuje pojavom gubitaka u telesnoj težini inficiranih životinja i bledilom kože sa mogućom pojavom crvenih jasno ograničenih promena koje kasnije konfluiraju. Kod obolele prasadi dolazi do pojave proliva povraćanja i dispnee. U nekim slučajevima dolazi do pojave ikterusa. Nastanku multisistemskog sindroma kržljivosti prasadi posle zalučenja (PMWS) doprinose i loši uslovi držanja i ishrane životinja;
- infekcija virusom PCV2 koja se ispoljava promenama na reproduktivnim organima praćena je pojavom rađanja slabo vitalne prasadi, mumifikacijom plodova i abortusa najčešće u kasnoj fazi gestacije;
- sindrom dermatitis i nefropatije (PDNS) se manifestuje pojavom anoreksije, depresije i ukočenosti obolelih životinja. Oboljenje se ispoljava i u vidu pojave tamno – crvenih papula i papula po koži uglavnom zadnjih ekstremiteta i u perinealnoj regiji. Ovaj vid infekcije se najčešće javlja kod prasadi, ređe kod nazimica i priplodnih kategorija svinja. Akutno inficirane svinje uginjavaju u roku od nekoliko dana posle pojave kliničkih simptoma bolesti. Životinje koje prebole infekciju, oporavljaju se za sedam do deset dana (Slika 6.);
- infekcija svinja izazvana virusom PCV2 se može manifestovati pojavom respiratornih promena, odnosno pojavom dijareje;
- U SAD je tokom 2009. godine kod prasadi na sisi i prasadi u tovu ustanovljena pojava infekcije koja se ispoljavala pojavom perakutnog sindroma nazvanog akutni pulmonalni edem (APE).



Slika 6. PDNS (www.pig333.com)

Laboratorijska dijagnostika infekcije svinja izazvane svinjskim cirkovirusom tip 2 se zasniva na primeni više klasičnih i molekularnih metoda virusološke dijagnostike. Od klasičnih metoda koriste se metode ELISA, imunofluorescencije, a za umnožavanje virusa i odgovarajuće ćelijske linije pripremljene od tkiva svinja. Ovde treba naglasiti da virus u inokulisanim kulturama ćelija ne izaziva citopatogeni efekat, tako da se njegovo prisustvo u njima uglavnom dokazuje metodom lančane reakcije polimeraze (PCR) ili odgovarajućim imunohistohemijskim metodama. Od molekularnih metoda u cilju laboratorijske dijagnostike infekcije svinja izazvane svinjskim cirkovirusom 2 koriste se metode kao što su konvencionalni PCR i Real-Time PCR.

U cilju sprečavanja pojave infekcije svinja izazvane virusom PCV2 danas se sprovode mere aktivne veštačke imunizacije životinja uz primenu više vrsta komercijalnih vakcina dostupnih na tržištu, od kojih su najveći broj inaktivisane virusne vakcine.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Virus Aujeckijeve bolesti

Maes i sar., 1990. su tokom istraživanja vršili ispitivanje uzoraka ganglija latentno inficirane prasadi primenom metode PCR. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se navedena metoda uz korišćenje prajmera za gX gen i gII gen virusa Aujeckijeve bolesti može uspešno koristiti za brzu i pouzdanu dijagnostiku navedenog virusa kod latentno inficiranih životinja.

Sherba i sar., 1992. su sprovedi istraživanja koja su imala za cilj uspostavljanje protokola za izvođenje lančane reakcije polimeraze (PCR) za razlikovanje terenskih od vakcinalnih sojeva virusa Aujeckijeve bolesti identifikovanih u uzorcima organa svinja. U navedene svrhe vršena je inokulacija ćelijske linije PK-15 sa terenskim sojem WT virusa i vakcinalnim sojem virusa sadržanim u SyntroVet Marker vakcini. Posle izolacije virusa u navedenim ćelijskim linijama, vršena je pojedinačna veštačka infekcija oglednih životinja inokulacijom ili samo terenskog soja virusa ili samo vakcinalnog soja virusa (TH+, Gx+) što je praćeno inokulacijom vakcinalnog soja virusa sadržanog u vakcini SyntroVet Marker dva meseca kasnije. Posle 28 dana od završetka ogleda, izvršena je eutanazija oglednih životinja i prikupljeni su uzorci trigeminalnih ganglija. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se uspostavljeni protokol za izvođenje metode PCR može uspešno koristiti u dijagnostici mešovite infekcije svinja izazvane terenskim sojem virusa Aujeckijeve bolesti i/ili pojedinim rekombinantnim vakcinalnim sojevima navedenog virusa.

Ishikawa i sar., 1995. su uspostavili protokol za izvođenje metode PCR za razlikovanje terenskih od vakcinalnih sojeva virusa Aujeckijeve bolesti. U ispitivanjima su korišćeni Yamagata –S81, NIA3 i Indijana S sojevi virusa Aujeckijeve bolesti, kao i još deset sojeva navedenog virusa izolovanih na teritoriji Japana. Pored navedenih sojeva u ispitivanjima je korišćen i jedan vakcinalni soj virusa sadržan u modifikovanoj živoj vakcini. Protokol za izvođenje metode PCR je bio namenjen za detekciju prisustva glikoprotein III gena koji je prisutan kod terenskih sojeva virusa, a deletiran kod vakcinalnih sojeva virusa Aujeckijeve bolesti. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se uspostavljeni protokol za izvođenje

metode PCR može uspješno koristiti za razlikovanje terenskih od vakcinalnih sojeva virusa Aujeckijeve bolesti u ispitivanim uzorcima.

Capau i sar., 1997. su primenom metode RFLP (restriction fragment length polymorphism) ispitali sve sojeve virusa Aujeckijeve bolesti izolovane kod životinja tokom perioda od 23 godine na teritoriji Republike Italije, odnosno na području ukupno 12 regiona zemlje. Ukupno je ispitano 30 sojeva navedenog virusa. Dvadeset devet sojeva virusa Aujeckijeve bolesti je bilo poreklom od domaćih svinja, dok je jedan soj bio poreklom od divlje svinje. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da sojevi virusa Aujeckijeve bolesti izolovani kod životinja u period od 1972. godine do 1984. godine pripadaju grupi I. Sojevi navedenog virusa izolovani u periodu od 1984. godine i dalje su pripadali grupi II. Izolacija soja virusa Aujeckijeve bolesti iz uzoraka jedne divlje svinje za koga je utvrđeno da pripada grupi I izolata potvrdila je hipotezu da su divlje svinje rezervoari virusa Aujeckijeve bolesti, odnosno da virus perzistira u organizmu ovih životinja.

Bascunana i sar., 1997. su izvršili ispitivanja prisustva virusa Aujeckijeve bolesti u uzorcima organa imunosupresivnih i životinja koje nisu bile u imunosupresiji primenom metoda imunohistohemije, izolacije virusa u ćelijskoj liniji odnosno metode PCR uz korišćenje prajmera za glikoproteine B, E i D (gB, gE i gD). Prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti primenom metode PCR je ustanovljeno u uzorcima trigeminalnih ganglija, olfaktornog bulbosa, tonzila i mozga. Primenom metode izolacije virusa u ćelijskoj liniji nije izvršena izolacija virusa Aujeckijeve bolesti u ispitivanim uzorcima, izuzev uzoraka poreklom od tri latentno inficirane svinje koje su služile kao pozitivna kontrola u ispitivanjima. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se metoda PCR uz korišćenje prethodno navedenih prajmera može koristiti za brzu i pouzdanu identifikaciju virusa Aujeckijeve bolesti u ispitivanim uzorcima, odnosno da se navedena metoda može koristiti za sprovođenje širih epizootioloških studija prisustva virusa Aujeckijeve bolesti kod životinja na određenoj teritoriji.

Maes i sar., 1997. navode da je latentna infekcija jedna od karakteristika infekcije životinja izazvane herpesvirusima, uključujući virus Aujeckijeve bolesti. U cilju otkrivanja prisustva virusa u uzorcima ganglija, tonzila ili nekih drugih tkiva danas se primenjuju različite klasične i standardne metode virusološke dijagnostike kao što su metode PCR, izolacije virusa u ćelijskim linijama, odnosno metode imunohistohemije i druge. Reaktivacija virusa i pojava

klinički manifestnog oblika infekcije virusom Aujeckijeve bolesti kod latentno inficiranih životinja se najčešće vrši njihovim tretiranjem kortikosteroidima. U ovom radu autori su razvili protokol za izvođenje metode kvantitativne PCR uz korišćenje prajmera za gC i gE u cilju dokazivanja prisustva virusa kod latentno inficiranih životinja. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se metoda PCR može se sa uspehom koristiti za sprovođenje programa iskorenjivanja infekcije svinja izazvane virusom Aujeckijeve bolesti na određenoj teritoriji.

McCaw i sar., 1997. su sprovedli istraživanja koja su se zasnivala na ispitivanju uticaju maternalnih antitela protiv Aujeckijeve bolesti kod prasadi na uspostavljanje latentne infekcije izazvane navedenim virusom. Tokom ispitivanja prisustvo latentne infekcije prasadi je utvrđivano primenom metode ELISA uz korišćenje dva komercijalna dijagnostička sredstva za izvođenje navedene metode. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da pasivno preneti antitela ne sprečavaju uspostavljanje latentne infekcije kod prasadi posle veštačke infekcije malim dozama virulentnih sojeva virusa Aujeckijeve bolesti.

Vilnis i sar., 1998. su ispitivali uticaj vakcinalnog soja virusa i način aplikacije vakcine na njenu efikasnost posle izvođenja oglada veštačke infekcije u kontrolisanim uslovima. Tokom ispitivanja je korišćeno pet modifikovanih živih vakcina sa genotipski različitim vakcinalnim sojevima virusa. Ogladne životinje su pojedinačno vakcinisane sa svih pet vakcina, intramuskularno ili intranazalno. Oglad veštačke infekcije je izveden korišćenjem visoko virulentnog soja virusa Aujeckijeve bolesti – soj Becker. U periodu od dve nedelje posle veštačke infekcije ogladne životinje su svakodnevno klinički praćene. Posle 30 dana od izvođenja oglada veštačke infekcije životinje su žrtvovane i prikupljani su uzorci tkiva. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da na efikasnost vakcine značajno utiče genotip vakcinalnog soja virusa Aujeckijeve bolesti kao i način aplikacije vakcine. Vakcinacija životinja je takođe smanjila pojavu latentne infekcije svinja u poređenju sa onom utvrđenom kod nevakcinisanih životinja.

Balsch i sar., 1998. su vršili ispitivanja uzoraka cerebrospinalne tečnosti poreklom od svinja prikupljenu u momentu žrtvovanja na prisustvo virusa Auejckijeve bolesti. Ispitivanja su vršena primenom metoda izolacije virusa u ćelijskoj liniji PK-15 i lančane reakcije polimeraze (PCR) uz korišćenje prajmera za glikoprotein B (gB) spoljašnjeg omotača virusa. Ogladne svinje, od kojih su neke ranije bile vakcinisane protiv infekcije izazvane virusom Aujeckijeve

bolesti, su bile pojedinačno veštački inficirane različitim dozama soja NIA-3 navedenog virusa. Kao što je prethodno izneto, neposredno pre žrtvovanja od oglednih životinja su prikupljeni uzorci cerebrospinalne tečnosti koja je zatim ispitivana na prisustvom virusa primenom prethodno navedenih metoda. Izolacija virusa Aujeckijeve bolesti je izvršena iz samo jednog uzorka cerebrospinalne tečnosti, dok je primenom metode PCR virus identifikovan u najvećem broju uzoraka. Prisustvo virusa primenom metode PCR nije ustanovljeno u uzorcima cerebrospinalne tečnosti poreklom od svinja koje su preživele akutnu fazu bolesti i koje su bile eutanazirane u 8. nedelji posle veštačke infekcije. Ove životinje su bile latentno inficirane virusom. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja utvrđeno je da se uzorci cerebrospinalne tečnosti ne mogu koristiti za otkrivanje prisustva virusne nukleinske kiseline kod latentno inficiranih životinja, odnosno da cerebrospinalna tečnost nije adekvatan uzorak koji bi se koristio u navedene svrhe. Pored ovoga, dobijeni rezultati su pokazali da se metoda PCR može koristiti za brzu i pouzdanu identifikaciju virusa Aujeckijeve bolesti u ispitivanim uzorcima.

Moreno i sar. su izvršili molekularnu karakterizaciju 54 soja virusa Aujeckijeve bolesti izolovana kod svinja na teritoriji Italije u periodu od 1984.godine do 2010.godine. Molekularna karakterizacija je izvršena primenom metode direktnog sekvenciranja uz korišćenje prajmera za glikoprotein C i E. Od ukupnog broja od 54 soja virusa Aujeckijeve bolesti, ukupno 44 soja virusa je izolovano na farmama svinja, 9 sojeva je bilo poreklom od pasa i jedan poreklom od goveda. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da su sojevi virusa Aujeckijeve bolesti izolovani u uzorcima kod svinja bili srodni sa sojevima navedenog virusa izolovanih u drugim delovima Evrope i Amerike u poslednjih 20 godina. Ovi sojevi virusa su zajedno sa goveđim sojem virusa svrstani su u klaster B. Tri soja virusa identifikovana kod radnih pasa su takođe pripadala klasteru B virusa. Pet sojeva poreklom od svinja koji nisu svrstani u klaster B virusa i šest sojeva poreklom od pasa je svrstano u klaster C. Svi ovi izolati poreklom od pasa su bili od lovačkih pasa koji su hranjeni mesom divljih svinja, izuzev jednog. Šest sojeva virusa Aujeckijeve bolesti koji ne pripadaju klasteru B kao ostali sojevi navedenog virusa, imali su visok stepen sličnosti sa sojevima virusa izolovanih kod svinja u period od 1970. do 1980.godine. Autori navode da je u poslednje dve decenije prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti kod domaćih svinja dramatično smanjeno. Sojevi navedenog virusa, su u ovom periodu, postali prevalentni kod divljih svinja. Pored ovih rezultata, autori navode da su tri soja virusa

Aujeckijeve bolesti izolovana u uzorcima radnih pasa na farmama svrstani u klaster B. Nukleotidne sekvence pet sojeva virusa Aujeckijeve bolesti izolovani kod lovačkih pasa su bile veoma slične sa analognim sekvencama sojeva navedenog virusa izolovanih kod divljih svinja. Dobijeni rezultati ovih ispitivanja su pružili uvid u genetske karakteristike sojeva virusa Aujeckijeve bolesti i otkrili razlike u molekularnim karakteristikama između sojeva virusa izolovanih kod lovačkih pasa i divljih svinja u odnosu na sojeve navedenog virusa izolovanih kod domaćih svinja.

Fonseca i sar., 2010. su izvršili molekularnu karakterizaciju sojeva virusa Aujeckijeve bolesti poreklom sa teritorije Brazila. Ukupno je dvadeset šest sojeva virusa izolovanih u Brazilu bilo uključeno u ispitivanja. Autori posebno ističu značaj glikoproteina C i E spoljašnjeg omotača u procesu vezivanja virusa za receptore na površini ćelije i za patogenezu virusa. Na primer, nedostatak glikoproteina E dovodi do smanjenja virulencije pojedinih sojeva virusa Aujeckijeve bolesti. Vakcinalni sojevi virusa ne sadrže ovaj glikoprotein. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da sojevi virusa Aujeckijeve bolesti pripadaju klasterima A i B, izuzev jednog soja koji je grupisan zajedno sa sojevima Bartha i Shope. Ipak, najveći broj brazilskih sojeva virusa Aujeckijeve bolesti pripada klasteru B navedenog virusa i da se po svojim molekularnim karakteristikama razlikuje od sojeva navedenog virusa poreklom iz drugih zemalja.

Hahn i sar., 2010. su tokom svojih ispitivanja koristili metodu PCR i direktnog sekvenciranja u cilju molekularne karakterizacije i filogenetske analize sojeva virusa Aujeckijeve bolesti identifikovanih kod divljih svinja na području SAD. Ovde treba napomenuti da autori navode da je infekcija domaćih svinja izazvana virusom Aujeckijeve bolesti iskorenjenja na teritoriji SAD. Sporadične pojave izbijanja infekcije se javljaju kao posledica prisustva virusa kod divljih svinja koji su izvori infekcije. Metodom direktnog sekvenciranja uz korišćenje prajmera za gD, gE i gC gene virusa Aujeckijeve bolesti i filogenetske analize je ustanovljeno da se sojevi virusa identifikovani kod divljih svinja uglavnom razlikuju od sojeva virusa poreklom od domaćih svinja. Međutim, ipak je potvrđeno da nekoliko sojeva virusa izolovanih kod divljih svinja u južnim državama SAD imaju slične ili identične nukleotidne sekvence kakve imaju i sojevi virusa poreklom od domaćih svinja. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja autori su

zaključili da prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti kod divljih svinja predstavlja rizik od infekcije domaćih svinja navedenim virusom na teritoriji SAD.

Serena i sar., 2011. su vršili upoređivanje nukleotidnih sekvenci sojeva virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih kod svinja na području Argentine sa referentnim sojevima navedenog virusa i sojevima virusa čije su odgovarajuće nukleotidne sekvence objavljene u genskoj bazi podataka. Za preliminarno grupisanje sojeva virusa Aujeckijeve bolesti primenom filogenetske analize je korišćena nukleotidna sekvenca dela gena koji kodira glikoprotein E virusa Aujeckijeve bolesti. Preciznije grupisanje izolovanih sojeva virusa u genotipove je izvršeno primenom metode direktnog sekvenciranja tokom koje je određivan redosled dela gena koji kodira sintezu glikoproteina C. Dobijeni rezultati su potvrdili da sojevi virusa Aujeckijeve bolesti izolovani kod svinja na teritoriji Argentine pripadaju genotipu I navedenog virusa. Za ovaj genotip je tokom ispitivanja ustanovljeno da je dominantno prisutan na teritoriji Argentine. Sojevi virusa Aujeckijeve bolesti koji su pripadali genotipu I na filogenetskom stablu su grupisani zajedno sa američkim i brazilskim sojevima navedenog virusa, koji su takođe pripadali genotipu I. Pored ovoga, dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili i to da sojevi Yamagat S-81 i Mer su grupisani zajedno i pripadaju genotipu II.

Steinrigl i sar., 2012. su tokom ispitivanja primenom metode direktnog sekvenciranja uz korišćenje prajmera za glikoprotein C izvršili molekularnu karakterizaciju sojeva virusa Aujeckijeve bolesti poreklom od divljih svinja i lovačkih pasa. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da sojevi virusa Aujeckijeve bolesti izolovani iz uzoraka divljih svinja pripadaju dvema genetski različitim varijantama navedenog virusa. Pored ovoga tokom ispitivanja je utvrđeno da obe genetske varijante virusa Aujeckijeve bolesti mogu da inficiraju lovačke pse koji dođu u kontakt sa obolelim divljim svinjama. Svi izolovani sojevi virusa Aujeckijeve bolesti poreklom od divljih svinja i lovačkih pasa su pripadali Kladi A, linijama 1 i 2.

Perez i sar., 2012. su uspostavili protokol za izvođenje metode multiple SYBR Green I-based real-time PCR za identifikaciju svinjskog cirkovirusa tip 2, svinjskog parvovirusa, virusa Aujeckijeve bolesti i Torgteno virusa 1 i 2. Ukupno je primenom prethodno navedene metode ispitano 40 uzoraka slezine poreklom od životinja sa kliničkim simptomima poremećaja opšteg zdravstvenog stanja. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je primenom prethodno navedene metode izvršena pojedinačna identifikacija svih navedenih vrsta virusa u ispitivanim

uzorcima kao i to da se ova metoda može sa uspehom koristiti za sprovođenje odgovarajućih epidemioloških studija koje bi se zasnivale na utvrđivanju prisustva ovih pet virusa kod životinja na određenoj teritoriji.

Da Silva Paes i sar., 2013 su utvrđivali prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Aujeckijeve bolesti u uzorcima divljih svinja poreklom iz oblasti Pantanal u Brazilu. Ispitivanja su vršena primenom metode ELISA i serum neutralizacije (SN test). Od ukupno 218 uzoraka prikupljenih krvnog seruma svinja, prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Aujeckijeve bolesti je ustanovljeno primenom metode ELISA kod 88 ispitanih uzoraka, dok je primenom SN testa njihovo prisustvo ustanovljeno kod 57 uzoraka. Primenom metode PCR uz korišćenje prajmera za glikoprotein B prisustvo nukleinske kiseline virusa Aujeckijeve bolesti je ustanovljeno kod 5 od ukupno 104 uzorka. Primenom metode PCR uz korišćenje prajmera za glikoprotein E prisustvo virusa je ustanovljeno kod 12 ispitanih uzoraka. Genotipizacija identifikovanih virusa, odnosno određivanje pripadnosti određenom genotipu virusa Aujeckijeve bolesti je izvršena metodom direktnog sekvenciranja. U ovim ispitivanjima je izvršeno određivanje redosleda nukleotida dela UL56 gena i njegovo poređenje sa sekvencama nukleotida navedenog glikoproteina drugih sojeva virusa koji su objavljeni u okviru genske baze podataka. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja je ustanovljeno da identifikovani virusi pripadaju genotipu I. Izrada filogenetskog stabla je izvršena posle izvođenja metode sekvenciranja dela gena za glikoprotein C. Uvidom u filogenetsko stablo je utvrđeno da sojevi poreklom od divljih svinja nisu grupisani zajedno sa sojevima virusa poreklom od domaćih svinja. Rezultati su takođe pokazali da su sojevi virusa Aujeckijeve bolesti poreklom od divljih svinja sa teritorije Brazila grupisani zajedno sa virusima identifikovanim kod divljih svinja na teritorijama Nemačke, Austrije, Slovačke i Mađarske i da pripadaju genotipu I virusa.

Pol i sar., 2013. su vršili ispitivanja u cilju validacije dijagnostičkog sredstva ADIAVET PRV REALTIME kit za dijagnostiku virusa Aujeckijeve bolesti u ispitivanim uzorcima. Analitička specifičnost i osetljivost je upoređivana sa rezultatima ispitivanja istih uzoraka primenom metode izolacije virusa u ćelijskim linijama koja je zlatni standard u dijagnostici infekcije svinja izazvane virusom Aujeckijeve bolesti. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se navedeno dijagnostičko sredstvo može uspešno koristiti u dijagnostici infekcije svinja izazavane prethodno navedenim virusom.

Wernike i sar., 2014. su razvili protokol za izvođenje metode multiplex real-time PCR koji su koristili za razlikovanje terenskih od vakcinalnih sojeva virusa Aujeckijeve bolesti koji u svom genomu ne sadrže gene za sintezu glikoproteina E. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je navedena metoda visoko specifična i osjetljiva i da se može koristiti za brzu i pouzdanu detekciju terenskih sojeva virusa Aujeckijeve bolesti u uzorcima svinja, odnosno da se može upotrebiti za uspješno razlikovanje terenskih od vakcinalnih sojeva navedenog virusa.

Verpoest i sar., 2014 navode da virus Aujeckijeve bolesti ili pseudorabies virus izaziva značajne ekonomske štete u svinjarskoj proizvodnji. U nekoliko zemalja Evropske Unije, uključujući i Belgiju, infekcija navedenim virusom je uspješno iskorenjena kod domaćih svinja. Prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti u populaciji divljih svinja predstavlja značajan rizik za širenje infekcije u populaciji domaćih svinja. Iz navedenih razloga je neophodno proceniti međusobnu srodnost sojeva virusa Aujeckijeve bolesti koji su utvrđeni u populaciji divljih svinja. U ovim ispitivanjima izvršena je molekularna karakterizacija devet arhiviranih sojeva virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih na teritoriji Belgije pre 1990. Godine, od kojih je osam poreklom od domaćih svinja i jedan poreklom od goveda, kao i pet sojeva navedenog virusa utvrđenih kod divljih svinja na teritorijama Belgije i Luksemburga u periodu od 2006.godine do 2011.godine. Molekularna karakterizacija navedenih sojeva je izvršena primenom RFLP analize i filogenetske analize. Primenom metode RFLP utvrđeno je da su sojevi virusa Aujeckijeve bolesti izolovani iz uzoraka divljih svinja grupisani u genotip I navedenog virusa. Ispitivanja navedenom metodom su pokazala da je kod sojeva virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih kod domaćih svinja došlo do genetskog šifta iz genotipa I u genotip II i to verovatno 80-tih godina 20.veka. Metoda direktnog sekvenciranja po Sanger-u je izvođena uz korišćenje prajmera za glikoprotein C spoljašnjeg omotača virusa Aujeckijeve bolesti. Filogenetskom analizom svi sojevi virusa izolovani kod divljih svinja su svrstani u kladu A i kladu B, dok su svi sojevi virusa Aujeckijeve bolesti izolovani kod domaćih svinja svrstani u kladu A. Na zajedničkom filogenetskom stablu sojeva virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih kod domaćih i divljih svinja može se uočiti da postoje sojevi virusa koji imaju identične nukleotidne sekvence, a prisutni su i kod divljih i kod domaćih svinja. Imajući ovo u vidu, autori smatraju da postoji opravdan rizik od ponovne pojave infekcije izazvane sojevima virusa Aujeckijeve bolesti u populaciji domaćih svinja koja bi bila izazvana sojevima virusa prisutnim u populaciji divljih svinja.

Wang i sar., 2014. su primenom više metoda među kojima i metode PCR, ispitivali efikasnost soja rPRVTJ – delgE virusa Aujeckijeve bolesti u pogledu njegove bezbednosti i imunogenosti posle aplikacije ogleđnim prasadima. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da ogleđna prasad inokulisana navedenim sojem virusa nisu ispoljavala kliničke simptome herpesvirusne infekcije posle izvođenja veštačke infekcije sa virulentnim sojem PRVTJ virusa Aujeckijeve bolesti. Ovo se nije desilo u slučaju vakcinacije ogleđne prasadi vakcinom koja je sadržavala Bartha –K61 soj virusa i zatim njihove veštačke infekcije virulentnim sojem PRVTJ virusa Aujeckijeve bolesti. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da soj rPRVTJ – delgE virusa Aujeckijeve bolesti može predstavljati dobru alternativu soju Bartha – K61 u pripremi vakcina protiv infekcije svinja izazvane virusom Aujeckijeve bolesti.

Sozzi i sar., 2015 su sproveli ispitivanja koristeći uzorke poreklom od pasa sumnjivih na infekciju izazvanu virusom Aujeckijeve bolesti i divljih svinja. Navedeni uzorci su prikupljeni u periodu od 2010. godine do 2014.godine. Ispitivanja su vršena primenom metoda PCR, izolacije virusa u ćelijskoj liniji i metodom sekvenciranja. Metodom sekvenciranja je vršeno određivanje redosleda dela gena koji kodira sintezu glikoproteina C spoljašnjeg omotača virusa Aujeckijeve bolesti. Izrada filogenetskog stabla je vršena primenom kompjuterskog softvera MEGA 5.0. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je u Kladu 1 svrstano osam sojeva virusa Aujeckijeve bolesti poreklom od pasa i jedan soj poreklom od divlje svinje. Ovi sojevi su imali visok stepen sličnosti sa sojem ITA561 virusa Aujeckijeve bolesti ranije izolovanim kod divljih svinja na području Italije. Kladu 2 čini dva soja virusa poreklom od farmskih pasa i jedan soj virusa poreklom iz uzoraka psa koji nije korišćen za lov. Ovi sojevi virusa imaju visok stepen sličnosti sa sojevima virusa Aujeckijeve bolesti koji su izolovani u period od 2008. do 2011.godine u terenskim uslovima od farmskih pasa i svinja. Ova grupa sojeva virusa je imala visok stepen sličnosti sa sojem S66 izolovanim u Švedskoj i sojem IB341/86 poreklom od životinja iz Brazila. Klada 3 je obuhvatala dva soja virusa Aujeckijeve bolesti koja su izolovana tokom 90. tih godina prošlog veka iz uzoraka poreklom od farmskih pasa. Ovi sojevi virusa imali su visokim stepen sličnosti sa sojevima virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih kod svinja na teritoriji Evrope I Amerike tokom poslednjih 20 godina.

Shi i sar., 2016 su tokom istraživanja razvili metodu multiplex real-time PCR za otkrivanje prisustva nukleinske kiseline više vrsta virusa među kojima i svinjskog cirkovirusa 2,

svinjskog parvovirusa i virusa Aujeckijeve bolesti. Ukupno je ispitano 226 uzoraka kliničkog materijala poreklom od svinja. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se navedena metode može sa uspehom koristiti za laboratorijsku dijagnostiku više vrsta virusa kao i to da se može primeniti u cilju sprovođenja epidemioloških studija koje bi podrazumevale utvrđivanje prisustva pojedinih vrsta virusa kod životinja na određenoj teritoriji.

Sun i sar., 2016. navode da virus Aujeckijeve bolesti izaziva značajne ekonomske gubitke u proizvodnji svinja na području Kine. Infekcija svinja izazvana virusom Aujeckijeve bolesti je bila endemična kod svinja u različitim provincijama u Kini kao posledica nesprovođenja adekvatnog programa vakcinacije životinja i izostanka primene odgovarajućih biosigurnosnih mera na farmama svinja. Situacija sa pojavom infekcije se pogoršala posle 2011.godine i pojave širenja infekcije u zaptima vakcinisanih svinja izazvane virulentnim sojem virusa. Ovaj soj virusa je postao prevalentan u mnogim regionima Kine. Autori zaključuju da kontrola širenja infekcije svinje izazvane virusom Aujeckijeve bolesti u zaptima svinja i njeno iskorenjavanje predstavljaju glavni izazov za veterinarsku službu u mnogim delovima Kine.

Sun i sar., 2016. navode da infekcija svinja izazvana virusom Aujeckijeve bolesti izaziva značajne ekonomske gubitke u svinjarskoj proizvodnji. Infekcija svinja izazvana navedenim virusom je iskorenjena kod domaćih svinja u nekim zemljama. Međutim, infekcija izazvana navedenim virusom i dalje predstavlja ozbiljan rizik po zdravlje životinja, posebno na teritorijama sa velikom gustom populacije svinja na određenoj površini, kao što je na primer Kina. Razlog tome je primena neadekvatnih programa vakcinacije, odnosno nepotpune i neadekvatne primene odgovarajućih biosigurnosnih mera. Autori su zaključili da je dosledna primena odgovarajućih programa eradikacije infekcije postala posebno značajna posle 2011.godine i pojave visoko patogenog soja virusa Aujeckijeve bolesti koji je imao visoku prevalenciju kod vakcinisanih svinja u mnogim regionima Kine.

2.2. Parvovirus svinja

Choi i sar., 1987. su ispitivali stepen patogenosti soja Kresse parvovirusa svinja i upoređivali ga sa stepenom patogenosti soja NADL-8 navedenog virusa. U te svrhe vršena je veštačka infekcija fetusa gravidnih krmača sa jednim ili drugim sojem svinjskog parvovirusa. Oba izolata su visoko patogena za životinje u periodu druge trećine graviditeta. Za realizaciju ispitivanja korišćene su metode hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije, odnosno indirektna imunofluorescencije koje su primenjivane u cilju utvrđivanja prisustva virusa u tkivima fetusa. Prisustvo HA antigena virusa je ustanovljeno u jetri fetusa veštački inficiranog sojem NADL-8, dok je u svim ostalim tkivima fetusa veštački inficiranih sojem Kresse ustanovljeno prisustvo antigena navedenog soja. Metodom imunofluorescencije je utvrđeno prisustvo virusnih antigena fetusa inficiranih sojem Kresse. Prisustvo antigena soja NADL-8 svinjskog parvovirusa u mozgu veštački inficiranih fetusa nije ustanovljeno primenom metode imunofluorescencije. Posle 21 dan od veštačke infekcije prisustvo antigena NADL-8 soja virusa nije ustanovljeno u tkivima fetusa, izuzev tkiva bubrega. Prisustvo soja Kresse je u istom periodu bilo ustanovljeno u svim tkivima, uključujući mozak.

Westernbrink i sar., 1989. su razvili metodu ELISA u cilju otkrivanja prisustva specifičnih antitela protiv svinjskog parvovirusa u uzorcima krvnog seruma svinja. Pored metode ELISA u ispitivanjima je korišćen i test inhibicije hemaglutinacije. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili podjednaku osetljivost obe navedene metode. Međutim, autori daju prednost korišćenju metode ELISA kao metode koja se može bolje standardizovati i koja je jednostavnija za izvođenje.

Molitor i sar., 1991. su razvili protokol za izvođenje metode PCR uz korišćenje prajmera za VP2 gen navedenog virusa. U ovim ispitivanjima su korišćena četiri soja svinjskog parvovirusa i to sojevi NADL-8, NADL-2, KBSH i Kresse. Pored njih u ispitivanjima su korišćeni i soj psećeg parvovirusa kao i soj virusa Aujeckijeve bolesti. Sva četiri soja svinjskog parvovirusa su identifikovana metodom PCR uz korišćenje prajmera za VP2 gen navedenog virusa. Sojevi parvovirusa pasa i virusa Aujeckijeve bolesti nisu identifikovani navedenom metodom. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da se navedeni protokol za izvođenje metode PCR može koristiti za brzu i pouzdanu dijagnostiku svinjskog parvovirusa u ispitujućim uzorcima.

Jenkins, 1992. je razvio metodu ELISA u cilju otkrivanja prisustva antigena svinjskog parvovirusa u uzorcima fetalnog tkiva. Isti uzorci su bili ispitivani i primenom metoda imunofluorescencije i testa hemaglutinacije. Od ukupno 490 ispitanih uzoraka, 29 uzoraka je bilo pozitivno posle pojedinačnog ispitivanja sa sve tri prethodno navedene metode, dok je 458 bilo negativno. Ukupno je 32 uzorka bilo pozitivno posle ispitivanja sa jednom od tri korišćene metode. Primenom metoda ELISA i testa hemaglutinacije tokom pojedinačnog ispitivanja 31 uzorka utvrđeno je 100% poklapanje dobijenih rezultata. Jedan uzorak je bio pozitivan posle ispitivanja primenom metode imunofluorescencije, dok je isti uzorak bio negativan posle pojedinačnog ispitivanja primenom metoda ELISA i testa hemaglutinacije. Dva uzorka su bila pozitivna posle pojedinačnog ispitivanja primenom testa hemaglutinacije i metode ELISA. Isti uzorci su bili negativni na prisustvo antigena svinjskog parvovirusa posle ispitivanja primenom metode imunofluorescencije. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je metoda ELISA osetljivija, specifičnija i brža za izvođenje od testa hemaglutinacije i metode imunofluorescencije.

Soares i sar., 1999. su u cilju sprovođenja istraživanja ispitivali uzorke supernatantne tečnosti poreklom od ćelija inficiranih sojem NADL-2 svinjskog parvovirusa i uzorke organa svinja i pobačenih fetusa na prisustvo navedenog virusa. U ispitivanjima su korišćene metode PCR, nested-PCR, izolacije virusa u kulturi ćelija kao i testovi hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije. Od ukupno 24 uzorka, 9 uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo svinjskog parvovirusa primenom metode izolacije virusa u kulturi ćelija, dok je 18 uzoraka bilo pozitivno posle ispitivanja primenom metoda PCR i nested-PCR. U svim uzorcima u kojima je ustanovljeno prisustvo virusa primenom metode izolacije u kulturi ćelija je utvrđeno i prisustvo virusne nukleinske kiseline primenom metode PCR. Pet uzoraka koji su bili negativni posle ispitivanja primenom metode PCR je bilo pozitivno posle ispitivanja primenom metode nested PCR. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se molekularne metode PCR i nested PCR mogu uspešno koristiti za brzu i pouzdanu identifikaciju prisustva svinjskog parvovirusa u ispitivanim uzorcima.

Mengeling i sar., 2000. navode da su parvovirus svinja i virus reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja najznačajniji uzročnici reproduktivnih poremećaja kod ovih životinja. Svinjski parvovirus izaziva pojavu abortusa kod krmača, odnosno pojavu mumifikacije

fetusa. Pored ovoga, navedeni virus izaziva ranu embrionalnu smrt. Autori dalje navode da tokom akutne faze infekcije krmače i nazimice imaju najčešće slabo izražene kliničke simptome bolesti. U cilju sprečavanja pojave infekcija svinja prethodno navedenim virusima autori preporučuju sprovođenje mera aktivne veštačke imunizacije životinja kao i primenu određenih laboratorijskih metoda za brzu i preciznu dijagnostiku ovih virusnih infekcija kod svinja.

Huang i sar., 2004. su ispitali 58 uzoraka limfnih čvorova, pluća, tonzila i slezine prikupljenih od 24 praseta starosti od 4 do 8 nedelja. Pored ovih uzoraka, izvršeno je i ispitivanje uzoraka pobačenih fetusa. Svi navedeni uzorci su ispitani na prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti (PrV), svinjskog parvovirusa (PPV) i svinjskih cirkovirusa. Referentni soj PRV TNL virusa Aujeckijeve bolesti i drugi referentni sojevi virusa PCV2, PCV1 i PPV su umnožavani u ćelijskoj liniji PK-15. Molekularne metode pojedinačna PCR i multiplex PCR su izvođene uz korišćenje prajmera za glikoproteine G i E (virus Aujeckijeve bolesti), NS-1 gen svinjskog parvovirusa, ORF1 gen svinjskog cirkovirusa 1 i ORF2 svinjskog cirkovirusa 2. Prisustvo infekcije izazvane virusom PCV2 je ustanovljeno kod 51,7% uzoraka, a virusom PCV1 kod 3,4% uzoraka. Infekcija izazvana virusom Aujeckijeve bolesti je utvrđena kod 1,7% uzoraka. Mešovita infekcija izazvana virusima PCV1/PCV2 je ustanovljena kod 13,8% uzoraka, odnosno virusima PCV2/virus Aujeckijeve bolesti kod 10,3% uzoraka. Mešovita infekcija izazvana virusima PCV2/PPV je utvrđena kod 5,1% uzoraka. Osmam uzoraka je bilo negativno. U uzorcima poreklom od svih pet pobačenih fetusa ustanovljena je mešovita infekcija izazvana virusima PPV/PCV2 (tri uzorka slezine), odnosno virusima PCV2/virus Aujeckijeve bolesti (dva uzorka). Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost korišćenja metode multiplex PCR za brzu i pouzdanu dijagnostiku infekcija svinja izazvanih prethodno navedenim virusima.

Wilhelm i sar., 2006. su uspostavili protokol za izvođenje metode real-time PCR koji je vršeno otkrivanje prisustva svinjskog parvovirusa u ispitivanim uzorcima. Tokom realizacije istraživanja ispitani su uzorci organa abortiranih i mumificiranih fetusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je metoda SYBR Green za izvođenje real-time PCR visoko specifična i osetljiva u otkrivanju prisustva nukleinske kiseline svinjskog parvovirusa u ispitivanim uzorcima. Primenom ovog protokola za izvođenje metode real-time PCR nije moglo biti detektovao prisustvo nukleinskih kisleina parvovirusa izolovanih kod drugih vrsta životinja.

Chen i sar., 2009. su primenom metode PCR ispitali uzorke organa 80 fetusa poreklom iz nekoliko pokrajina u Kini. Uporedo sa navedenom metodom, uzorci su ispitan i primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR). Primenom metode PCR prisustvo virusne nukleinske kiseline je ustanovljeno kod 48 uzoraka od ukupno 80 uzoraka. Isti uzorci svinja su bili pozitivni na prisustvo svinjskog parvovirusa i primenom metode real-time PCR. Dvanaest od ukupno 32 uzorka koja se bila negativna tokom ispitivanja primenom metode PCR, su bila pozitivna posle ispitivanja primenom metode real-time PCR. Primenom metode real-time PCR broj pozitivnih uzoraka u kojima je ustanovljeno prisustvo nukleinske kiseline svinjskog parvovirusa je povećan za oko 15%. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja potvrđeno je da se metoda real-time PCR može uspešno koristiti za brzu i pouzdanu detekciju prisustva nukleinske kiseline svinjskog parvovirusa u ispitivanim uzorcima.

Shangjina i sar., 2009. su sprovedi ispitivanja koja su imala za cilj bliže upoznavanje sa evolucijom i filogenijom svinjskog parvovirusa. U navedene svrhe vršena je molekularna analiza NS1 i VP1/VP2 gena sojeva BQ i ZJ navedenog virusa izolovanih u Kini. Nukleotidne sekvence NS1 i VP1/VP2 gena navedenih sojeva virusa su upoređivane sa analognim sekvencama sojeva svinjskog parvovirusa koje su dostupne u banci gena i izvršena je filogenetska analiza. Na ovaj način je određen položaj kineskih sojeva virusa na filogenetskom stablu u odnosu na druge sojeve, odnosno stepen srodnosti BQ i ZJ sojeva virusa sa drugim sojevima svinjskog parvovirusa prisutnih kod životinja u različitim krajevima sveta.

Chang i sar., 2010. su koristili multiplex real-time PCR metodu u cilju otkrivanja prisustva i kvantifikacije svinjskog cirkovirusa 2. Pored ovoga, navedena metoda je tokom ispitivanja korišćena i za brzu diferencijaciju, odnosno razlikovanje svinjskog cirkovirusa 2 od svinjskog cirkovirusa 1. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se navedena metoda može koristiti za brzu i pouzdanu detekciju svinjskog cirkovirusa 2 u ispitivanim uzorcima i za razlikovanje virusa PCV2 od virusa PCV1.

Jiang i sar., 2010. su ispitali ukupno 76 uzoraka organa poreklom od 49 prasadi starosti od 4 do 12 nedelja sa respiratornim i reproduktivnim kliničkim simptomima, kao i uzorke poreklom od 27 abortiranih fetusa. Svi uzorci su bili prikupljeni u periodu od 2006. do 2007.godine na području provincije Zhejiang u Kini. Ispitivanje uzoraka je vršeno primenom metode multiplex PCR uz korišćenje odgovarajućih parova prajmera. Primenom metode

multiplex PCR prisustvo samo virusa PCV2 je utvrđeno kod 31 ispitanog uzorka, virusa klasične kuge svinja kod 14 uzoraka, virusa respiratornog i reproduktivnog sindroma svinja kod 21 uzorka i svinjskog parvovirusa kod 5 uzoraka. Primenom metode PCR sa protokolima za pojedinačnu identifikaciju virusa dobijeni su identični rezultati, izuzev toga što je prisustvo nukleinske kiseline virusa PRRS ustanovljeno kod 22 uzorka. Mešovita infekcija izazvana izazvana PCV2/PPV virusima je ustanovljena kod dva uzorka, virusima PCV2/PRRS kod 14 uzoraka, virusima PCV2/klasične kuge svinja kod 5 uzoraka, virusima PRRS/klasične kuge svinja kod dva uzorka i virusima PCV2/PRRS/klasične kuge svinja kod tri uzorka. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se metoda multiplex PCR može uspešno koristiti za brzu i pouzdanu dijagnostiku virusa i da se može koristiti i za izvođenje ispitivanja većeg broja uzoraka svinja koja bi bila sprovedena u svrhu određenih epidemioloških studija

Cadar i sar., 2012. su vršili ispitivanja uzoraka limfnih čvorova, pluća, slezine, jetre, bubrega i tonzila divljih svinja koji su prikupljeni tokom sezona lova u periodu od 2006.godine do 2011. godine. Uzorci organa bili su poreklom od ukupno 842 divlje svinje poreklom iz 315 lovišta. Istovremeno su vršena ispitivanja uzoraka organa poreklom od ukupno 120 životinja sa 10 različitih farmi domaćih svinja. Ova ispitivanja su vršena u cilju uporedne molekularne karakterizacije identifikovanih sojeva svinjskog parvovirusa kod domaćih i divljih svinja. Ove farme svinja su se nalazile na istim epidemiološkim područjima sa kojih su prikupljeni uzorci divljih svinja za ispitivanja. Sve domaće svinje su bile vakcinisane protiv infekcije izazvane svinjskim parvovirusom. Uzorci poreklom od domaćih i divljih svinja su ispitivani primenom metode PCR uz korišćenje odgovarajućih prajmera za VP1 i VP2 gene virusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je od ukupno 842 ispitanog uzorka poreklom od divljih svinja, 44 bilo pozitivno na prisustvo nukleinske kiseline svinjskog parvovirusa, dok je 1 uzorak poreklom od domaćih svinja bio pozitivan na prisustvo navedenog virusa. Filogenetska analiza je pokazala da se sojevi parvovirusa svinja poreklom od domaćih i divljih životinja mogu grupisati u šest grupa na osnovu kompletne sekvence VP1/VP2 gena i u osam grupa na odnosu parcijalne VP1/VP2 sekvence. Rezultati filogenetske analize su pokazali da su sojevi parvovirusa svinja kod divljih životinja delimično genetski različiti u odnosu na sojeve navedenog virusa ustanovljene kod domaćih svinja. Sojevi parvovirusa poreklom od domaćih svinja su na osnovu parcijalne VP1/VP2 sekvence nukleotida svrstani u klaster H, dok su sojevi virusa poreklom od divljih

svinja svrstani u klastere A, B, C, D i E. Pored svega navedenog, dobijeni rezultati su potvrdili da parvovirus svinja ima kratku evolucionu istoriju koja je započela pre 120 godina i da su se glavne promene u genomu virusa koje su omogućile značajan diverzitet između sojeva virusa kod domaćih i divljih svinja odigrale pre oko 20 do 60 godina.

Csagola i sar., 2012. su ispitali ukupno 392 uzoka različitih vrsta tkiva poreklom od svinja iz više regiona Mađarske. Uzorci su ispitani primenom metoda PCR i direktnog sekvenciranja. Izrada filogenetskog stabla je vršena primenom kompjuterskog softvera MEGA 5.0. Prisustvo svinjskog cirkovirusa 2 je utvrđeno kod 18% ispitanih uzoraka, svinjskog parvovirusa 1 kod 0,5% uzoraka, svinjskog parvovirusa 2 kod 6,4% uzoraka, svinjskog parvovirusa 3 kod 9,7% uzoraka i svinjskog parvovirusa 4 kod 6,4% uzoraka.

Ren i sar., 2013. su potvrdili da su sojevi svinjskog parvovirusa imali zajedničkog pretka pre oko 250 godina. Tri glavne grupe virusa I, II i III su identifikovane izradom filogenetskog stabla. Prva grupa sojeva virusa se odvojila pre 153 godine i nju su svrstani 4 evropska soja, 4 američka soja i 9 azijskih sojeva navedenog virusa. Druga grupa sojeva vodi poreklo od pre 157 godina i u nju su svrstani 1 kineski soj i 13 evropskih sojeva. Treća grupa sojeva virusa vodi poreklo od pre 114 godina.

Zheng i sar., 2013. su tokom realizacije istraživanja ispitali 126 uzoraka svinja na prisustvo svinjskog parvovirusa i svinjskog cirkovirusa tip 2 primenom metoda duplex real-time PCR i PCR. Primenom metode real-time PCR 70 uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo nukleinske kiseline svinjskog parvovirusa, dok je 77 uzoraka bilo pozitivno na prisustvo virusa PCV2. Primenom metode PCR 60 uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo svinjskog parvovirusa dok je 68 uzoraka bilo pozitivno na prisustvo virusa PCV2. Podudaranje rezultata ispitivanja za oba virusa primenom ove dve molekularne metode je iznosilo 98,4%. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se obe metode mogu sa uspehom koristiti u dijagnostici cirkovirusnih i parvovirusnih infekcija kod svinja.

Xiao i sar., 2013. navode da je svinjski parvovirus označen kao svinjski parvovirus 2 je u najpre identifikovan na teritoriji Mjanmara 2001.godine, Kine 2006. i 2007.godine i Mađarske 2012.godine. U cilju ispitivanja prisustva navedenog virusa na teritoriji SAD korišćena je metoda real-time PCR. Ukupno je navedenom metodom ispitano 483 uzorka pluća i 183 uzorka fecesa, odnosno 122 uzorka krvnog seruma koji su prikupljeni sa 295 farme u 18 država SAD. Prisustvo

svinjskog parvovirusa 2 je ustanovljeno kod 100 uzoraka pluća i 14 uzoraka fecesa poreklom od životinja različitih starosnih kategorija. Metodom direktnog sekvenciranja ustanovljeno je da su nukleotidne sekvence američkih sojeva svinjskog parvovirusa 2 imale visok stepen sličnosti (95.4-97.7%) sa kineskim sojevima virusa, odnosno 94.7% sličnosti sa sojevima navedenog virusa utvrđenih kod svinja na teritoriji Mjanmara.

Xu i sar., 2013. su ispitivali virulentni soj NE/09 svinjskog parvovirusa je izolovan iz uzoraka poreklom od mumifikovanog fetusa svinje sa farme koja se nalazila u provinciji Jilin, Kina. Autori su tokom ispitivanja izvršili molekularnu analizu navedenog soja virusa i to nukleotidne sekvence VP2 gena. Analiza nukleotidne sekvence VP2 gena soja NE/09 svinjskog parvovirusa i pokazala je sličnost sa analognim nukleotidnim sekvencama drugih sojeva navedenog virusa. Na osnovu rezultata filogenetske analize sekvence VP2 gena je ustanovljeno da je soj NE/09 novi soj svinjskog parvovirusa preovlađujuće prisutan na teritoriji Kine.

Gava i sar., 2015. su ispitivali ukupno 272 uzorka krvnog seruma, semena, pluća, fecesa, jajnika, uterusa primenom metoda TaqMan real-time PCR i PCR. Primenom prve navedene metode prisustvo svinjskog parvovirusa 4 je utvrđeno kod 36 uzoraka. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je metoda real-time PCR osetljivija u odnosu na metodu PCR kojom je prisustvo prethodno navedenog virusa utvrđeno kod 15 ispitanih uzoraka. Na osnovu rezultata ispitivanja je potvrđeno da se metoda real-time PCR može koristiti u brzom i pouzdanoj dijagnostici svinjskog parvovirusa 4.

Shia i sar., 2016 su primenili metodu multiplex real-time PCR za otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina više vrsta virusa – virus Aujeckijeve bolesti, svinjski cirkovirus 2, svinjski parvovirus i druge. Ukupno je ispitano 226 uzoraka. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se uspostavljeni protokol za izvođenje prethodno navedene metode može koristiti za preciznu identifikaciju više vrsta virusa među kojima i svinjskog parvovirusa čija je nukleinska kiselina detektovana kod 24 ispitana uzorka tonzila svinja.

2.3. Svinjski cirkovirus tip 2

Larochelle i sar., 1999. su u ovim ispitivanjima razvili protokol za izvođenje metode PCR u cilju otkrivanja prisustva virusa PCV1 i virusa PCV2 u ispitivanim uzorcima. Od ukupno 42 ispitana uzorka prikupljena od svinja sa PMWS sindromom na teritoriji Kvebeka u Knadi, primenom prethodno navedene metode prisustvo virusa PCV2 je ustanovljeno kod 40 uzoraka, jedan je bio pozitivan na prisustvo nukleinske kiseline virusa PCV1, dok je u jednom uzorku utvrđeno prisustvo oba navedena virusa. Prisustvo virusa PCV2 je ustanovljeno u uzorcima svinja sa kliničkim simptomima PMWS, ali i u uzorcima poreklom od svinja sa kliničkim simptomima koji se ne mogu jasno povezati sa navedenim sindromom kod svinja. Prisustvo virusa PCV1 je ustanovljeno u uzorcima klinički zdravih svinja. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se metoda PCR može uspešno koristiti u brzom i preciznom dijagnostici infekcije svinja izazvane virusom PCV2.

Kim i sar., 2001. su uspostavili protokol za izvođenje metode multiplex nested PCR u cilju otkrivanja prisustva nukleinskih kiselina virusa PCV1 i virusa PCV2 u uzorcima semena nersatova. Od ukupno ispitanih 60 uzoraka semena, 18 je bilo pozitivno na prisustvo virusa PCV primenom metode multiplex PCR, dok je 30 uzoraka bilo pozitivno na prisustvo virusa PCV primenom metode multiplex nested PCR. Od ukupno 30 uzoraka semena pozitivnih na prisustvo virusa PCV primenom metode multiplex nested PCR dva su bila pozitivna na prisustvo virusa PCV1, osam na prisustvo virusa PCV2, dok 20 bilo pozitivno na prisustvo oba navedena virusa. Isti uzorci semena su ispitani na prisustvo oba cirkovirusa svinja i primenom metode izolacije virusa u ćelijskoj liniji. Navedenom metodom je prisustvo virusa ustanovljeno u samo četiri inokulisane ćelijske linije i to primenom metoda in situ hibridizacije i metode multiplex PCR. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali zadovoljavajuću osetljivost i specifičnost metode multiplex nested PCR i da se ista može koristiti u za brzu i pouzdanu detekciju cirkovirusa svinja u ispitivanim uzorcima.

Elis i sar., 2004. navode da je na osnovu dosadašnjih rezultata ispitivanja više drugih istraživača objavljenih u literaturi utvrđeno da mešovita infekcija svinja izazvana svinjskim cirkovirusom tip 2 i parvovirusom svinja može izazvati mnogo teže kliničke simptome multisistemskog sindroma kržljanja prasadi posle zalučenja u odnosu na one utvrđene kod svinja kod kojih je navedeni sindrom izazvan samo delovanjem svinjskog cirkovirus tip 2. Pored ovoga,

danas se smatra da virus PCV2 ima ključnu ulogu u razvoju u razvoju PRDC sindroma takođe. Pomene na jetri izazvane infekcijom svinja virusom PCV2 mogu biti znatno intenzivnije u slučajevima mešovite infekcije sa virusom hepatitisa E svinja i virusom Aujeckijeve bolesti. Isto se odnosi i na intenzitet promena na plućima koje su jasnije izražene u slučajevima mešovite infekcije svinja izazvane virusima PCV2, PRRS i virusom influence svinja.

Maldonado i sar., 2005. su tokom realizacije istraživanja ispitali 293 uzorka organa abortiranih fetusa i prevremeno rođene prasadi na prisustvo virusa PRRS, Aujeckijeve bolesti, PPV i PCV2 primenom metoda RT-PCR i PCR. Prisustvo virusa PRRS je ustanovljeno kod 9 uzoraka, odnosno virusa PCV2 kod jednog uzorka. Prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti i virusa PPV nije utvrđeno ni u jednom ispitivanom uzorku. Dobijeni rezultati su potvrdili da virusi Aujeckijeve bolesti, PPV i PCV2 ne izazivaju u značajnoj meri reproduktivne poremećaje kod svinja u odnosu na virus PRRS.

Yu i sar., 2005. su u ovim ispitivanjima primenom PCR metode uz korišćenje prajmera za ORF2 region genoma virusa utvrđivali prisustvo virusa PCV2 u ispitivanim uzorcima svinja. U ovim ispitivanjima su korišćeni uzorci organa i uzorci inokulisanih ćelijskih linija izolovanim sojevima virusa PCV2. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost korišćenja navedene metode u dijagnostici infekcije svinja izazvane navedenim virusom. Protokol za izvođenje navedene metode je takođe bio specifičan, odnosno omogućavao je detekciju samo nukleinske kiseline virusa PCV2.

Quintana i sar., 2006. su u ovim ispitivanjima koristili metodu PCR u otkrivanju prisustva virusa PCV1 i PCV2 u sadržaju 18 komercijalnih vakcina. Ovde treba napomenuti da komponente vakcine mogu sadržati PCR pojačivače ili inhibitore. Trinaest vakcina je tokom ispitivanja kontaminisano sa virusom PCV2. Dobijeni rezultati ispitivanja primenom metode PCR su pokazali da je prisustvo virusa PCV1 utvrđeno kod dva uzorka vakcine od ukupno 18 ispitanih. Kod jedanaest od ukupno 13 vakcina naknadno kontaminisanih virusom PCV2 je utvrđeno prisustvo navedenog virusa. Razlog toga što u preostale dve vakcine nije identifikovano prisustvo virusa PCV2 je verovatno bio negativan uticaj komponenata vakcine na preživljavanje navedenog virusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se metoda PCR može koristiti u cilju provere kvaliteta vakcina koje se koriste za aktivnu imunizaciju svinja.

Caprioli i sar., 2006. su vršili ispitivanja u cilju otkrivanja prisustva virusa PCV2 u uzorcima krvi, fecesa i tonzila prikupljenih od 12 svinja pojedinačno veštački inficiranih virulentnim sojem navedenog virusa primenom metode PCR uz korišćenje prajmera za ORF2 region genoma virusa. Rezultati ispitivanja dobijeni primenom navedene metode su upoređivani sa rezultatima ispitivanja primenom imunofluorescencije i patohistoloških ispitivanja uzoraka jetre, pluća, bubrega, slezine i ileuma. Prisustvo nukleinske kiseline virusa PCV2 je ustanovljeno u uzorcima krvi svih 12 životinja. Kod 11 od ukupno 12 životinja prisustvo virusa je utvrđeno u uzorcima fecesa i tonzila. Prisustvo navedenog virusa je u uzorcima tkiva ustanovljeno kod 4 životinje sa kliničkim simptomima PMWS. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da se metoda PCR može koristiti u brzom i pouzdanoj dijagnostici virusa PCV2 u uzorcima krvi, fecesa i tonzila poreklom od živih inficiranih svinja.

Jun i sar., 2007. su tokom realizacije istraživanja izvršili ispitivanje arhiviranih uzoraka svinja obolelih od PMWS i PDNS sindroma na teritoriji Južne Koreje u periodu od 1999. do 2006. godine. Ekstrakcija DNK virusa PCV2 je izvršena po standardnoj proceduri propisanoj od strane proizvođača dijagnostičkog kita za ekstrakciju virusne DNK. Dobijena DNK virusa PCV2 je korišćena za izvođenje metode direktnog sekvenciranja i filogenetsku analizu. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da su sojevi virusa PCV2 identifikovani na teritorijama Holandija, Tajlanda, Velike Britanije svrstani u grupu 1 virusa. Nasuprot tome, sojevi navedenog virusa identifikovani na teritorijama Japana, Kande, Tajvana i Južne Afrike svrstani su u grupu 2. U obe grupe su svrstani sojevi virusa poreklom iz Koreje, Francuske, Mađarske, Austrije, Nemačke, Brazila i SAD.

Pal i sar., 2008. su razvili protokol za izvođenje metode duplex real-time quantitative PCR (qPCR) namenjen za otkrivanje prisustva virusa PCV2 u uzorcima semena. Ispitivanja su vršena korišćenjem uzoraka semena poreklom od 12 nerastova veštački inficiranih virusom PCV2 i 10 nerastova prirodno inficiranih navedenim virusom. Tri uzorka semena nerastova su služila kao kontrola u ispitivanjima. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je metoda duplex real-time quantitative PCR osetljivija i specifičnija u odnosu na metodu nested PCR u otkrivanju prisustva nukleinske kiseline virusa PCV2 u uzorcima semena nerastova.

Ogawa i sar., 2009. su primenom metoda multiplex PCR i multiplex RT-PCR ispitivali uzorke organa svinja na prisustvo nekoliko virusa između ostalih virusa PCV2, PPV i virusa

Aujeckijeve bolesti. Ukupno je ispitano 75 uzoraka primenom metode multiplex PCR uz korišćenje odgovarajućih prajmera prisustvo virusa PCV2 (ORF1 prajmeri) je ustanovljeno kod 32 uzorka i svinjskog parvovirusa (VP2 prajmeri) kod 9 uzoraka. U uzorcima abortiranih fetusa prisustvo virusa PCV2 je ustanovljeno kod 9 uzoraka. Prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti nije ustanovljeno ni u jednom uzorku poreklom od svinja. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da se multiplex PCR može uspešno koristiti za dijagnostiku infekcija svinja izazvanih virusima PCV2, PPV i Aujeckijeve bolesti.

McIntosh i sar., 2009. su koristili metodu SYBR green real-time PCR u cilju brze i precizne dijagnostike svinjskog cirkovirusa tip 2 u ispitivanim uzorcima. Za izvođenje metode su korišćeni prajmeri za ORF1 region genoma virusa. Primenom navedene metode ispitan je veći broj različitih uzoraka poreklom od svinja sa kliničkim simptomima infekcije izazvane virusom PCV2 (pluća, feces, serum, limfatično tkivo, bubrezi). Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da se usotavljeni protokol za izvođenje metode real-time PCR može koristiti u dijagnostici cirkovirusne infekcije svinja.

Park i sar., 2009. su primenom metode PCR utvrđivali prisustvo virusa PCV2 u uzorcima mleka krmača, odnosno da li se navedeni virus iz organizma inficiranih životinja može izlučivati putem mleka. U ovim ispitivanjima je šest gravidnih krmača je pojedinačno intranazalno veštački inficirano virulentnim sojem svinjskog cirkovirusa 2 tri nedelje pre prašenja. Dve krmače nisu bile inficirane i služile su kao kontrola u ispitivanjima. Sve ogledne životinje su tokom celog perioda ispitivanja bile kliničke zdrave. Uzorci mleka krmača su bili prikupljeni prvog, drugog i trećeg dana laktacije. Primenom metode PCR prisustvo virusa PCV2 je ustanovljeno u uzorcima mleka prvog dana laktacije. Primenom navedene metode i metode in situ hibridizacije prisustvo navedenog virusa je utvrđeno i u uzorcima mlečne žlezde i drugih tkivaveštački inficiranih životinja (jetra, limfni čvorovi, tonzile, slezina). Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je prisustvo virusa PCV2 otkriveno u uzorcima mleka i da virus ne mora biti neophodno prisutan samo u ćelijama već i van njih.

Shen i sar., 2010. su izvršili prikupljanje uzoraka krvnog seruma svinja iz 5 komercijalnih zapata kao i uzorci kolostralnog seruma. Takođe, vršeno je prikupljanje uzoraka krvi prasadi pre početka sisanja. Prikupljeni uzorci su ispitani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa PCV2 kao i na prisustvo virusne DNK. Svi uzorci kolostralnog seruma krmača i 96.8% uzoraka

krvnog seruma krmača su bili pozitivni na prisustvo navedenih antitela. Prisustvo virusne DNK je ustanovljeno kod 47.2% uzoraka krvnog seruma krmača, odnosno kod 40.8% uzoraka kolostruma istih životinja. Prisustvo antitela protiv virusa PCV2 je ustanovljeno kod 21.4% uzoraka seruma prasadi pre početka sisanja, a virusne DNK kod 39.9% uzoraka seruma istih životinja. Kod 69.5% uzoraka seruma krmača, 84.3% uzoraka kolostruma krmača i 74.4% uzoraka seruma prasadi je utvrđen PCV2b genotip virusa PCV2. Kod 18.6% uzoraka seruma krmača, 9.8% uzoraka kolostruma krmača i 15.6% uzoraka seruma prasadi ustanovljeno je prisustvo PCV2a genotipa virusa. Mešovita infekcija izazvana sa oba genotipa virusa je ustanovljena kod 11.9% uzoraka seruma krmača, 5.9% uzoraka kolostruma i 10% uzoraka seruma prasadi. Dobijeni rezultati ispitivanja predstavljaju značajan prilog poznavanju karakteristika infekcije izazvane virusom PCV2 u komercijalnim zaptima svinja.

Chang i sar., 2010. su koristili metodu multiplex real-time PCR u cilju brze diferencijacije svinjskog cirkovirusa tip 2 od svinjskog cirkovirusa 1 u ispitivanim uzorcima. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost korišćenja navedene metode u brzjoj i preciznoj dijagnostici infekcije svinja izazvane virusom PCV2.

Perez i sar.,2010. su ispitali šest sekvenci virusa PCV2 identifikovanih u tkivima svinja sa kliničkim simptomima infekcija respiratornog sistema i znacima gubitka telesne težine. Uzorci su bili poreklom od svinja iz šest različitih zapata iz četiri različita geografska područja na teritoriji Kube. Metodom direktnog sekvenciranja je ustanovljen visok stepen sličnosti između nukleotidnih sekvenci svih šest sojeva virusa PCV2 koji se kretao od 99.15% do 100%. Filogenetskom analizom je potvrđeno da pet identifikovanih sojeva virusa PCV2 ima vrlo visok stepen sličnosti sa sojevima navedenog virusa identifikovanih na teritoriji Kanade, dok je jedan kubanski soj virusa imao visok stepen sličnosti sa sojevima virusa poreklom iz Danske, Austrije, Holandije, Francuske, Brazila i Rumunije. Međutim, ovde treba napomenuti da je svih šest sojeva virusa pripadalo istom genotipu 1 virusa (klaster 1A). Ova ispitivanja predstavljaju prva takva izvršena na teritoriji Kube u okviru kojih je izvršena molekularna karakterizacija identifikovanih sojeva virusa PCV2.

Henriques i sar., 2011. su izvršili molekularnu karakterizaciju 22 od ukupno 79 virusa PCV2 identifikovanih u uzorcima poreklom od domaćih svinja u periodu od 2003.godine do 2010. godine na teritoriji Portugala. Tokom ispitivanja primenom metode direktnog

sekvenciranja celi genomi 22 soja virusa PCV2 su sekvencirani. Između nukleotidnih sekvenci ispitanih sojeva virusa ustanovljen je visok stepen sličnosti koji se kretao od 94% do 99%. Najveći broj sojeva virusa je pripadao genotipu PCV2b, dok je šest sojeva pripadalo genotipu PCV2a. Ova ispitivanja su izvršena kroz analizu cap i rep gena virusa PCV2. Dobijeni rezultati su pokazali i da je filogenetska analiza nukleotidne sekvence cap gena pouzdana alternativa filogenetskoj analizi celog genoma navedenog virusa.

Patterson i sar., 2011. su sproveli ispitivanja koja su imala za cilj utvrđivanje izlučivanja virusa PCV2 u nosnom sekretu, pljuvački i fecesu svinja posle izvođenja veštačke infekcije navedenim virusom. Navedeni uzorci svinja su prikupljeni posle 69 dana od infekcije od pet veštački inficiranih svinja. Ispitivanje uzoraka je izvršeno primenom metoda PCR, imunohistohemije kao i histopatološki. Prisustvo navedenog virusa je ustanovljeno kod svih uzoraka poreklom od svinja. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da se virus PCV2 u podjednako koncentraciji izlučuje u nosnom sekretu, pljuvački i fecesu inficiranih svinja.

Vlaskova i sar., 2011. su tokom realizacije istraživanja ispitali ukupno 120 uzoraka poreklom od svinja, starosti između 6 i 24 nedelje poreklom sa 28 farmi iz šest od osam geografskih područja Slovačke u period od 2005.godine do 2009.godine. Svinje od kojih je vršeno prikupljanje uzoraka su ispoljavale kliničke simptome respiratorne i infekcije digestivnog sistema. Tokom ispitivanja identifikovano je prisustvo virusa PCV2 kod ukupno 77 ispitanih uzoraka. Metodom direktnog sekvenciranja je izvršeno sekvenciranje celog ORF2 gena tri odabrana soja virusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da tri identifikovana soja virusa PCV2 poreklom od svinja sa teritorije Slovačke pripadaju genotipovima PCV2a (jedan soj) i PCV2b (dva soja virusa). Pored ovoga, dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da su izolati virusa PCV2 genetički stabilni i slični sa sojevima virusa poreklom iz Centralne i Zapadne Evrope.

Rose i sar., 2012. su u ovom radu posebnu pažnju posvetili epidemiologiji i načinu prenošenja svinjskog cirkovirusa 2 u zapatima svinja. Oni navode da je pomenuti virus široko prisutan u zapatima svinja širom sveta. Sojevi virusa PCV2 su podeljeni u nekoliko genotipova. Na osnovu dosadašnjih literaturnih podataka autori navode da postoje dokazi o genetskim šiftovim pojedinih sojeva virusa iz genotipa PCV2a u genotip PCV2b koji izaziva teže kliničke simptome bolesti. Pored ovoga, autori navode da se virus PCV2 veoma brzo širi u inficiranim

zapatima kako vertikalnim tako i horizontalnim putem i da se u nekim zapatima svinja može zadržati godinama uzimajući u obzir tehnološke karakteristike proizvodnje svinja koje se odnose na, na primer, izmeštanje svinja iz jednog dela farme u drugi (porodilište, bukarište, prasilište..).

Segales, 2012. opisuje osnovne karakteristike infekcije svinja izazvane virusom PCV2. Autor navodi da je subklinička infekcija najčešći oblik infekcije svinja pomenutim virusom. Pored ovog oblika infekcije, autor navodi nekoliko oblika klinički manifestne infekcije izazvane virusom PCV2 i to:

- Najčešće opisani vid kliničke manifestne infekcije svinja izazvane svinjskim cirkovirusom tip 2 je poznat pod nazivom multisistemski sindrom kržljivosti prasadi posle zalučenja PMWS (postweaning multisystemic wasting sindrom, eng.). Oboljenje se još naziva cirkoviroza svinja, PCV2 sistemska infekcija, odnosno svinjsko cirkovirusno oboljenje (PCVAD). Ovaj vid oboljenja se manifestuje pojavom gubitaka u telesnoj težini inficiranih životinja i bledilom kože sa mogućom pojavom crvenih jasno ograničenih promena koje kasnije konfluiraju. Obolela prasada su mršava (kržljivost prasadi), dolazi do pojave povraćanja, proliva i dispneje. Limfni čvorovi obolelih životinja, posebno supkutani limfni čvorovi, su uvećani samo u ranoj fazi bolesti. Od ovog oblika infekcije najčešće oboljevaju prasada posle zalučenja.

- Infekcija svinja izazvana svinjskim cirkovirusom tipa 2 dovodi do reproduktivnih poremećaja kod životinja koji se manifestuju rađanjem slabo vitalne prasadi, mumifikacijom plodova i abortusom. Abortusi se najčešće javljaju u kasnoj fazi gestacije. Novorođena prasada su nedovoljne telesne mase i slabo sisaju. Ovaj vid klinički manifestne pojave infekcije svinja izazvane virusom PCV2 se retko javlja u terenskim uslovima.

- Kod svinja kod kojih se posle infekcije izazvane svinjskim cirkovirusom tip 2 javlja pojava sindroma nefropatije i dermatitisa dolazi do pojave anoreksije, depresije, nevoljnog kretanja ili ukočenosti. Svinjski dermatitis i nefropatija sindrom (PDNS) se manifestuje pojavom tamno-crvenih papula i makula po koži uglavnom zadnjih ekstremiteta i u perinealnoj regiji. U početku su promene diseminovane, a kasnije sve više konfluiraju. Kod životinja koje su preživele akutnu formu bolesti na koži ostaju vidljivi ožiljci. Ovaj vid infekcije svinja izazvane virusom svinjskim cirkovirusom tip 2 se javlja pretežno kod prasadi, ređe kod nazimadi i priplodnih kategorija svinja. Akutno inficirane svinje uginu u roku od nekoliko dana posle pojave kliničkih simptoma bolesti. Životinje koje prebole infekciju, oporavljaju se za sedam do

deset dana. Kod obolelih životinja limfni čvorovi ingvinalne regije su povećani. Promene se javljaju i na bubrezima. Na njima se može zapaziti edem bubrežne karlice i petehijalna krvavljenja na korteksu. Patoanatomskim pregledom je utvrđena pojava promena na slezini u vidu infarkta slezine.

- Oboljenje pluća i creva se kod svinja manifestuje pojavom respiratornih poremećaja, odnosno dijarejom. U ovom radu autor posebno ističe potrebu pravovremene dijagnostike infekcije svinja izazvane virusom PCV2 i posebno ističe značaj molekularnih metoda u dijagnostici navedene infekcije svinja.

Liu i sar., 2013. su ispitali 58 uzoraka organa svinja i 24 uzorka organa abortiranih fetusa poreklom sa 20 farmi u provinciji Fujian, Kina na prisustvo virusa PRRS, klasične kuge svinja i svinjskog cirkovirusa tip 2 primenom metoda PCR, RT-PCR i multiplex PCR. Mešovita infekcija izazvana virusima PRRS I klasične kuge svinja je ustanovljena kod 12,19% uzoraka, virusima PRRS i PCV2 kod 21,95% uzoraka, klasične kuge svinja i PCV2 kod 13,41% uzoraka i sa sva tri virusa kod 3,66% ispitanih uzoraka. Dobijeni rezultati ispitivanja primenom metoda PCR, RT-PCR i multiplex PCR su se podudarali, izuzev kod jednog uzorka koji je bio pozitivan na prisustvo RT-PCR, a negativan posle ispitivanja primenom metode multiplex PCR. Pored ovoga, dobijeni rezultati su potvrdili opravdanost korišćenja navedenih molekularnih metoda u dijagnostici virusnih infekcija svinja izazvanih navedenim virusima.

Dias i sar., 2013. su primenom seroloških metoda (testa imunoperoksidaze i testa inhibicije hemaglutinacije) vršili utvrđivanje prisustva specifičnih antitela protiv virusa PCV2 i parvovirusa svinja u uzorcima krvnog seruma krmača i njihove prasadi kao i uloge antitela u zaštiti od infekcije životinja navedenim virusom. Uzorci krvnog seruma krmača, zatim uzorci tkiva abortiranih fetusa i tkiva seropozitivne i vitalne prasadi su ispitivani na prisustvo virusa PCV2 primenom metode PCR. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je infekcija krmača virusom PCV2 i parvovirusom svinja izazivala pojavu reproduktivnih poremećaja kod gravidnih životinja i da je potrebno sprovesti dodatna ispitivanja koja bi se odnosila na ulogu humoralne imunološke reakcije organizma kod infekcije izazvane navedenim virusima.

Yin i sar., 2013. su potvrdili da je stopa mutacija u genomu virusa respiratornog i reproduktivnog sindroma svinja značajno veća u slučajevima mešovite infekcije životinja

izazvane sa virusom respiratornog i reproduktivnog sindroma svinja i svinjskim cirkovirusom tip 2.

Ramos i sar., 2013. su tokom ovih ispitivanja koristili uzorke poreklom od tri praseta koja su bila iz dva zapata svinja na teritoriji Urugvaja. Dva praseta ispoljavala su kliničke simptome cirkovirusne infekcije, dok kod trećeg praseta nisu ustanovljeni klinički simptomi bolesti. Molekularna karakterizacija identifikovanih sojeva virusa je izvršena na osnovu cap (ORF2) i rep gena (ORF1). Molekularna analiza nukleotidne sekvence cap gena je pokazala visok stepen sličnosti između sojeva virusa PCV2 poreklom iz Urugvaja koji je iznosio 99.7%. Nukleotidne sekvence urugvajskih izolata virusa PCV2 su takođe pokazale visok stepen sličnosti sa dva soja navedenog virusa poreklom iz Brazila koji je iznosio od 99.8% do 100%. Takođe, urugvajski izolati virusa su imali visok stepen sličnosti i sa argentinskim izolatima virusa koji se kretao od 99.1% do 99.5%. Argentinski sojevi virusa su imali visok stepen sličnosti sa sojevima virusa PCV2 poreklom iz Francuske, Kube, Kanade i SAD. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da sva tri soja virusa PCV2 pripadaju genotipu PCV2b virusa i da je ovaj genotip virusa dominantno prisutan na teritoriji Urugvaja i Južne Amerike. Urugvajski izolati virusa imali su niži stepen sličnosti sa sojevima virusa koji pripadaju genotipovima PCV2c i PCV2d virusa PCV2.

Wang i sar., 2013. su primenom metoda PCR i direktnog sekvenciranja analizirali redosled nukleotida kompletnog genoma 571 izolata virusa PCV2 poreklom od svinja sa teritorije Tajvana. Ova ispitivanja su vršena tokom 2011. i 2012. godine. Tokom ispitivanja autori su ustanovili da su sojevi virusa izolovani kod svinja na Tajvanu podeljeni u dva genotipa PCV2a (22,9% sojeva je pripadalo ovom genotipu) i PCV2b (77,1% sojeva je pripadalo ovom genotipu). U okviru ovih genotipova virusa PCV2 formirano je šest klastera. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je genotip PCV2b postao dominantan u zapatima svinja na Tajvanu počev od 2003.godine i da je danas široko rasprostranjen u zapatima ovih životinja.

Wei i sar., 2013. su tokom realizacije istraživanja ukupno ispitali 66 sojeva virusa PCV2 identifikovanih kod svinja na teritoriji Kine. Uzorci u kojima je izvršena identifikacija virusa prikupljeni su od svinja tokom 2011. i 2012.godine sa 14 komercijalnih farmi svinja u provinciji Guandong, južna Kina. Dobijeni rezultati sekvenciranja celog ORF2 gena virusa PCV2 su pokazali da 66 sojeva virusa pripada genotipovima PCV2a (pet sojeva) i PCV2b (61 soj),

ukazujući na to da je genotip PCV2b dominantan na teritoriji Južne Kine. Imajući ovo u vidu može se zaključiti da su dobijeni rezultati dali značajan doprinos upoznavanju epidemiološke situacije vezane za prisustvo virusa PCV2 kod svinja na području Južne Kine.

Opriessing i sar., 2014. su tokom realizacije istraživanja ukupno ispitali 586 uzoraka krvnog seruma i 164 uzoraka homogenizata pluća koji su prikupljeni od svinja u periodu od 1996. godine do 2013. godine na teritoriji SAD i Kanade. Navedeni uzorci su bili ispitani na prisustvo svinjskog parvovirusa i cirkovirusa svinja tipa 2 primenom metoda PCR i direktnog sekvenciranja. Prisustvo svinjskog cirkovirusa 2 je utvrđeno kod 162 uzorka, a svinjskog parvovirusa kod 286 uzoraka od ukupno ispitanih uzoraka seruma. Prisustvo svinjskog cirkovirusa tip 2 je ustanovljeno kod 129 uzoraka pluća, a svinjskog parvovirusa kod 93 uzorka. Mešovita infekcija izazvana svinjskim cirkovirusom tip 2 i svinjskim parvovirusom je utvrđena kod 84 uzorka seruma i 81 uzorka pluća. Prisustvo navedenih virusa je bilo učestalije u uzorcima poreklom od obolelih životinja u odnosu na subklinički inficirane životinje. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je prisustvo svinjskog cirkovirusa 2 i svinjskog parvovirusa rasprostranjeno kod životinja na teritoriji severne Amerike.

Reine i sar., 2015. su ispitali 2156 uzoraka poreklom od svinja iz 315 zapata na teritoriji Nemačke primenom metoda PCR i direktnog sekvenciranja na prisustvo svinjskog cirkovirusa tip 2. Između ostalih, rezultata, primenom navedenih metoda je potvrđeno da su na teritoriji Nemačke dominantno prisutni genotipovi PCV2a i PCV2b svinjskog cirkovirusa tip 2.

Eddicks i sar., 2015. su primenom molekularnih metoda tokom 2013. i 2014. godine kod svinja na teritoriji Nemačke ustanovili prisustvo mutant soja PCV2b-1C virusa PCV2. Navedeni soj virusa je identifikovan na sedam farmi svinja prethodno vakcinisanih protiv infekcije izazvane virusom PCV2. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je nukleotidna sekvenca identifikovanog mutant soj virusa PCV2 utvrđena kod svinja na pet farmi bila identična analognoj sekvenci soja BDH PCV2b-1C virusa. Nukleotidna sekvenca ORF2 regiona genoma mutant soj virusa PCV2 identifikovana kod svinja sa preostale dve farme je imala od 99% do 99,1% sličnosti sa sojem BDH PCV2b-1C virusa.

Semadaala i sar., 2015. su opisali osnovne biološke karakteristike virusa PCV2 kao i infekcije svinja izazvane navedenim virusom. Autori naglašavaju da je infekcija svinja izazvana virusom PCV2 raširena u zapatima svinja u svetu i da nanosi značajne ekonomske štete u

proizvodnji svinja. Pored ovoga, autori navode da su limfadenopatija i naglo mršavljenje tipični klinički simptomi PMWS. Danas se u mnogim zemljama u zapaštima svinja sprovode mere vakcinacije životinja, a i dostupne su odgovarajuće dijagnostičke procedure koje se koriste za otkrivanje prisustva virusa u ispitivanim uzorcima. Autori naglašavaju da je genotip PCV2b dominantno prisutan u zapaštima svinja širom sveta, odnosno da je zamenio nekada najviše prisutni genotip PCV2a.

Franzo i sar., 2015. su ispitali 96 uzoraka organa i krvnog seruma svinja pozitivnih tokom ranijih ispitivanja na prisustvo virusa PCV2 koja su trajala od 2007.godine do 2014.godine. Uzorci su bili poreklom od svinja sa 39 farmi iz 11 italijanskih provincija. Posle ekstrakcije virusne DNK iz arhiviranih uzoraka, za dalja ispitivanja uzoraka su korišćene metode PCR i direktnog sekvenciranja. Na osnovu filogenetske analize sekvence ORF2 gena virusa PCV2 ustanovljeno je da su na teritoriji Italije kod svinja prisutna tri genotipa navedenog virusa PCV2a, PCV2b i PCV2d. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili i da je genotip PCV2b najzastupljeniji kod svinja na teritoriji navedene države.

Davies i sar., 2016. navode da je na teritoriji SAD do sada otkriveno prisustvo dva genotipa virusa PCV2 i to PCV2a i PCV2b. U ovim ispitivanjima primenom metode direktnog sekvenciranja je obrađeno više od 1100 nukleotidnih sekvenci ORF2 regiona genoma svinjskog cirkovirusa 2 u cilju utvrđivanja eventualnog prisustva genetskih varijacija među njima. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili prisustvo novog genotipa virusa koji se razlikuje u nukleotidnoj sekvenci ORF2 regiona genoma navedenog virusa. Naime, ORF2 region genoma sojeva virusa koji pripadaju novootkrivenom genotipu virusa čini 238 aminokiselina u odnosu na do sada opisane sojeve kod kojih je navedeni region genoma virusa sačinjavalo 233 ili 234 aminokiseline. Takođe, dobijeni rezultati su potvrdili da je ovaj genotip virusa PCV2 nastao pre nekih drugih genotipova navedenog virusa.

Lukač i sar., 2016. su ispitali 40 uzoraka organa svinja poreklom sa teritorije Republike Srpske na prisustvo virusa PCV2 i parvovirusa svinja primenom metode PCR. Prisustvo virusa PCV2 je ustanovljeno kod četiri uzorka limfnih čvorova, dok je prisustvo parvovirusa svinja utvrđeno kod pet ispitivanih uzoraka limfnih čvorova. Za izvođenje metode PCR su korišćeni prajmeri za deo ORF1 regiona genoma virusa PCV2, odnosno za deo VP2 gena genoma parvovirusa svinja. Primenom metode direktnog sekvenciranja po Sanger-u utvrđeno je da su

parvovirusi svinja identifikovani kod svinja na teritoriji R. Srpske sa sojevima navedenog virusa izolovanih u Velikoj Britaniji, SAD i Kini. Identifikovani svinjski cirkovirusi 2 kod životinja na teritoriji R Srpske su pripadali genotipu PCV2c navedenog virusa.

3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA

Cilj ovih ispitivanja je bila molekularna detekcija i filogenetska analiza virusa Aujeckijeve bolesti, parvovirusa svinja i svinjskog cirkovirusa tip 2 kod svinja u Crnoj Gori radi utvrđivanja njihove pripadnosti određenim genotipovima (virus Aujeckijeve bolesti i svinjski cirkovirus tip 2), odnosno određenoj grupi/klasteru (parvovirus svinja). Da bi se realizovali postavljeni ciljevi ispitivanja, postavljeni su sledeći zadaci:

1. prikupljanje uzoraka (slezine, limfni čvorovi, tonzile, sakralne ganglije) od nevakcinisanih svinja različitih starosnih kategorija sa ili bez kliničkih simptoma bolesti gajenih u ekstenzivnim uslovima držanja na teritoriji Republike Crne Gore.

2. ispitivanje navedenih uzoraka primenom nekih klasičnih i molekularnih metode virusološke dijagnostike.

3. upoređivanje delova genoma virusa Aujeckijeve bolesti, svinjskog parvovirusa i svinjskog cirkovirusa tip 2 identifikovanih ili izolovanih kod svinja na teritoriji Crne Gore sa analognim sekvencama genoma referentnih i izolovanih sojeva prethodno navedenih virusa iz drugih delova sveta u cilju utvrđivanja sličnosti i razlika između njih.

4. filogenetska analiza virusa Aujeckijeve bolesti, parvovirusa svinja i svinjskog cirkovirusa tip 2 identifikovanih na teritoriji Republike Crne Gore.

4. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA

4.1. MATERIJAL

4.1.1. Uzorci organa

U cilju sprovođenja ispitivanja izvršeno je prikupljanje 80 zbirnih uzoraka organa (limfni čvorovi, slezina, tonzila) i isto toliko uzoraka sakralnih ganglija poreklom od nevakcinisanih svinja različitih starosnih kategorija sa ili bez kliničkih simptoma gajenih u ekstenzivnim načinu uzgoja na teritoriji Crne Gore. Pored ovoga, za ispitivanja su bili prikupljeni i uzorci organa dva pobačena fetusa. Uzorci za ispitivanja su, posle prikupljanja, potapani u hranljivu podlogu Eagle-MEM sa 2% fetalnog telećeg seruma, zamrzavani i čuvani na temperaturi od -20°C do početka ispitivanja.

4.1.2. Referentni sojevi virusa Aujeckijeve bolesti (SuHV-1), cirkovirusa svinja tip 2 (PCV2) i svinjskog parvovirusa (PPV)

Sojevi *Ercegovac* virusa Aujeckijeve bolesti (NIVS, Beograd, Srbija), *Teen* parvovirusa svinja (American Bioresearch, SAD) i 1010-Stoon virusa PCV2 (NIV Novi Sad, Novi Sad, Srbija) služili su kao pozitivna kontrola kod izvođenja metode PCR i izolacije virusa u ćelijskim linijama.

4.1.3. Ćelijske linije

Prikupljeni uzorci organa svinja u kojima je prethodno dokazano prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti, svinjskog parvovirusa i svinjskog cirkovirusa tip 2 primenom metode PCR su pojedinačno inokulisani u ćelijske linije PK-15 i SK-6 (IZSBS, Breša, Italija). Ova ispitivanja su vršena u cilju izolacije virusa Aujeckijeve bolesti i svinjskog parvovirusa, odnosno umnožavanja svinjskog cirkovirusa tip 2 u navedenim ćelijskim linijama.

4.1.4. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Ekstrakcija nukleinskih kiselina virusa Aujeckijeve bolesti, svinjskog parvovirusa i svinjskog cirkovirusa tip 2 iz ispitanih uzoraka organa svinja izvršena je korišćenjem Thermo

Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, SAD). Izvođenje lančane reakcije polimeraze (PCR) u cilju dokazivanja prisustva nukleinskih kiselina virusa Aujeckijeve bolesti, svinjskog parvovirusa i svinjskog cirkovirusa tip 2 je izvršeno uz korišćenje odgovarajućih prajmera za deo gena koji kodira sintezu glikoproteina B (gB) spoljašnjeg omotača virusa Aujeckijeve bolesti (forward 5-CCTCGTAGTACACGTACCCG-3 and reverse 5-CTGGTGCGAGCTGCAGAACAAG-3 (Metabion International, Nemačka), zatim prajmera za deo VP2 gena parvovirusa svinja (forward 5-CACAGAAGCAACAGCAATTAGG-3 i reverse 5-CTAGCTCTTGTGAAGATGTGG-3- Metabion International, Nemačka) i prajmera za deo ORF1 regiona genoma svinjskog cirkovirusa tip 2 (forward 5-CAGCAACATGCCAGCAAGAAGAAT-3 i reverse 5-TCG ATCACACAGTCTCAGTAG-3, Metabion International, Nemačka).

Za izvođenje PCR reakcije je pored prethodno navedenih prajmera korišćen Dream Taq PCR Master Mix (proizvođača Thermo Scientific, SAD).

4.1.5. Reagensi za izvođenje metode horizontalne gel elektroforeze

- SERVA DNA Standard pBR328 Mix, lyophilized – DNA Ladder koji se sastoji od 12 fragmenata od 154 Bp do 2176 Bp (154, 220, 234, 298, 394, 453, 517, 653, 1033, 1230, 1766 i 2176Bp.), proizvođača SERVA, GmbH, Heidelberg, Nemačka;
- SERVA DNA Standard pBR322 x Hae III lyophilized – DNA Ladder koji se sastoji od 22 fragmenta od 8 Bp do 587 Bp (8,11, 18, 21, 51, 57, 64, 80, 89, 104, 123, 124, 184, 192, 213, 234, 267, 434, 458, 502, 540 i 587 Bp), proizvođača SERVA, GmbH, Heidelberg, Nemačka;
- Agaroza (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka);
- pufer-1x Tris-acetat-EDTA (TAE); (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka);
- vodeni rastvor 10mg/ml etidijum bromida (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka).

4.1.6. SuHV-1, PPV i PCV2 direktno sekvenciranje

Određivanje redosleda nukleotida, odnosno nukleotidnih sekvenci dela gB gena genoma virusa Aujeckijeve bolesti, dela VP2 gena genoma parvovirusas svinja i dela ORF1 regiona genoma cirkovirusa svinja tip 2 korišćena je metoda završetka lanca po Sanger-u.

Za izvođenje metode direktnog sekvenciranja po Sanger-u je korišćeno dijagnostičko sredstvo QIA quick Purification Kit (proizvođača Qiagen, USA) namenjeno za prečišćavanje dobijenih PCR produkata, ABI Prism BigDye 3.1 sistem za sekvenciranje (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) i Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) uz primenu istih prajmera koji su korišćeni i za izvođenje PCR metoda. Sekvenciranje je urađeno po protokolu proizvođača uz određene modifikacije u odnosu na temperaturu vezivanja prajmera.

4.2. METODE

4.2.1. Priprema uzoraka za ispitivanja

Svi prikupljeni uzorci su najpre pripremani za izvođenje metode PCR i izolacije virusa u ćelijskoj liniji. Pre početka izvođenja navedenih metoda uzorci organa su najpre usitnjavani u udubljenjima mikrotitracionih ploča sa 12 bazenčića u koje je prethodno pojedinačno dodato po 1ml PBS. Posle usitnjavanja svi uzorci su pojedinačno prebacivani u mikrotube zapremine od 1,5ml. Sve mikrotube sa uzorcima su zatim pojedinačno centrifugovane tokom 10 minuta na 5000 o/min, posle čega se dobijeni talog koristio za izvođenje metode PCR, a supernatant za izvođenje metode izolacije virusa u kulturi ćelija i virus neutralizacije, odnosno testova hemaglutinacije (HA test) i inhibicije hemaglutinacije (HI test) za identifikaciju izolovanih sojeva parvovirusa svinja.

4.2.2. Ekstrakcija virusne DNK

Ekstrakcija virusne nukleinske kiseline iz prikupljenih uzoraka poreklom od svinja je izvršena korišćenjem dijagnostičkog sredstva za ekstrakciju virusne DNK Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, SAD). Ekstrakcija virusne nukleinske kiseline je izvršena prema uputstvu proizvođača i podrazumevala je sledeće:

1. Uzorci limfnih čvorova, slezine i sakralnih ganglija su pojedinačno dodati u mikrotube zapremine 1,5ml u koje je zatim sipano po 180µl rastvora Digestion solution. U sve ovako pripremljene mikrotube sa uzorcima je zatim pojedinačno dodato po 20µl rastvora Proteinasa K.

2. Ovako pripremljeni uzorci su posle mešanja inkubisani na temperature od 56°C do potpune razgradnje tkiva. Za vreme inkubisanja mikrotube sa uzorcima su povremeno protresane radi što bolje razgradnje tkiva.
3. U sve mikrotube sa uzorcima je zatim pojedinačno sipano 20µl rastvora Rnase. Uzorci su posle dodavanja navedenog rastvora inkubisani tokom vremenskog perioda od 10 minuta na sobnoj temperaturi.
4. Po završenoj inkubaciji, u sve mikrotube sa uzorcima je pojedinačno dodato po 200µl Lysis rastvora.
5. Posle protresanja mikrotuba sa uzorcima na vorteks aparatu, u sve je pojedinačno sipano po 400µl 50% rastvora etanola.
6. U ovoj fazi izvođenja ekstrakcije sadržaji mikrotuba su pojedinačno prebacivani u GeneJet Genomic Purification kolone (sastavni deo kita za ekstrakciju DNK).
7. Pomenute kolone sa uzorcima su zatim centrifugovane na 6000xg. Po završenom centrifugovanju, donji delovi kolona su odbacivani i zamenjeni novim.
8. U sve uzorke je zatim pojedinačno sipano po 500µl Wash Buffer I rastvora.
9. Ovako pripremljeni uzorci su zatim centrifugovani na 8000xg u trajanju od 1 minut.
10. Donji delovi kolona su zatim ponovo odbacivani i zamenjeni novim.
11. U sve uzorke je zatim pojedinačno dodato po 500µl Wash Buffer II rastvora.
12. Sve tube sa uzorcima su zatim pojedinačno centrifugovane na 12000xg u trajanju od 1 minut.
13. Donji delovi kolona su zatim ponovo odbacivani, a iste su stavljene u mikrotube zapremine od 1,5ml (nisu sastavni deo kita za ekstrakciju).
14. U mikrotube sa uzorcima je zatim pojedinačno dodato po 200µl rastvora Elution Buffer-a.
15. Ovako pripremljeni uzorci su zatim inkubisani tokom vremenskog perioda od 2 minuta na sobnoj temperaturi.
16. Po završenoj inkubaciji, uzorci su centrifugovani na 8000xg u trajanju od 1 minut.
17. Gornji deo kolona je odbačen, a mikrotube u kojima je izvršeno prikupljanje uzoraka DNK za izvođenje PCR su zamrznute na temperaturu od -20oC i čuvane do početka ispitivanja.

4.2.3. Priprema reakcione smeše za izvođenje PCR

Posle ekstrakcije molekula DNK iz ispitivanih uzoraka, pripremljena je reakciona smeša za izvođenje lančane reakcije polimeraze. Prethodno je izvršeno rastvaranje prajmera za deo gB gena virusa Aujeckijeve bolesti, deo VP2 gena parvovirusa svinja i deo ORF1 regiona genoma virusa PCV2. Pojedinačni sastav reakcionih smeše za izvođenje metoda PCR uz pojedinačno korišćenje prethodno pomenutih prajmera je bio sledeći: PCR Master Mix u količini od po 12,5µl, zatim forward prajmera u količini od po 1,5µl, reverse prajmera u količini od po 1,5µl, vode 4,5µl i ekstrahovane DNK u količini od po 5µl.

4.2.4. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

4.2.4.1. Virus Aujeckijeve bolesti

Protokol za izvođenje metode PCR u cilju otkirvanja prisustva nukleinske kiseline virusa Aujeckijeve bolesti je obuhvatio obuhvatao primarnu denaturaciju na temperaturi od 95°C tokom vremenskog perioda od 4 minuta, zatim 40 ciklusa denaturacije na temperaturi od 95°C tokom 30 sekundi, vezivanja prajmera na temperaturi od 58 °C za 30 sekundi i elongacije lanca na temperaturi od 72°C u vremenskom periodu od 1 minut. Reakcija se završavala finalnom elongacijom lanca koja je izvođena na temperaturi od 72°C tokom vremenskog perioda od 10 minuta.

4.2.4.2. Virus PPV

Protokol za izvođenje lančane reakcije polimeraze za otkrivanje prisustva nukleinske kiseline parvovirusa svinja je obuhvatao primarnu denaturaciju na temperaturi od 95°C tokom vremenskog perioda od 4 minuta, zatim 36 ciklusa denaturacije na temperaturi od 95°C tokom 30 sekundi, vezivanja prajmera na temperaturi od 55°C tokom 30 sekundi i elongacije lanca na temperature od 72°C u vremenskom periodu od 1 minut. Lančana reakcija polimeraze se završavala finalnom elongacijom lanca na temperature od 72°C tokom vremenskog perioda od 10 minuta.

4.2.4.3 Virus PCV2

Protokol za izvođenje lančane reakcije polimeraze za otkrivanje prisustva nukleinske kiseline virusa PCV2 u ispitivanim uzorcima je obuhvatao primarnu denaturaciju na temperaturi

od 95°C tokom vremenskog perioda od 4 minuta, zatim 35 ciklusa denaturacije na temperaturi od 95°C tokom 30 sekundi, vezivanja prajmera na temperaturi od 56°C za 30 sekundi i elongacije lanca na temperaturi od 72°C u vremenskom periodu od 1 minut. Reakcija se završavala finalnom elongacijom lanca koja je izvođena na temperaturi od 72°C tokom vremenskog perioda od 10 minuta.

4.2.5. Horizontalna gel elektroforeza

Za analizu dobijenih PCR produkata korišćena je horizontalna elektroforeza u agaroznom gelu. Primenom ove metode, umnoženi ciljni fragmenti molekula DNK virusa Aujeckijeve bolesti, svinjskog parvovirusa i svinjskog cikrovirusa tip 2 su identifikovani na osnovu veličine koja se izražava brojem baznih parova (bp). Veličina PCR produkta se određuje poredjenjem sa DNK standardom (engl. Ladder), koji sadrži smešu DNK fragmenata poznatih veličina. Za analizu PCR produkta korišćen je 1% rastvor agaroze u TAE puferu uz dodavanje etidijum bromida (1 μ l/100ml TAE pufera) koji se koristi za vizuelizaciju PCR produkta, jer se vezuje za molekul virusne DNK i fluorescira kada se posmatra pod UV svetlom. Uzorci za elektroforezu pripremani su tako što je 8 μ l svakog uzorka pomešano sa po 2 μ l 5x pufera za punjenje. Uz uzorke pripreman je i DNK Standard i to tako što je 5 μ l standarda pomešano sa 2 μ l 5x pufera za punjenje. Uzorci i DNK standard su zatim ubacivani u gel (tzv. punjenje gela), koji je prethodno postavljen u kadicu za elektroforezu sa TAE puferom. Elektroforeza je trajala od 60 do 90 minuta na 100V.

Po završenoj elektroforezi svaki gel je posmatran na transiluminatoru (UV svetlo) i analiziran na prisustvo, odnosno odsustvo amplifikovanih fragmenata gena molekula DNK koji kodiraju sintezu dela gB gena virusa Aujeckijeve bolesti, dela VP2 gena genoma svinjskog parvovirusa, odnosno dela ORF1 regiona genoma virusa cirkovirusa svinja tip 2. Veličina dobijenih fragmenata molekula DNK je upoređivana sa DNK standardom (smeša DNK fragmenata poznatih veličina) radi očitavanja rezultata reakcije. Veličina DNK produkata za virus SuHV-1 od 368bp, za virus PPV od 203bp i virus PCV2 od 703bp smatrani su pozitivnim nalazom.

4.2.6. Postupak sa ćelijskim linijama

Ćelijske linije PK-15 i SK-6 su održavane metodom tripsinizacije i subpasažama. Kao hranljiva podloga za rast, odnosno održavanje ćelija, korišćena je Eagle-MEM (SIGMA, SAD) sa dodatkom 10%, odnosno 2% fetalnog telećeg seruma (SIGMA, SAD). U hranljive podloge dodavano je 100 I.U./ml penicilina, 100 µg/ml streptomocina i fungizona u cilju sprečavanja bakterijske i gljivične kontaminacije ćelijskih linija. Dispergovanje ćelijskih linija vršeno je po standardnoj proceduri sa rastvorom tripsin–versena. Tripsinizirane ćelije su razlivane u mikrotitracione ploče sa ravnim dnom i inkubisane na 37°C u prisustvu 5% CO₂.

4.2.7. Izolacija virusa

Prikupljeni uzorci organa svinja, u kojima je metodom PCR otkriveno prisustvo nukleinskih kiselina virusa Aujeckijeve bolesti, svinjskog parvovirusa i svinjskog cirkovirusa tip 2 su pojedinačno inokulisani u ćelijske linije PK-15 i SK-6 koje su se nalazile u mikrotitracionim pločama sa 24 udubljenja. U sva udubljenja mikrotitracionih ploča sa ćelijskim linijama, pojedinačno je inokulisano po 100 µl uzoraka. Mikrotitracione ploče sa uzorcima su zatim inkubisane na temperature od 37°C u trajanju od 1 čas i okolini koja je bila zasićena sa 5% CO₂. Po isteku navedenog vremenskog perioda u sva inokulisana udubljenja mikrotitracionih ploča sa uzorcima, pojedinačno je dodato po 500 µl hranljive podloge Eagle-MEM sa 2% fetalnog telećeg seruma (PAA, Austrija). Ovako pripremljene mikrotitracione ploče sa uzorcima su zatim stavljene u termostat na temperature od 37°C i svakodnevno opservirane na pojavu citopatogenog efekta (CPE).

Identifikacija prisustva virusa Aujeckijeve bolesti u inokulisanim ćelijskim linijama vršena je primenom testa virus – neutralizacije (VN- test) uz korišćenje odgovarajućeg hiperimunog seruma titra od 1:16 (Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd). Otkrivanje prisustva svinjskog parvovirusa u inokulisanim ćelijskim linijama je bila vršena primenom testa inhibicije hemaglutinacije (HI test) i to posle četiri uzastopne pasaže uzoraka u ćelijskim linijama, odnosno primenom lančane reakcije polimeraze po prethodno opisanom protokolu. Prisustvo eventualno umnoženih svinjskih cirkovirusa tip 2 u inokulisanim ćelijskim linijama je vršeno primenom metode PCR po prethodno opisanom protokolu.

4.2.8. Testovi hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije za identifikaciju svinjskog parvovirusa iz ispitivanih uzoraka

U sva udubljenja mikrotitracionih ploča sa „U“ dnom, najpre je sipano po 25µl rastvarača PBS-a. U prva udubljenja mikrotitracionih ploča je zatim dodato po 25µl suspenzije ispitivanih uzoraka. Ove dve tečnosti su izmešane da bi zatim količina od 25µl tečnosti bila prenetu u sledeće udubljenje mikroploče i tako redom do 11. bazenčića iz koga je odbačeno 25µl tečnosti. U sva udubljenja je posle toga dodato po 25µl PBS-a, čime je postignuta količina od po 50µl tečnosti u svakom udubljenju. Time je virus razređen od 1:4 do 1:4096. Dva bazenčića mikrotitracionih ploča su služila kao kontrola virusa i kontrola eritrocita. U sve bazenčiće mikroploče je zatim dodato po 50µl 0,5% suspenzije eritrocita zamorca.

Test inhibicije hemaglutinacije je izvođen u cilju identifikacije izolovanih sojeva parvovirusa svinja. Za izvođenje ove reakcije neophodno je pripremiti razređenje antigena-virusa koje sadrži 4HJ (hemaglutinacione jedinice). U sve bazenčiće mikrotitracione ploče sipano je po 25µl PBS-a, posle čega je u prve bazenčiće mikroploče pojedinačno dodato po 25µl specifičnog imunog seruma protiv parvovirusa svinja, koji su prvo izmešani sa rastvaračem, a zatim se u količini od 25µl preneti kroz naredna udubljenja mikroploče sa PBS-om čime su dobijena razređenja seruma od početnog 1:2 do 1:512. U sva udubljenja su zatim dodati uzorci od po 25µl virusa koji sadrže po 4HJ/0,1ml. Poslednja tri bazenčića mikrotitracione ploče služila su kao kontrola virusa, eritrocita i seruma. Ovako pripremljene mikrotitracione ploče su inkubisane u vremenskom periodu od 30 minuta na sobnoj temperaturi posle čega je u sve bazenčiće mikrotitracione ploče sipano po 50µl 0,5% suspenzije eritrocita zamorca. Posle 45 minuta, inkubisanja uzoraka na sobnoj temperaturi, očitavani su rezultati.

4.2.9. Metoda PCV2 i PPV direktnog sekvenciranja

Primenom metode direktnog sekvenciranja vršeno je određivanje redosleda nukleotida dela gB gena virusa Aujeckijeve bolesti, zatim dela VP2 gena svinjskog parvovirusa i dela ORF1 regiona genoma svinjskog cirkovirusa tip 2.

Pre izvođenja metode direktnog sekvenciranja izvršeno je prečišćavanje dobijenog DNK produkta primenom kita za prečišćavanje – „QIA quick PCR Purification Kit“ proizvođača „Qiagen“, (USA) po uputstvu proizvođača.

Procedura prečišćavanja PCR produkata:

1. U tubicu sa PCR produktom dodato je 75 μ l PBI pufera i pažljivo promešano.
2. Napravljena smeša pažljivo je prebačena u MinElute kolonu sa tubicom za prikupljanje filtrata i centrifugirana na 14000 rpm, 1 minut na sobnoj temperaturi.
3. Nakon centrifugiranja, filtrat je odbačen, a u MinElute kolonu je sipano 750 μ l PE pufera i centrifugirano na 14000 rpm, 1 minut na sobnoj temperaturi.
4. Po završetku centrifugiranja, filtrat je odbačen, a MinElute kolona je centrifugovana na maksimalnoj brzini od 24000 rpm, 1 minut na sobnoj temperaturi.
5. Nakon toga, MinElute kolona je izvađena i prebačena u čistu tubicu od 1,5 ml.
6. Dodato je 10 μ l EB pufera direktno na membranu i inkubirano 1 minut na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirano 1 minut na 14000 rpm.

Dobijeni prečišćeni PCR produkti su odmah korišćeni za DNK sekvenciranje ili su zamrzavani na -20°C .

4.2.10. Cycle sequencing PCR

Za izvođenje cycle sequencing PCR reakcije, PCR mešavina je po jednom uzorku sadržavala sledeće: 2 μ l Dye Mix, 2 μ l Dye buffer, 1,2 μ l prajmera F forward, vode 1,8 μ l i 3 μ l prečišćenog PCR produkta. Istovremeno za svaki uzorak je pojedinačno pripremana ista PCR mešavina, s tim što je umesto „forward“ prajmera smeša sadržavala „reverzni“ prajmer.

Cycle sequencing PCR reakcija je izvođena po sledećem protokolu: 30 ciklusa denaturacije na 96°C u trajanju od 10 sec, vezivanja prajmera na 50°C tokom 5 sec i elongacije na 60°C u vremenskom periodu od 4 min.

Posle završetka izvođenja cycle sequencing PCR reakcije, dobijeni PCR proizvod je zatim naknadno prečišćavan korišćenjem 75% izopropanola na sledeći način:

1. U tube sa uzorcima je pojedinačno dodato po 80 μ l rastvora 75% izopropanola. Ovako pripremljeni uzorci su zatim inkubirani u vremenskom periodu od 15 minuta na sobnoj temperaturi.
2. Posle završene inkubacije, svi uzorci su centrifugirani na 2000 o/min u trajanju od 45 minuta.

3. Pripremljene tube sa uzorcima su zatim centrifugirane na 7000/min u trajanju od 2 minuta i potom osušene na sobnoj temperaturi.

Nakon prečišćivanja, u uzorke je dodavano po 10 µl Hi-Di TM formamida (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), a zatim je urađena denaturacija po sledećem protokolu: (1) 2 minuta na 95°C; (2) 2 minuta na 4°C. Po završenoj denaturaciji, uzorci su stavljeni u sekvencioner ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Za analizu dobijenih sekvenci korišćen je Sequence Analysis 5.1 softwer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), u kome su nukleotidne sekvence predstavljene u vidu elektroferograma.

Dobijene SuHV-1, PPV i PCV2 nukleotidne sekvence u vidu elektroferograma analizirane su u oba pravca, a zatim su primenom SeqScape software, v 2.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) upoređivane (engl. alignment) u 5' i 3' pravcu. Na taj način dobijena je kompletna (konsenzus) sekvenca, koja je u cilju identifikacije dalje analizirana.

Upotrebom BLAST programa (engl. Basic Local Alignment Search Tool), konsenzus sekvence su upoređene sa sekvencama odgovarajućih regiona SuHV-1, PPV i PCV2 genoma, dostupnim u GenBank bazi podataka, odnosno, NCBI (National Center for Biotechnology Information, Nacional Institutes) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) u cilju utvrđivanja sličnosti ili razlika između njih.

Molekularna i filogenetska analiza dobijenih nukleotidnih sekvenci izvršena je u programskom paketu MEGA verzija 6.0 (engl. Molecular Evolutionary Genetics Analysis). MEGA program je bionformatički alat koji pored programa za poravnanje sekvenci Clustal W, sadrži programe za konstruisanje filogenetskih stabala, pretragu baze podataka (PubMed, BLAST), procenu stope mutacija, testiranje evolutivnih hipoteza i određivanje genetičkih distanci.

Filogenetska analiza je izvršena na osnovu automatski kreiranog stabla pomoću NJ (engl. "Neighbor Joining"), ML (engl. "Maximum Likelihood") i MP (engl. "Maximum Parsimony") metoda. Za pouzdanost nodusa dendograma odnosno statističku podršku korišćena je metoda pseudoponavljjanja (bootstrap) na osnovu 1000 permutacija. Pored toga u konstrukciji dendograma izabrani su sledeći parametri: tip supstitucije (nukleotid); opcija kompletne delecije

nedostajućih podataka. Nedostajući podaci i prekidi sekvence (engl. gap) su eliminisani iz analize.

U filogenetskoj analizi su iz NCBI baze podataka korišćene sekvence referentnih sojeva, kao i sekvence izolata iz drugih geografskih područja (u zagradi su navedeni pristupni brojevi za NCBI bazu podataka) i to:

A) SuHV-1 sekvence

- soj Kaplan (JF797218.1), soj Bartha (JF797217.1), soj Becker (JF797219.1), soj Kolchis (KT983811.1), soj HNQX-China -2012 (KJ526437.1), soj HNZZK-China -2012 (KJ526433.1), soj JS-2012 (kp257591.1), soj HeN1 (KP098534.1), soj TJ (KJ789182.1).

B) PPV sekvence

- soj 77 (KP245936.1), soj S31 VP1/VP2 gene (FJ643431.1), soj S30 VP1/VP2 gene (FJ643430.1), soj 32-96 (AY454472), soj 142-95 (AY145474), soj 05-95 (AY145488), soj 27 (AY684871), soj 155-95 (AY145493), soj 164-95 (AY145494), soj 13-97 (AY145492), soj NE/09 (GU434317.1).

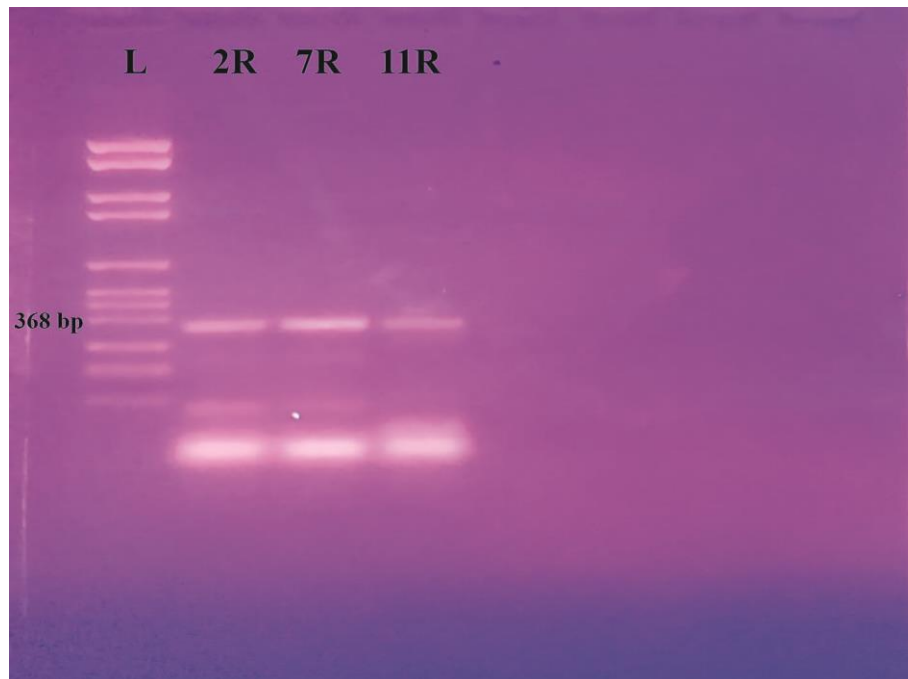
C) PCV2 sekvence

- soj Treviso 30 (KP231172.1), soj WB-H-3 (AY874165.1), soj Mantova (KP231140.1), soj DE222-13 (KP698398.1), soj Aust3959 (EU886637.1), soj LZ (DQ363860.1), soj WB-H-5 (AY874167.1), soj GER2 (AF201306.1), soj Jvnan (KP313254.1), soj SRB (HQ378159.1), soj SRB (HQ378160.1), soj DK1987PMWS (EU148504.1), soj AUT 4 (AY424404.1), soj AUT 5 (AY424405.1), soj YJ (HM038032.1), soj Xt2008 (KM624032.1), soj STOON (AF055392.1), soj 1980PMWS (EU148503.1), soj DE006-14 (KP698402.1).

5. REZULTATI ISPITIVANJA

5.1. PCR – virus Aujeckijeve bolesti

Primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR) uz korišćenje prajmera za glikoprotein B (gB) virusa izvršeno je pojedinačno ispitivanje osamdeset zbirnih uzoraka organa (limfni čvorovi, slezina) i isto toliko uzoraka sakralnih ganglija nevakcinisanih svinja različitih starosnih kategorija poreklom iz različitih delova Republike Crne Gore. Utvrđivanje DNK fragmenta virusa veličine od 368bp smatrano je pozitivnim nalazom. Kod jednog zbirnog uzorka organa i dva uzorka sakralnih ganglija utvrđeno je prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti. Pojedinačnim ispitivanjem pozitivnog zbirnog uzorka (limfni čvorovi, slezina) ustanovljeno je prisustvo nukleinske kiseline navedenog virusa u uzorku limfnog čvora. Pozitivni uzorci na prisustvo virusa bili su poreklom od tri različite svinje (Slika 7.). U odnosu na ukupan broj ispitanih uzoraka, broj pozitivnih uzoraka izražen u procentima je iznosio 1,8%.

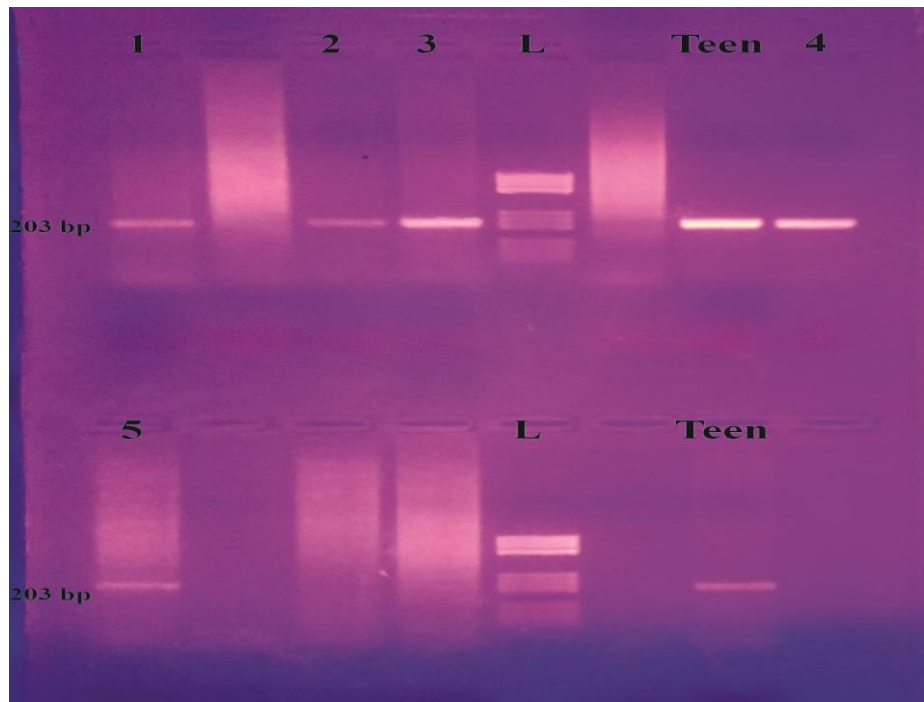


Slika 7. DNK fragmenti virusa Aujeckijeve bolesti

5.2. PCR – svinjski parvovirus

Prikupljeni uzorci svinja, ukupno 80 zbirnih uzoraka, ispitani su i na prisustvo svinjskog parvovirusa primenom metode PCR uz korišćenje prajmera za deo VP2 gena navedenog virusa. Utvrđivanje DNK fragmenta virusa veličine od 203bp smatrano je pozitivnim nalazom. Prisustvo nukleinske kiseline svinjskog parvovirusa utvrđeno je kod 10 zbirnih uzoraka organa svinja,

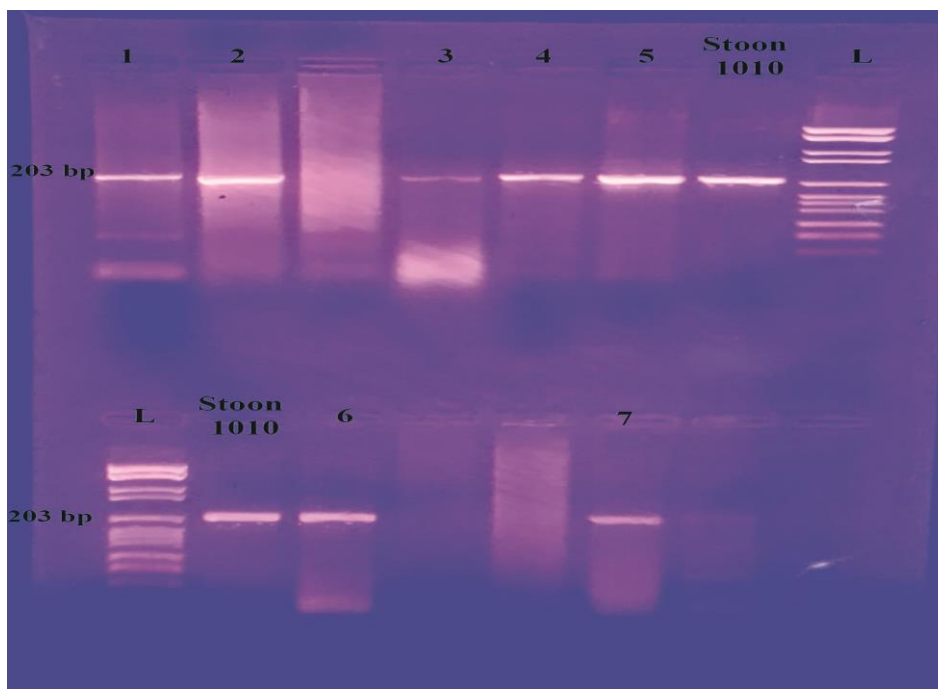
odnosno kod 12,5% ispitanih uzoraka. Pojedinačnim ispitivanjem pozitivnih zbirnih, prisustvo virusa je ustanovljeno kod osam uzoraka limfnih čvorova i dva uzorka slezina poreklom od različitih svinja (Slika 8.).



Slika 8. DNK fragmenti svinjskog parvovirusa

5.3. PCR- svinjski cirkovirus tip 2

Zbirni uzorci organa svinja, prethodno ispitani na prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti i svinjskog parvovirusa, ispitani su i na prisustvo nukleinske kiseline svinjskog cirkovirusa tip 2 primenom metode PCR uz korišćenje prajmera za deo ORF1 regiona genoma navedenog virusa. Utvrđivanje DNK fragmenta veličine od 703bp je smatrano pozitivnim nalazom. Kod devet zbirnih uzoraka svinja ustanovljeno je prisustvo nukleinske kiseline svinjskog cirkovirusa tip 2. Pojedinačnim ispitivanjem pozitivnih zbirnih uzoraka svinja, utvrđeno je prisustvo virusa PCV2 kod sedam uzoraka limfnih čvorova i dva uzorka slezina poreklom od različitih svinja (Slika 9.). Broj pozitivnih zbirnih uzoraka izražen u procentima je iznosio 11,2%.



Slika 9. DNK fragmenti svinjskog cirkovirusa 2

5.4. Mešovita infekcija

Mešovita infekcija svinja izazvana virusom Aujeckijeve bolesti i svinjskim parvovirusom utvrđena je kod jednog ispitanog uzorka limfnog čvora svinja. Prisustvo svinjskog parvovirusa i svinjskog cirkovirusa tip 2 je utvrđeno kod tri zbirna uzorka poreklom od različitih svinja. Pojedinačnim ispitivanje zbirnih uzoraka na prisustvo oba navedena virusa ustanovljeno je prisustvo nukleinskih kiselina virusa kod tri uzorka limfnih čvorova.

5.5. Izolacija virusa u ćelijskim linijama PK-15 i SK-6

Prikupljeni uzorci svinja, prethodno ispitani na prisustvo nukleinskih kiselina virusa Aujeckijeve bolesti, svinjskog parvovirusa i svinjskog cirkovirusa tip 2 u kojima je ustanovljeno prisustvo nukleinskih kiselina navedenih virusa, su pojedinačno inokulisani u ćelijske linije PK-15 i SK-6 u cilju eventualne izolacije virusa. Prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti i svinjskog parvovirusa posle pojedinačne inokulacije uzoraka u navedene ćelijske linije nije ustanovljeno primenom testa virus-neutralizacije (virus Aujeckijeve bolesti) i testova hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije (svinjski parvovirus). Posle inokulacije pozitivnih zbirnih uzoraka svinja na prisustvo svinjskog cirkovirusa tip 2 u ćelijske linije, primenom metode lančane reakcije polimeraze uz korišćenje prajmera za deo ORF1 regiona genoma svinjskog cirkovirusa tip 2, ustanovljeno je umnožavanje navedenog virusa u jednog uzorku

ćelija pripremljenom posle završetka perioda inkubacije prethodno inokulisane ćelijske linije koji je trajao 72 časa. Ovde treba napomenuti da se umnožavanje svinjskog cirkovirusa tip 2 u inokulisanim ćelijskim linijama može utvrđivati metodom PCR imajući u vidu da navedeni virus u ćelijskim linijama ne dovodi do ispoljavanja vidljivog citopatogenog efekta.

5.6. Rezultati metode direktnog sekvenciranja i filogenetska analiza

5.6.1. Virus Aujeckijeve bolesti

Primenom metode direktnog sekvenciranja po Sanger-u izvršeno je određivanje redosleda nukleotida dela gena koji kodiraju sintezu glikoproteina B (gB) spoljašnjeg omotača tri identifikovana virusa Aujeckijeve bolesti. Upotrebom BLAST programa (*engl.* Basic Local Alignment Search Tool), konsenzus sekvenca je upoređena sa sekvencama dela gB gena virusa Aujeckijeve bolesti dostupnim u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Rezultati ispitivanja su pokazali da je redosled sekvenci nukleotida dela gB gena kod sva tri identifikovana virusa poreklom od svinja sa teritorije Crne Gore bio identičan (100% sličnosti između analognih nukleotidnih sekvenci) (Tabela 1.).

Redosled nukleotida dela gB gena identifikovanih virusa Aujeckijeve bolesti	
2R (sakralne ganglije)	CCTCGTAGTACACGTACCCGCTCCCCAGCTTAAAGTAGCGCCGGTG GTTGCCGGTGCAGGGCTCGATGAGGTCGCGCGAGATGAGGAGCTCG TTGTCGTCGCCGAGCTGGCCCTCGATCACGCCCGTGCCGTTGTGCTC GAAGGTGACCAGCGGGCGGCTGTAGCACGTGCCGCGCTCGCCGGG CACGCGCATGGAGTTCTGCACGTACACGCCGCGCGCACCTCCACG CACCGCGAGATGGCCATCACGTCGCCGAGCATGCGCGCCGAGACGC GCTGGCCGAGCGCGGCCGTGGCCACGGCGCTGGGGTTCAGGCGCG ACATCTCGCTCCACAGGGTGCGGTCTTGTCTGCAGCTCGCACCAG
7R (limfni čvor)	CCTCGTAGTACACGTACCCGCTCCCCAGCTTAAAGTAGCGCCGGTG GTTGCCGGTGCAGGGCTCGATGAGGTCGCGCGAGATGAGGAGCTCG TTGTCGTCGCCGAGCTGGCCCTCGATCACGCCCGTGCCGTTGTGCTC GAAGGTGACCAGCGGGCGGCTGTAGCACGTGCCGCGCTCGCCGGG CACGCGCATGGAGTTCTGCACGTACACGCCGCGCGCACCTCCACG CACCGCGAGATGGCCATCACGTCGCCGAGCATGCGCGCCGAGACGC GCTGGCCGAGCGCGGCCGTGGCCACGGCGCTGGGGTTCAGGCGCG ACATCTCGCTCCACAGGGTGCGGTCTTGTCTGCAGCTCGCACCAG
11R (sakralne	CCTCGTAGTACACGTACCCGCTCCCCAGCTTAAAGTAGCGCCGGTG

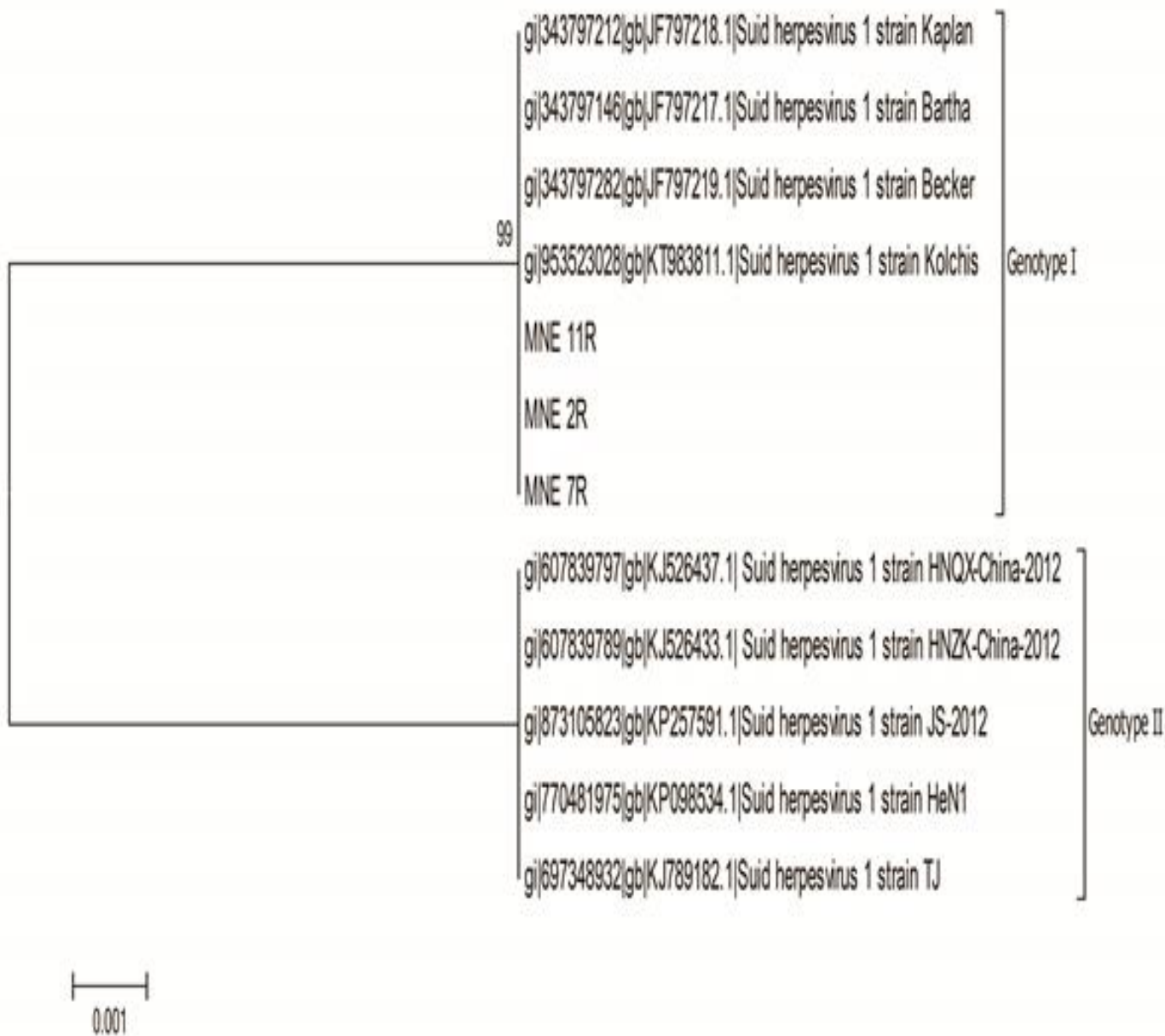
ganglije)	GTTGCCGGTGCAGGGCTCGATGAGGTCGCGCGAGATGAGGAGCTCG TTGTCGTCGCCGAGCTGGCCCTCGATCACGCCCGTGCCGTTGTGCTC GAAGGTGACCAGCGGGCGGCTGTAGCACGTGCCGCGCTCGCCGGG CACGCGCATGGAGTTCTGCACGTACACGCCGCGCGCACCTCCACG CACCGCGAGATGGCCATCACGTGCCGAGCATGCGCGCCGAGACGC GCTGGCCGAGCGCGGCCGTGGCCACGGCGCTGGGGTTCAGGCGCG ACATCTCGCTCCACAGGGTGCGGTCCTTGTCTGCAGCTCGCACCAG
-----------	---

Tabela 1. Redosled nukleotidnih sekvenci dela gB gena tri identifikovana virusa Aujeckijeve bolesti

Nukleotidne sekvence gB gena virusa Aujeckijeve bolesti identifikovanih u uzorcima organa i sakralnih ganglija svinja poreklom iz ekstenzivnog načina gajenja na teritoriji Crne Gore imale su 100% sličnosti sa analognim sekvencama sojeva Kaplan (JF797218.1) i Bartha (JF797217.1) poreklom iz Mađarske, zatim sojeva Kolchis (KT983811.1) i Hercules (KT983810.1) poreklom iz Grčke (Velika Britanija, izolovanim u Grčkoj), odnosno sa nukleotidnim sekvencama sojeva NIA3 (KU900059.1) poreklom iz Velike Britanije i Becker (JF797219.1) poreklom iz SAD. Nukleotidne sekvence tri identifikovana virusa Aujeckijeve bolesti poreklom od svinja u Crnoj Gori imale niže stepen sličnosti od 99% sa analognim sekvencama sojeva HeN1 (KP098534.1), HNZK-China – 2012 (KJ526433.1), JS-2012 (KP257591.1) i HNQX-China-2012 (KJ526437.1) poreklom iz Kine. Najniži stepen sličnosti od 98% nukleotidne sekvence tri identifikovana virusa Aujeckijeve bolesti identifikovana u uzorcima svinja u Crnoj Gori imale su sa analognim sekvencama nukleotida dela gB gena sojeva Ea (KU315430.1), Fa (KM89913.1), SC (KT809429.1), GD-SH (KT948054.1) identifikovanih kod svinja na teritoriji Kine.

Na filogenetskom stablu virusi Aujeckijeve bolesti identifikovani kod svinja u Crnoj Gori su grupisani zajedno sa sojevima Kaplan (JF797218.1) i Bartha (JF797217.1) virusa Aujeckijeve bolesti poreklom iz Mađarske, odnosno sojevima navedenog virusa Kolchis (KT983811.1) poreklom iz Grčke i Becker (JF797219.1) poreklom iz SAD. Tri virusa Aujeckijeve bolesti identifikovana kod životinja u Crnoj Gori imala su niži stepen sličnosti sa sojevima HeN1 (KP098534.1), HNQX-China-2012 (KJ526437.1), JS 2012 (KP257591.1), HNZK-China – 2012 (KJ526433.1) i TJ (KJ789182.1) poreklom iz Kine koji su iz tog razloga

grupisani odvojeno na filogenetskom stablu. Ovde treba napomenuti da u genskoj bazi podataka najveći broj dostupnih sekvenci je poreklom od sojeva virusa Aujeckijeve bolesti poreklom od svinja sa teritorije Kine. Na osnovu rezultata izvršene filogenetske analize kao i na osnovu podataka iz dostupne literature virusi Aujeckijeve bolesti identifikovani kod svinja na teritoriji Crne Gore pripadaju genotipu I navedenog virusa. Sojevi virusa prikazani na filogenetskom stablu poreklom iz Kine pripadaju genotipu II virusa Aujeckijeve bolesti (Slika 10.).



Slika 10. Filogenetsko stablo virusa Aujeckijeve bolesti identifikovanih kod svinja u Crnoj Gori

5.6.2. Parvovirus svinja

Primenom metode direktnog sekvenciranja po Sanger-u izvršeno je određivanje redosleda nukleotida dela VP2 gena pet odabranih svinjskih parvovirusa identifikovanih u uzorcima organa svinja poreklom sa teritorije Crne Gore. Pet odabranih svinjskih parvovirusa za izvođenje metode direktnog sekvenciranja bila su identifikovana u uzorcima svinja gajenih u različitim geografskim, područjima Crne Gore. Tri identifikovana virusa su bila poreklom od svinja sa teritorije opštine Berane, jedan virus je identifikovan kod svinja na području Bjelog Polja, dok je jedan virus identifikovan kod svinja na području Podgorice. Upotrebom BLAST programa (*engl.* Basic Local Alignment Search Tool), konsenzus sekvenca identifikovanih virusa je upoređena sa sekvencama dela VP2 gena svinjskih parvovirusa dostupnim u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dobijeni rezultati ispitivanja primenom metode direktnog sekvenciranja po Sanger-u su pokazali da su nukleotidne sekvence pet svinjskih parvovirusa (MNE 1 (3RMRP), MNE 2 (8/1RMRP), MNE 10, MNE 12 i MNE 28) identifikovane kod svinja u Crnoj Gori između sebe bile identične, odnosno da su ispoljile sličnost od 100% (Tabela 2).

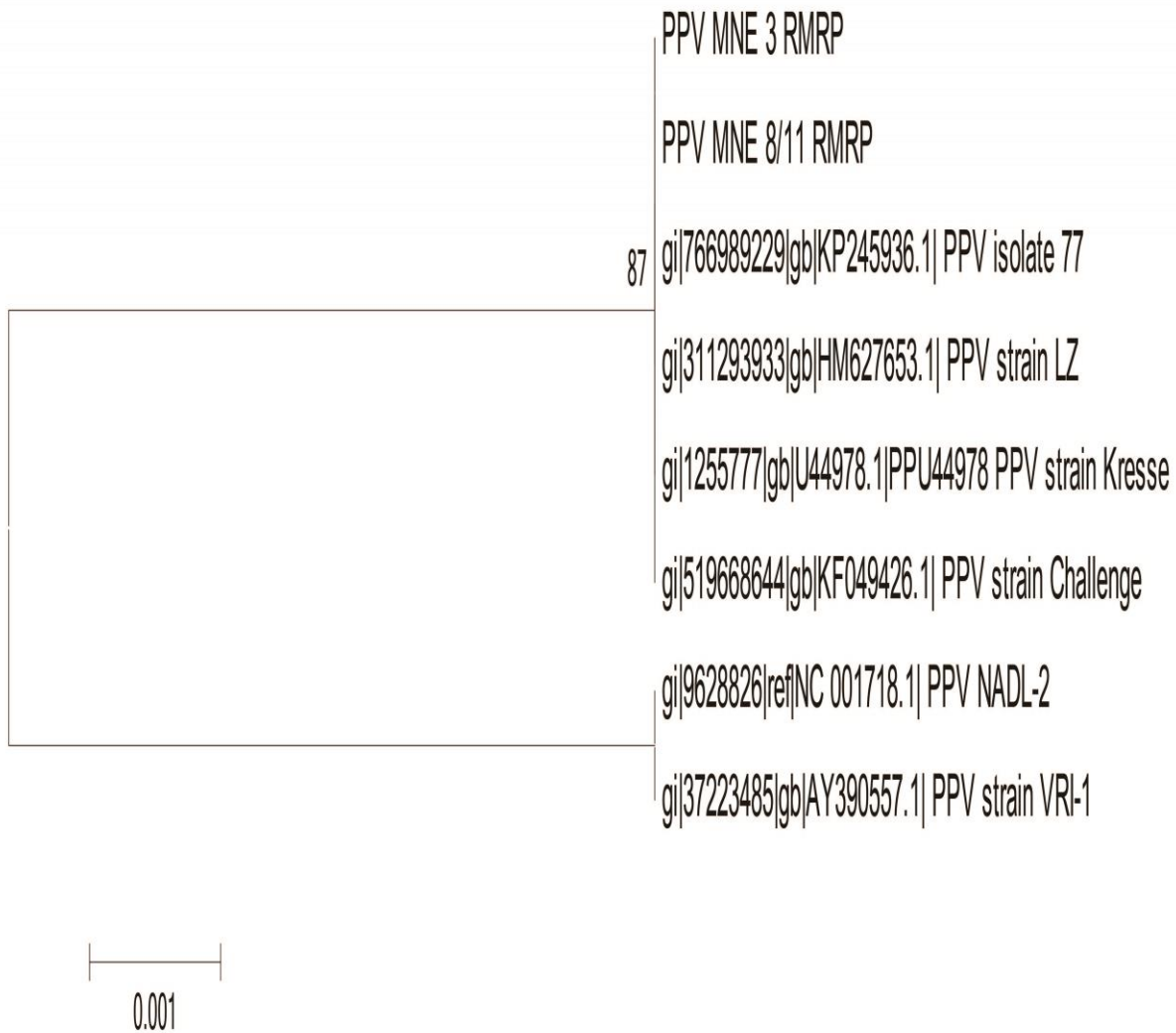
Rezultati izvođenja metode direktnog sekvenciranja pet odabranih svinjskih parvovirusa identifikovanih kod svinja na teritoriji Crne Gore – redosled nukleotida dela VP2 gena identifikovanih virusa	
MNE 1	ATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACCATACATGAATTTTGAA TACTCCAATGGTGGACCATTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCAGACA CACAATATAATGATGATGAACCAAATGGTGCTATAAGATTTACAATGG GTTACCAACATGGACAATTAACCACATCTTCACAAGAGCTAGA
MNE 2	CACAGAAGCAACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACC ATACATGAATTTTGAATACTCCAATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATA GTACCAACAGCAGACACACAATATAATGATGATGAACCAAATGGTGCT ATAAGATTTACAATGGGTTACCAACATGGACAATTAACCACATCTTCA CAAGAGCTAG
MNE 10	ATTTTTAATTGATATTTATTTTTTATATTTATATATATATTATTATTTAAT AAAAGATATGATAATTTTTATGTTTGGATATTAATATTTTTTTGTATTG TTGGATTGGGGGGGTTTGTTTAAATAATAAAAACTTATAAAAAGGGG TTTAAATTTATGAGAAAAATAAAAAATATAAAAAATGGTAATTGGAAAA AGTAAATTTGGTTATTTAATTTGGGAAAATAGGAGAAAAAATATAATG GTAGATTGAAAAATGGGTTAATTCGATACGAATAGGAATTGCACAGAA GCAATAGTAATTAGGAAAATATAAACTCAGAGAAGGAGTATCACAGA AGCAACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACCATACAT GAATTTTGAATACTCCAATGGTGGACCATTCTAACTCCTATAGTACCA

	ACAGCAGACACACAATATAATGATGATGAACCAAATGGTGCTCCCCAA GGGCCGTGTAATAAGTACACCATACATGAATTTTGAGTACTGCAAATG GTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCAGACACACAATATA ATGATGATGAACCAAATGGTGCTATAAGATTTACAATGGGTTACCAAC ATGGACAATTAACCACATCTTCACAAGAGCTAGAGAATTTTTTTTGTTA TCTGTTTTTATCCTTATTATAAGAAGTTCTCCCTTCCCCCTTTTTTTTA TATTCTTTTTACTACTTTACCCTTTCTCTTTTCTTCCTTTATTTGTTTTCT CCTATTTATCTTAATCATCTTTTTTTTTTCTTTTTCTCTTTTTTATTTCTC TTTTTTTTTCTCCTTTTTTTTTTTTCTCTCTTTTTCTCCTTTTTTTCTTTTT TTTTTCTCCTCTCTCTTTAAGTAGGTATCCTTTATTTTTTTCTTCGTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCATTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTAT
MNE 12	GATGCTCAAGTCAGATACGAAGAATTTAAAGTTAACCGGCAAATGAGA ACAAGGAGTGGTGGGAAGTTGTTTCAAGTAATAAATGGAAAGAGAGG GGACAGGTCACCTCCTAAGGAGACAAACAATTAGTGGGGGAATTCTCA CAGAAGCAACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACCCAT ACATGAATTTTGAATACTCCAATGGTGGACCATTTCTAACTCCTAGATG GNACTAGTACACCATACATGAATTTTGAATACTCCAATGGTGGACCATT TCTAACTCCTATAGTACCAACAGCAGACACACAATATAATGATGATGA ACCAAATGGTGCTATAAGATTTACAATGGGTTACCAACATGGACAATT AACCACATCTTCACAAGAGCTAGAGAGATATACAAATATTAGTCCATA ACTAAGTGTACTCCGTATAAAGGAGGTGATCCATCCCCACGTTCTCGTA GGGATACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCACCAGTCCTACCTTAGGCG GTCGCCTCCAAGGTTAGCAAACCGACTTTGGGTATTACCAGTCCTATGG TGTACCC
MNE 28	CACAGAAGCAACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACCCC AGATATACACCATACATGAATTTTGAATACTCCAATGGTGGACCATTT TAACTCCTATAGTACCAACAGCAGACACACAATATAATGATGATGAAC CAAATGGTGCTATAAGATTTACAATGGGTTACCAACATGGACAATTAA CCACATCTTCACAAGAGCTAGAG

Tabela 2. Redosled nukleotida dela VP2 gena svinjskih parvovirusa identifikovanih na teritoriji Crne Gore

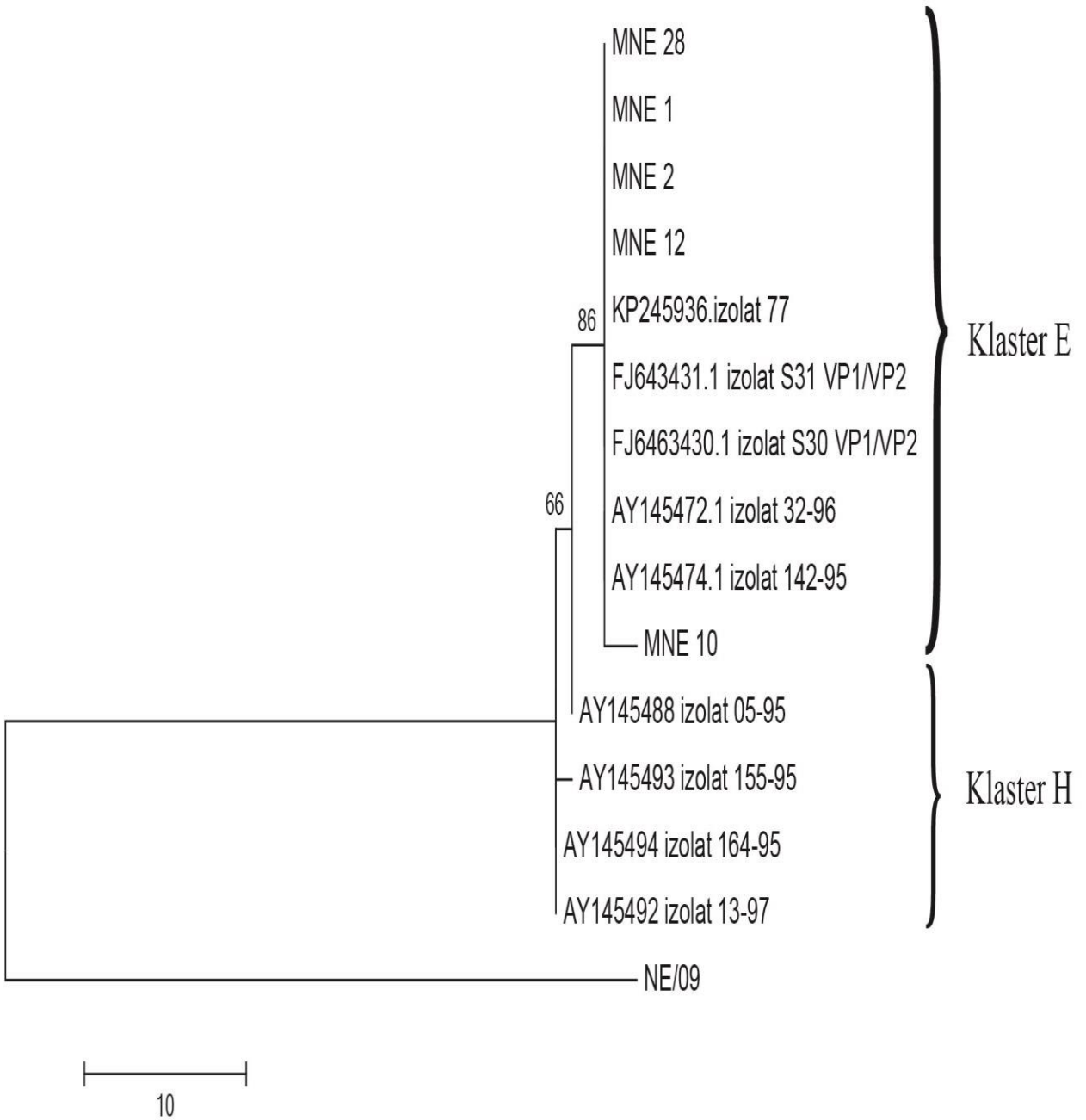
Nukleotidne sekvence svih pet svinjskih parvovirusa identifikovanih kod svinja na teritoriji Crne Gore bile su identične sa analognim sekvencama soja Challenge (KF049426.1) poreklom iz Velike Britanije, zatim sojeva svinjskog parvovirusa 77 (KP245936.1) i LZ

(HM627653.1) poreklom iz Kine i sojem Kresse (U44978.1) poreklom iz SAD. Nukleotidne sekvence pet parvovirusa svinja poreklom iz Crne Gore i analogne sekvence prethodno navedenih sojeva virusa iz drugih delova sveta su imale visok stepen sličnosti (100%). Iz tog razloga virusi identifikovani kod svinja na teritoriji Crne Gore su zajedno sa navedenim sojevima virusa iz drugih delova sveta na filogenetskom stablu grupisani zajedno u jednu monofiletsku grupu. Nukleotidne sekvence sojeva NADL-2 (NC001718.1) poreklom iz SAD i VRI-1 (AY390557.1) poreklom iz Južne Koreje su imale 99% sličnosti sa analognim nukleotidnim sekvencama svinjskih parvovirusa identifikovanih u Crnoj Gori. Iz navedenog razloga sojevi svinjskog parvovirusa poreklom iz SAD i Južne Koreje su grupisani odvojeno u posebnu granu filogenetskog stabla (Slika 11.).



Slika 11. Primer: Filogenetsko stablo dva svinjska parvovirusa identifikovana kod svinja na teritoriji Crne Gore

Na osnovu filogenetske analize redosleda nukleotida dela VP2 gena identifikovanih svinjskih parvovirusa, analognih sekvenci navedenog gena drugih sojeva pomenutog virusa objavljenih u genskoj bazi podataka kao i na osnovu dostupnih literaturnih podataka, izvršeno je grupisanje odabranih svinjskih parvovirusa sa područja Crne Gore u odgovarajuće klastere, odnosno grupe svinjskog parvovirusa. Ovde treba napomenuti da sojevi svinjskih parvovirusa nisu još uvek podeljeni u genotipove kakav je slučaj kod virusa Aujeckijeve bolesti ili svinjskog cirkovirusa 2. Na osnovu rezultata filogenetske analize, virusi identifikovani iz uzoraka svinja sa područja Crne Gore svrstani su zajedno sa sojevima svinjskog parvovirusa 77 (KP245936.1) poreklom iz Kine i sa sojevima S31 VP1/VP2 (FJ643431.1) i S30 VP1/VP2 (FJ6463430.1), 32-96 (AY145472.1) i 142-94 (AY145474.1) poreklom sa teritorije Brazila. Nukleotidne sekvence dela VP2 gena svih navedenih sojeva virusa poreklom iz Kine i Brazila su bile identične analognim sekvencijama svinjskih parvovirusa identifikovanih kod svinja u Crnoj Gori. (100% sličnosti). Na osnovu dobijenih rezultata filogenetske analize utvrđeno je da svinjski parvovirusi poreklom od svinja u Crnoj Gori pripadaju klasteru E svinjskog parvovirusa zajedno sa, pored prethodno navedenih sojeva virusa, i sojevima Kresse i Challenge (Slika 12). Ostali sojevi virusa 05-95 (AY145488), 155-95 (AY145493), 164-95 (AY145494) i 13-97 (AY145492) svi poreklom od domaćih svinja iz Brazila svrstani su zasebno u klaster H svinjskog parvovirusa. Soj NE/09 poreklom iz Kine na filogenetskom stablu je svrstan zasebno, imajući u vidu da je isti mutirani soj navedenog virusa čije su osnovne biloške osobine opisane 2013.godine. Navedeni soj je prisutan kod svinja u Kini.



Slika 12. Filogenetsko stablo svinjskih parvovirusa identifikovanih kod svinja na teritoriji Crne Gore

5.6.3.

Svinjski cirkovirus tip 2

Primenom metode direktnog sekvenciranja po Sanger-u određen je redosled nukleotida dela ORF1 regiona genoma šest odabranih svinjskih cirkovirusa tip 2 identifikovanih kod svinja na teritoriji Crne Gore. Odabrani virusi su bili poreklom iz različitih geografskih područja Crne Gore. Tri svinjska cirkovirusa tip 2 su bila poreklom od svinja gajenih na teritoriji Berana, dva sa područja Bijelog Polja i jedan sa teritorije Podgorice. Upotrebom BLAST programa (*engl.* Basic Local Alignment Search Tool), konsenzus sekvenca je upoređena sa sekvencama dela ORF1 regiona genoma svinjskog cirkovirusa tip 2 dostupnim u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tabela 3.).

Redosled nukleotida dela ORF1 regiona genoma svinjskog cirkovirusa 2	
MNE 1	TAACAGCGACATGCCAGCAAGAGGAATGGAAGAGGCGGACCC CGGCCACATAAAAGGTGGGTGTTACGCTGAATAATCCTTCCGN ATACTGTGATGGTCGTNAGCAGTGTGACTCGAGACTGTAGTGTA TCTACAGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGAGCTTCCAATCT CCCTGTTTGATTATTTTATTGTTGGCGAGGAGGGTAATGAGGAA GGACGAACACCTCACCTCCAGGGGTTTCGCTAATTTTGTGAAGAA GCAGACTTTTAATAAAAGTGAAGTGGTATTTGGGTGCCCGCTGCC ACATCGAGAAAGCGAAAGGAACAGATCAGCAGAATAAAGAATA CTGCAGTAAAGAAGGCAACTACTGATCGAGTGTGGAGCTCCTA GATCTCAGGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTACC TTGTTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCC TGTAACGTTTGTGAGAAATTTCCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGA AAGTGAGCGGGAAAATGCAAACCGTGATTGGAAGACTAATGT ACACCTCATTGTGGGGCCACCTGGGTGTGGTAAAAGCCAATGGG CTGCTAACTTTGCATATCCGGAAACCACA
MNE 2	ATCTCCGCAGCAACATGCCAGCAAGAAGAATGGAAGAAGCGG ACCCCAACCCCATAAAAGGTGGCAATACTGAATCTGATGGTGAT CGAGATCAATGTGTTTCGCGATGGAGTGATCTACCGAAGACGAGC GCAAGAAAATACGGGATCTTCCAATATCCCTATTTGATTATTTTA TTGTTGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCT CCAGGGGTTTCGCTAATTTTGTGAAGAAGCAGACTTTTAATAAAG TGAAGTGGTATTTGGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAAAGCGAAA GGAACAGATCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAGGCA ACTTACTGATGGAGTGTGGAGCTCCTAGATCTCAGGGACAACGG AGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTACCTTGTGGAGAGCGGGAG

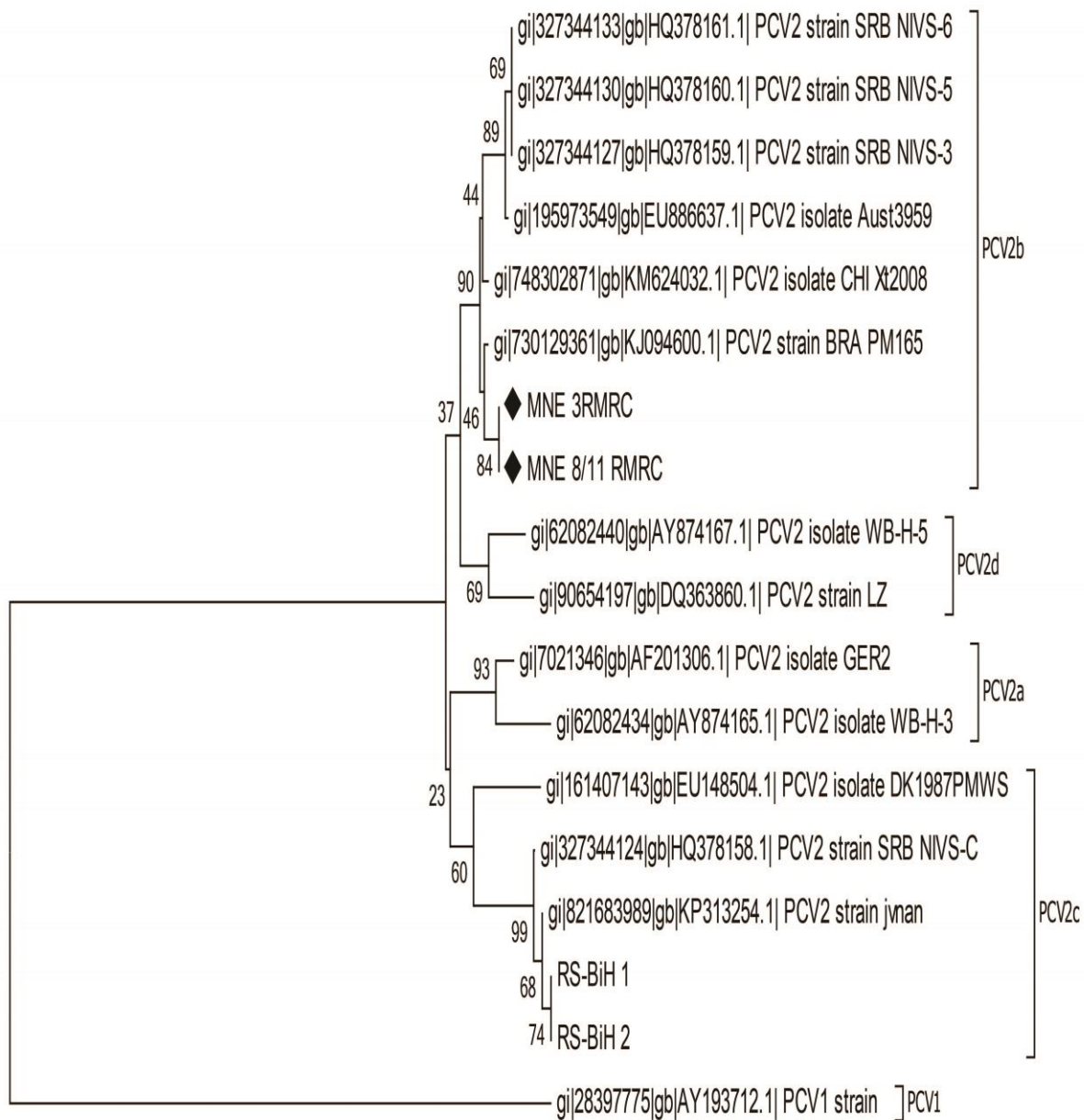
	<p>TCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCCCTGTAACGTTTGTTCAGAA ATTTCCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAAGTGAGCGGGAAAATG CAGAAGCGTGATTGGAAGACTAATGTACACGTCATTGTGGGGCC ACCTGGGTGTGGTAAAAGCAAATGGGCTGCTAATTTTGCAGACC CGGAAACCACATACTGGAAACCACCTAGAAACAAGTGGTGGGA TGGTTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTCATTGATGACTTTTATG GCTGGCTGCCCTGGCATGACCTACTGAGACTGTGTGATCGAACC GGAAAACAAA</p>
<p>MNE 3RM</p>	<p>CAGCAACATCCCCAGCAAGAAGAATGGAAGAAGCGGACCCCAA CCACATAAAACCCCGAAAATACCGGGACTGTCCTCATCGACGGT GGGTGTTTCACGCTGAATAATCCTTCCGAAGACGAGCGCAAGAA AATACGGGAGCTTCCAATCTCCCTGTTTGATTATTTTATTGTTGG CGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGG TTCGCTAATTTTGTGAAAAAACACACTTTTAATAAAGTGAATTG GTATTTGGGTGCCCCCTGCCACATCAAAAAACCGAAAGGAACA AATCGGCGCAGTAAAGAATACTGCACCAAACAACGCAACTTAC TGATCGAATGTGGAGCTCCTAAATCTCAAGTACAACCTGGACTGA ACAGCCTACAGCTGCGAATACCTTGATGGAGATCCCTACTCTGG TGACCGATTCTTAATTCCGCCGAGCAGCTCCTTTCACATTTTCCA TGTGGCTGCGGGAACCTTTGTACCTCTTCGCTTTATTA AAAATCC GCGTCTTCAAAAATTAGCGAACCCTGTAGGTGAGGTGTTTCGTC GTTCCCTCATTACCCTCCTCGCCAACAATAAAATACTCAGACAGG GAGATTGGAAGCTCCCGTATTTTCTTGCGCTCGGCTTCGGAAGG ATTATTCAACGTGAACTCCCTCCATTAATGTGGTTGGGGTCCGCT TCATCCATTCCCTCTTGATAGTCAAGTAGCTGAACAAAACAATGA TATTTATTTTCCATAACTATCCTTTAAAATAATATAACTATACTA TACATTTATAACTCTATTATA</p>
<p>MNE 8/11</p>	<p>CATAAAAGGTGGGTGTTTCACGCTGAATAATCCTTCCGAAGACGA GCGCAAGAAAATACGGGAGCTTCCAATCTCCCTGTTTGATTATT TTATTGTTGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCA CCTCCAGGGGTTTCGCTAATTTTGTGAAGAAGCAGACTTTTAATA AAGTGAAGTGGTATTTGGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAAAGCG AAAGGAACAGATCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAG GCAACTTACTGATCGAGTGTGGAGCTCCTAGATCTCAGGGACAA CGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTACCTTGTTGGAGAGCGG GAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCCCTGTAACGTTTGTCA GAAATTTCCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAAGTGAGCGGGAAA ATGCAGAAGCGTGATTGGAAGACTAATGTACACGTCATTGTGGG</p>

	<p>GCCACCTGGGTGTGGTAAAAGCAAATGGGCTGCTAATTTTGCAG ACCCGGAAACCACATACTGGAAACCACCTAGAAACAAGTGGTG GGATGGTTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTCATTGATGACTTTT ATGGCTGGCTG</p>
<p>MNE 5</p>	<p>ATCTCCGCAGCAACATGCCAGCAAGAAGAATGGAAGAAGCGG ACCCCAACCCCATAAAAGGTGGCAATACTGATCTGATGGTGATC GAGATCAATGTGTTTCGCGATGGAGTGATCTACCGAAGACGAGC GCAAGAAAATACGGGATCTCCAATATCCCTATTTGATTATTTTAT TGTTGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTC CAGGGGTCGCTAATTTTGTGAAGAAGCAGACTTTTAATAAAGTG AAGTGGTATTTGGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAAAGCAAAGG AACAGATCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAGGCAAC TACTGATGGAGTGTGGAGCTCCTAGTCTCAGGGACAACGGAGT GACCTGTCTACTGCTGTGAGTACCTTGTTGGAGAGCGGGAGTCT GGTGACCGTTGCAAGCAGCACCTGTAAACGTTTGTGAGAAATTT CCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAAGTGAGCGGGAAAATGCAG AGCGTGATTGGAAGACTAATGTACACGTCATTGTGGGGCCACCT GGGTGTGGTAAAAGCAAATGGGCTGCTAATTTGCAGACCCGGA AACCACATACTGGAAACCACCTAGAAACAAGTGGTGGGATGGT TACCATGGTGAAGAAGTGGTGTGTCATTGATGACTTTTATGGCTGG CTGCCCTGGCATGACCTACTGAGACTGTGTGATCGAACCGGAAA ACAAA</p>
<p>MNE 6</p>	<p>ATTATTATATATATATATTAATTTTTTTTTTTATTTTATTTATATTTT AATTTTTAATAATTTTTTAAATTTTTTTTTTTTTCTCCCAGCAAATG CCCAGCAAGAAGAATGGAAGAAGCGGACCCCAACCATATAAAA TCAAAAAATGGCGATCGGAGCTGATCGATGGTAGGGTGTTCGCG CTGGAAGAATCCTTCCGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGAG CTCCCAATCTCCCTATTTGATTATTTTATTGTTGGCGAGGAAGGT AATGAGGAGGGCCGAACACCCACCTACAGGGGTTTCGCAAATT TTGTGAAGAAGCAAACCTTTTAATAAAGTGAAGTGGTATTTTGGT GCCCCGTGCCACATCGAGAAAGCGAAAGGAACAGATCAGCAGA ATAAAGAATATTGCAGTAAAGAAGGCAACTTACTGATAGAATG TGGAGCTCCTAGATCTCAAGGACAACGGAGTGACCTCTCTACTG CTGTGAGTACCTTGTTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCA GAGCACCACCTGTAAACGTTTGTCAAAATTTCCGCGGGCTGGC TGAACTTTTGAAAGTGAGCGGGAAAATGCAGAAGCGTGATTGG AAGACGAATGTACACGTCAGTGTGGGGCCACCTGGGTGTGGCA AAAGCAAATGGGCTGCTAATTTTGCAGACCCGGAAACCGCTACT</p>

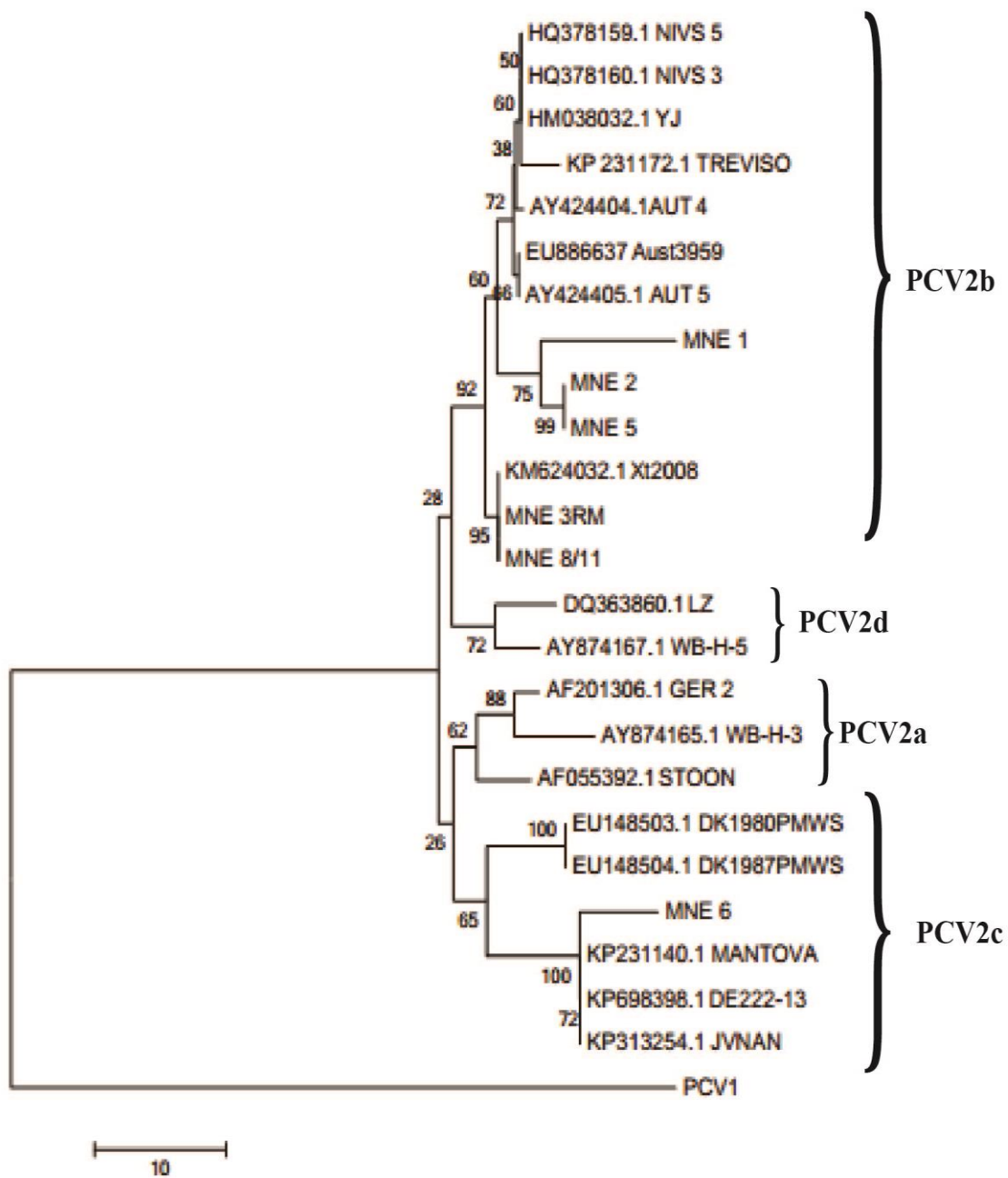
	GGAAACCACCTATAAACCATTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAA GAACTGGTTGCCCTCCTGACTTTTGGGTGGGGTCCCCTTCTTCCA TTCTTCTTGCACGGCATGTTGCAGGAAACCCCAATTTTTTTTTT
--	---

abela 3. Nukleotidne sekvence dela ORF1 regiona genoma svinjskog cirkovirusa 2 identifikovane kod svinja na teritoriji Crne Gore

Nukleotidne sekvence pet svinjskih cirkovirusa 2 identifikovanih kod svinja na teritoriji Crne Gore (MNE 3RM, MN3 8/11, MNE 1, MNE 2 i MNE 5) su imale visok stepen sličnosti (100%) sa analognim nukleotidnim sekvencama sojeva Treviso (KP231172.1) izolovanim kod svinja u Italiji, NIVS 3 (HQ378160.1) i NIVS 5 (HQ378159.1) identifikovanim kod svinja u Srbiji, zatim sojevima Aust3959 (EU886637.1), AUT4 (AY424404.1), AUT5 (AY424405.1) poreklom iz Austrije, odnosno sojevima YJ (HM038032.1) i Xt2008 (KM624032.1) poreklom od svinja sa teritorije Kine. Na osnovu filogenetske analize nukleotidnih sekvenci dela ORF1 regiona genoma virusa PCV2 identifikovanih kod svinja sa teritorije Crne Gore i analognih sekvenci nukleotida sojeva navedenog virusa iz drugih delova sveta ustanovljeno je da pet virusa PCV2 poreklom iz Crne Gore pripadaju genotipu PCV2b. Nukleotidna sekvenca jednog svinjskog cirkovirusa 2 imala je visok stepen sličnosti (100%) sa analognim sekvencama sojeva Mantova (KP231140.1) izolovanim kod svinja u Italiji, zatim sojevima DE222-13 (KP698398.1) poreklom iz Nemačke i JVNAN (KP313254.1) identifikovanim kod svinja u Kini. Na osnovu uporedne analize nukleotidnih sekvenci jednog svinjskog cirkovirusa 2 identifikovanog kod svinja na teritoriji Crne Gore (MNE 6) i analognih sekvenci nukleotida prethodno navedenih sojeva virusa poreklom iz Italije, Nemačke i Kine, ustanovljeno je da se isti na filogenetskom stablu grupišu zajedno i da pripadaju genotipu PCV2c navedenog virusa. Ostali sojevi svinjskog cirkovirusa 2 prikazani na filogenetskom stablu pripadaju genotipovima PCV2a i PCV2d. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja može se zaključiti da su kod svinja na području Crne Gore prisutna oba genotipa svinjskog cirkovirusa 2 i to genotipovi PCV2b i PCV2c sa dominacijom genotipa PCV2b (Slike 13., 14.).



Slika 13. Primer: Filogenetsko stablo dva virusa PCV2 identifikovana kod svinja na teritoriji Crne Gore i sojeva virusa identifikovanih u drugim delovima sveta



Slika 14. Filogenetsko stablo virusa PCV2 identifikovanih kod svinja na teritoriji Crne Gore (ukupno 6) i sojeva virusa identifikovanih u drugim delovima sveta

6. DISKUSIJA

Proizvodnja svinja je široko rasprostranjena u svim delovima sveta. Brz obrt stada i povraćaj uloženog kapitala stimuliše poljoprivredne proizvođače da se bave ovom vrstom proizvodnje. Danas se u svetu proizvodnja svinja uglavnom zasniva na farmskom, odnosno intenzivnom načinu proizvodnje. Ovaj vid proizvodnje karakteriše velika aglomeracija životinja na jednom ograničenom prostoru i kompleksnost organizacije proizvodnje (obezbeđivanje dovoljne količine hrane i njeno skladištenje, adekvatno odlaganje otpada sa farme, održavanje dobrog zdravstvenog stanja životinja, odnosno postojanje odgovarajuće veterinarske službe). Pored intenzivnog postoji i ekstenzivan način proizvodnje svinja koji je uglavnom karakterističan za manje razvijene ili zemlje u razvoju. Ovaj način proizvodnje karakteriše manji broj životinja u procesu proizvodnje i veoma često prisustvo drugih vrsta životinja u jednom ekonomskom dvorištu. Proizvodi dobijeni ovim načinom proizvodnje se, za razliku od proizvoda dobijenih intenzivnom načinu proizvodnje koji su namenjeni za prodaju na tržištu, uglavnom koriste za ishranu članova domaćinstva.

Intenziviranje proizvodnje svinja u svetu i kod nas u poslednjih nekoliko decenija imalo je pored pozitivnih posledica koje su se ogledale u povećanoj proizvodnji svinjskog mesa, pojavu različitih infekcija kojima su životinje izložene tokom odvijanja procesa proizvodnje. One se ispoljavaju u vidu infekcija sa blažim kliničkim simptomima bolesti do infekcija koje se ispoljavaju teškim kliničkim simptomima oboljenja, odnosno pojavom uginuća.

U cilju obezbeđivanja nesmetanog odvijanja procesa proizvodnje, poslednje decenije karakteriše razvoj različitih vrsta vakcina koje se koriste za imunizaciju svinja različitih starosnih kategorija u cilju sprečavanja pojave oboljenja, zatim sinteza širokog spektra antibiotika koji se koriste u terapijske svrhe, odnosno razvoj i unapređenje odgovarajućih laboratorijskih metoda koje se koriste u dijagnostici različitih infekcija svinja.

Kao što je prethodno navedeno virusne infekcije svinja izazivaju značajne ekonomske štete u proizvodnji svinja. One se manifestuju pojavom oboljenja sa ispoljavanjem kliničkih simptoma bolesti i ozdravljenjem obolele životinje ili, u slučajevima pojave nekih infekcija, uginućem životinje. Tok i patogenezu infekcija izazvanih virusima zavise od vrste virusa, njegovog tropizma, odnosno stepena virulencije. Virusna oboljenja svinja u nekim slučajevima

moгу biti lokalnog karaktera (samo respiratorni simptomi bolesti) ili praćena promenama opšteg zdravstvenog stanja inficiranih jedinki.

Primena odgovarajućih i pouzdanih laboratorijskih metoda je od izuzetnog znaćaja u nesmetanom odvijanju proizvodnje svinja. Pravovremena dijagnostika virusnih infekcija omogućava sprećavanje širenja oboljenja, odnosno suzbijanje infekcija kod životinja u što kraćem vremenskom periodu. Danas se u svetu u cilju dijagnostike virusnih infekcija svinja primenjuje više klasićnih i molekularnih metoda. Od klasićnih metoda najzastupljenije su metoda izolacije virusa u ćelijskim linijama, test virus-neutralizacije (za identifikaciju izolovanih sojeva virusa), zatim metode ELISA, direktna i indirektna imunofluorescencija. Pored ovih metoda u poslednje dve decenije se intenzivno koriste molekularne metode kao što su konvencionalni PCR, RT-PCR i real-time PCR. Primena molekularnih metoda je omogućila da se za što kraće vreme izvrši brza i pouzdana dijagnostika virusnih infekcija. Treba napomenuti da je, iako se ove metode danas veoma mnogo primenjuju u ispitivanjima svuda u svetu, primena klasićnih metoda i dalje veoma vaćzna u dijagnostici virusnih bolesti kod svinja.

Imajući u vidu podatke iz strane literature moćže se zakljućiti da infekcije svinja izazvane virusom Aujećkijeve bolesti, svinjskim parvovirusom i svinjskim cirkovirusom tip 2 predstavljaju znaćajan rizik za zdravlje svinja. One mogu izazvati znaćajne ekonomske gubitke u proizvodnji zbog ćega je pravovremena dijagnostika infekcija izazvanih navedenim virusima od izuzetnog znaćaja. Choi i sar., 1987. su uporećivali stepen patogenosti soja Kresse parvovirusa svinja sa stepenom patogenosti soja NADL-8 navedenog virusa. Fetusi gravidnih krmaća su veštaćki inficirani jednim ili drugim sojem svinjskog parvovirusa. Rezultati ispitivanja su pokazali da su oba soja virusa visoko patogena za krmaće u drugoj trećini graviditeta. Mećdutim, razlike u stepenu patogenosti navedenih sojeva svinjskog parvovirusa su bile ustanovljene posle izvoćdenja ogleđa veštaćke infekcije fetusa u poslednjoj trećini graviditeta. Jenkins, 1992. je razvio metodu ELISA u cilju otkrivanja prisustva antigena svinjskog parvovirusa u uzorcima fetalnog tkiva. Isti uzorci su bili ispitivani i primenom metoda imunofluorescencije i testa hemaglutinacije. Od ukupno 490 ispitanih uzoraka, 29 uzoraka je bilo pozitivno posle pojedinaćnog ispitivanja sa sve tri prethodno navedene metode, dok je 458 bilo negativno. Trideset dva uzorka organa je bilo pozitivno posle ispitivanja sa jednom od tri korišćene metode. Primenom metoda ELISA i testa hemaglutinacije tokom pojedinaćnog ispitivanja 31 uzorka

utvrđeno je 100% poklapanje dobijenih rezultata. Jedan uzorak je bio pozitivan posle ispitivanja primenom metode imunofluorescencije, dok je isti uzorak bio negativan posle pojedinačnog ispitivanja primenom metoda ELISA i testa hemaglutinacije. Dva uzorka su bila pozitivna posle pojedinačnog ispitivanja primenom testa hemaglutinacije i metode ELISA. Isti uzorci su bili negativni na prisustvo antigena svinjskog parvovirusa posle ispitivanja primenom metode imunofluorescencije. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je metoda ELISA osetljivija, specifičnija i brža za izvođenje od testa hemaglutinacije i metode imunofluorescencije. Balasch i sar., 1998. su vršili ispitivanja uzoraka cerebrospinalne tečnosti svinja na prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti primenom metoda izolacije virusa u ćelijskoj liniji PK-15 i PCR uz korišćenje prajmera za glikoprotein B (gB). Ogleadne svinje, od kojih su neke ranije bile vakcinisane protiv infekcije izazvane virusom Aujeckijeve bolesti su bile pojedinačno veštački inficirane različitim dozama virulentnog soja NIA-3 navedenog virusa. Neposredno pre žrtvovanja od ogleadnih i veštački inficiranih životinja su prikupljeni uzorci cerebrospinalne tečnosti koja je zatim ispitivana na prisustvom virusa primenom prethodno navedenih metoda. Izolacija virusa Aujeckijeve bolesti je izvršena iz samo jednog uzorka cerebrospinalne tečnosti, dok je primenom metode PCR virus identifikovan u najvećem broju uzoraka. Kod životinja koje su preživele akutnu fazu bolesti u uzorcima cerebrospinalne tečnosti nije ustanovljeno prisustvo virusa primenom metode PCR. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja utvrđeno je da se uzorci cerebrospinalne tečnosti ne mogu koristiti za otkrivanje prisustva virusne nukleinske kiseline kod latentno inficiranih životinja, odnosno da cerebrospinalna tečnost nije adekvatan uzorak koji bi se koristio u navedene svrhe. Bascunana i sar., 1997. su ispitivali prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti u uzorcima organa imunosupresivnih i neimunokompromitovanih životinja primenom metoda imunohistohemije, izolacije virusa u ćelijskoj liniji, odnosno metode PCR uz korišćenje prajmera za glikoproteine B, E i D (gB, gE i gD). Prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti je ustanovljeno primenom metode PCR u uzorcima trigeminalnih ganglija, olfaktornog bulbosa, tonzila i mozga. Iz navedenih uzoraka nije izvršena izolacija virusa, izuzev iz uzoraka poreklom od tri latentno inficirane svinje koje su služile kao pozitivna kontrola u ispitivanjima. Lukač i sar., 2016., su ispitali veći broj uzoraka poreklom od nevakcinisanih svinja na prisustvo svinjskog parvovirusa i svinjskog cirkovirusa 2 primenom metode izolacije virusa u ćelijskoj liniji. Nije izolovan ni jedan od navedenih virusa. U našim ispitivanjima u uzorcima poreklom od svinja nije

ustanovljeno prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti, niti prisustvo svinjskog parvovirusa u ćelijskim linijama PK-15 i SK-6. Posle inokulacije pozitivnih PCR uzoraka svinja u ćelijske linije PK-15 i SK-6 na prisustvo virusa PCV2, primenom metode PCR ustanovljeno je umnožavanje navedenog virusa u jednog uzorku inokulisanom u ćelijske linije. Ovde treba napomenuti da se umnožavanje svinjskog cirkovirusa tip 2 u inokulisanim ćelijskim linijama može utvrđivati metodom PCR imajući u vidu da navedeni virusa u ćelijskim linijama ne dovodi do ispoljavanja vidljivog citopatogenog efekta. Tokom sprovođenja ispitivanja Maes i sar., 1997. su uspostavili protokol za izvođenje metode PCR uz korišćenje prajmera za gC i gE. u cilju dokazivanja prisustva virusa Aujeckijeve bolesti kod latentno inficiranih životinja. Navedene životinje su bile pojedinačno vakcinisane sa jednom od nekoliko vakcina koje su sadržavale vakcinalne sojeve virusa koji u svom genom nisu sadržavali određene gene. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se PCR metoda može koristiti za sprovođenje programa eradikacije virusa Aujeckijeve bolesti iz zapata svinja i da se primenom navedene metode uz korišćenje odgovarajućih prajmera u uzorcima svinja može razlikovati prisustvo terenskih od vakcinalnih sojeva navedenog virusa. Soares i sar., 1999. su ispitali uzorke supernatnatne tečnosti poreklom od ćelijskih linija prethodno inokulisanih sojem NADL-2 svinjskog parvovirusa kao i uzorke organa svinja i pobačenih fetusa na prisustvo svinjskog parvovirusa. U ispitivanjima su korišćene metode PCR, nested-PCR, izolacije virusa u kulturi ćelija i testovi hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije. Od ukupno 24 uzorka, 9 uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo svinjskog parvovirusa primenom metode izolacije virusa u kulturi ćelija, dok je 18 uzoraka bilo pozitivno posle ispitivanja primenom metoda PCR i nested-PCR. U svim uzorcima u kojima je ustanovljeno prisustvo virusa primenom metode izolacije u kulturi ćelija je utvrđeno i prisustvo virusne nukleinske kiseline primenom metode PCR. Pet uzoraka koji su bili negativni posle ispitivanja primenom metode PCR je bilo pozitivno posle ispitivanja primenom metode nested PCR. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se molekularne metode PCR i nested PCR mogu uspešno koristiti za brzu i pouzdanu identifikaciju prisustva svinjskog parvovirusa u ispitivanim uzorcima. Huang i sar., 2004. su ispitali 58 uzoraka limfnih čvorova, pluća, tonzila i slezine prikupljenih od 24 praseta starosti od 4 do 8 nedelja primenom metode multiplex PCR. Svi navedeni uzorci su ispitani na prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti, svinjskog parvovirusa i svinjskih cirkovirusa. U ispitivanjima su korišćene molekularne metode PCR i multiplex PCR uz

korišćenje prajmera za glikoproteine G i E (virus Aujeckijeve bolesti), prajmera za NS-1 gen svinjskog parvovirusa, prajmera za ORF1 gen svinjskog cirkovirusa 1 i prajmera za ORF2 svinjskog cirkovirusa tip 2. Prisustvo infekcije izazvane virusom PCV2 je ustanovljeno kod 51,7% uzoraka, a virusom PCV1 kod 3,4% uzoraka. Infekcija izazvana virusom Aujeckijeve bolesti je utvrđena kod 1,7% uzoraka. Mešovita infekcija izazvana virusima PCV1/PCV2 je ustanovljena kod 13,8% uzoraka, odnosno virusima PCV2/virus Aujeckijeve bolesti kod 10,3% uzoraka. Mešovita infekcija izazvana virusima PCV2/PPV je utvrđena kod 5,1% uzoraka. Osam uzoraka je bilo negativno. U uzorcima poreklom od svih pet pobačenih fetusa ustanovljena je mešovita infekcija izazvana virusima PPV/PCV2 (tri uzorka slezine), odnosno virusima PCV2/virus Aujeckijeve bolesti (dva uzorka). Maldonado i sar., 2005. su ispitali 293 uzorka organa abortiranih fetusa i prevremeno rođene prasadi na prisustvo virusa PRRS, Aujeckijeve bolesti, PPV i PCV2 primenom metoda RT-PCR i PCR. Prisustvo virusa PRRS je ustanovljeno kod 9 uzoraka, odnosno virusa PCV2 kod jednog uzorka. Prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti i virusa PPV nije utvrđeno ni u jednom ispitanom uzorku. Primenom metode real-time PCR Chen i sar., 2009. su ispitali uzorke organa 80 fetusa poreklom iz nekoliko provincija na teritoriji Kine. Uopredo sa navedenom metodom, uzorci su ispitani i primenom metode PCR. Primenom metode PCR prisustvo virusne nukleinske kiseline je ustanovljeno kod 48 uzoraka od ukupno 80 ispitanih uzoraka. Isti uzorci svinja su bili pozitivni na prisustvo svinjskog parvovirusa i primenom metode real-time PCR. Dvanaest od ukupno 32 uzorka koja se bila negativna tokom ispitivanja primenom metode PCR su bila pozitivna posle ispitivanja primenom metode real-time PCR. Ogawa i sar., 2009. su primenom metoda multiplex PCR i multiplex RT-PCR ispitivali uzorke organa svinja na prisustvo nekoliko virusa između ostalih virusa PCV2, PPV i virusa Aujeckijeve bolesti. Ukupno je ispitano 75 uzoraka. Primenom metode multiplex PCR uz korišćenje odgovarajućih prajmera prisustvo virusa PCV2 (ORF1 prajmeri) je ustanovljeno kod 32 uzorka i svinjskog parvovirusa (VP2 prajmeri) kod 9 uzoraka. U uzorcima abortiranih fetusa prisustvo virusa PCV2 je ustanovljeno kod 9 uzoraka. Prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti nije ustanovljeno ni u jednom uzorku poreklom od svinja. Jiang i sar., 2010. su ispitali 76 uzoraka materijala poreklom od 49 prasadi starosti od 4 do 12 nedelja sa ispoljenim respiratornim i reproduktivnim kliničkim simptomima, kao i uzorke poreklom od 27 abortiranih fetusa. Svi uzorci su bili prikupljeni u periodu od 2006. do 2007.godine na području provincije Zheijiang u

Kini. Ispitivanje uzoraka je vršeno primenom metode multiplex PCR uz korišćenje odgovarajućih parova prajmera. Primenom navedene metode prisustvo virusa PCV2 je utvrđeno kod 31 uzorka, virusa klasične kuge svinja kod 14 uzoraka, virusa respiratornog i reproduktivnog sindroma svinja kod 21 uzorka i svinjskog parvovirusa kod 5 uzoraka. Mešovita infekcija izazvana PCV2/PPV virusima je ustanovljena kod dva uzorka, virusima PCV2/PRRS kod 14 uzoraka, virusima PCV2/klasične kuge svinja kod 5 uzoraka, virusima PRRS/klasične kuge svinja kod dva uzorka i virusima PCV2/PRRS/klasične kuge svinja kod tri uzorka. Liu i sar., 2013. su ispitali 58 uzoraka organa svinja i 24 uzorka organa abortiranih fetusa poreklom sa 20 farmi u provinciji Fujian, Kina na prisustvo virusa PRRS, klasične kuge svinja i svinjskog cirkovirusa 2 primenom metoda PCR, RT-PCR i multiplex PCR. Mešovita infekcija izazvana virusima PRRS i klasične kuge svinja je ustanovljena kod 12,19% uzoraka, virusima PRRS i PCV2 kod 21,95% uzoraka, klasične kuge svinja i PCV2 kod 13,41% uzoraka i sa sva tri virusa kod 3,66% ispitanih uzoraka. Zheng i sar., 2013. su ispitali 126 uzoraka na prisustvo navedenih virusa primenom metoda duplex real-time PCR i PCR. Prisustvo prve navedene metode 70 uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo nukleinske kiseline svinjskog parvovirusa, dok je 77 uzoraka bilo pozitivno na prisustvo virusa PCV2. Primenom metode PCR 60 uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo svinjskog parvovirusa, dok je 68 uzoraka bilo pozitivno na prisustvo virusa PCV2. Podudaranje rezultata ispitivanja za oba virusa primenom ove dve molekularne metode je iznosilo 98,4%. Xiao i sar., 2013. su u cilju ispitivanja prisustva svinjskog parvovirusa 2 kod svinja na teritoriji SAD koristili metodu real-time PCR. Ukupno je navedenom metodom ispitano 483 uzorka pluća i 183 uzorka fecesa, odnosno 122 uzorka krvnog seruma koji su prikupljeni sa 295 farme u 18 država SAD. Prisustvo svinjskog parvovirusa je ustanovljeno kod 100 uzoraka pluća i 14 uzoraka fecesa poreklom od životinja različitih starosnih kategorija. Metodom direktnog sekvenciranja ustanovljeno je da su nukleotidne sekvence američkih sojeva svinjskog parvovirusa imale visok stepen sličnosti (95.4-97.7%) sa kineskim sojevima virusa, odnosno 94.7% sličnosti sa sojevima navedenog virusa utvrđenih kod svinja na teritoriji Mjanmara. Opriessnig i sar., 2014. su ispitali 586 uzoraka krvnog seruma i 164 uzorka homogenizata pluća koji su prikupljeni od 1996. godine do 2013.godine na teritoriji SAD i Kanade na prisustvo svinjskog parvovirusa i cirkovirusa svinja tipa 2. Uzorci su ispitani primenom metoda PCR. Prisustvo svinjskog cirkovirusa 2 je utvrđeno kod 162 uzorka, a

svinjskog parvovirusa kod 286 uzoraka od ukupno ispitanih uzoraka seruma. Prisustvo svinjskog cirkovirusa tip 2 je ustanovljeno kod 129 uzoraka pluća, a svinjskog parvovirusa kod 93 uzorka.. Mešovita infekcija izazvana svinjskim cirkovirusom tip 2 i svinjskim parvovirusom je utvrđena kod 84 uzorka seruma i 81 uzorka pluća. Prisustvo navedenih virusa je bilo češće u uzorcima poreklom od obolelih životinja u odnosu na subklinički inficirane životinje. Lukač i sar., 2016. su primenom metode PCR ispitali 40 uzoraka organa poreklom od svinja sa teritorije Republike Srpske. Prisustvo virusa PPV je ustanovljeno kod pet uzoraka limfnih čvorova, dok je virus PCV2 identifikovan kod 6 uzoraka. U našim ispitivanjima primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR) uz korišćenje prajmera za glikoprotein B (gB) virusa izvršeno je pojedinačno ispitivanje osamdeset zbirnih uzoraka organa (limfni čvorovi, slezina) i isto toliko uzoraka sakralnih ganglija nevakcinisanih svinja različitih starosnih kategorija poreklom iz različitih delova Republike Crne Gore. Kod jednog zbirnog uzorka organa i dva uzorka sakralnih ganglija utvrđeno je prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti. Pojedinačnim ispitivanjem pozitivnog zbirnog uzorka (limfni čvorovi, slezina) ustanovljeno je prisustvo nukleinske kiseline navedenog virusa u uzorku limfnog čvora. Pozitivni uzorci na prisustvo virusa bili su poreklom od tri različite svinje. Prikupljeni uzorci svinja, ukupno 80 zbirnih uzoraka, ispitani su i na prisustvo svinjskog parvovirusa primenom metode PCR uz korišćenje prajmera za deo VP2 gena navedenog virusa. , Prisustvo nukleinske kiseline svinjskog parvovirusa utvrđeno je kod 10 zbirnih uzoraka organa svinja, odnosno kod 12,5% ispitanih uzoraka. Pojedinačnim ispitivanjem pozitivnih zbirnih, prisustvo virusa je ustanovljeno kod osam uzoraka limfnih čvorova i dva uzorka slezina poreklom od različitih svinja. Zbirni uzorci organa svinja, prethodno ispitani na prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti i svinjskog parvovirusa, ispitani su i na prisustvo nukleinske kiseline svinjskog cirkovirusa tip 2 primenom metode PCR uz korišćenje prajmera za deo ORF1 regiona genoma navedenog virusa. Kod devet zbirnih uzoraka svinja ustanovljeno je prisustvo nukleinske kiseline svinjskog cirkovirusa tip 2. Pojedinačnim ispitivanjem pozitivnih zbirnih uzoraka svinja, utvrđeno je prisustvo virusa PCV2 kod sedam uzoraka limfnih čvorova i dva uzorka slezina poreklom od različitih svinja. Mešovita infekcija svinja izazvana virusom Aujeckijeve bolesti i svinjskim parvovirusom utvrđena je kod jednog ispitnog uzorka limfnog čvora svinja. Prisustvo svinjskog parvovirusa i svinjskog cirkovirusa tip 2 je utvrđeno kod tri zbirna uzorka poreklom od različitih svinja. Pojedinačnim ispitivanje zbirnih uzoraka na

prisustvo oba navedena virusa ustanovljeno je prisustvo nukleinskih kiselin virusa kod tri uzorka limfnih čvorova. Molekularnu karakterizaciju sojeva virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih na teritoriji Brazila su izvršili Fonseca i sar., 2010. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da su sojevi virusa Aujeckijeve bolesti poreklom sa teritorije Brazila svrstani u dva klastera A i B. Međutim, ovde ipak treba naglasiti da najveći broj identifikovanih sojeva navedenog virusa pripada klasteru B navedenog virusa. Takođe, tokom ispitivanja je ustanovljeno da se brazilski sojevi virusa značajno genetski razlikuju od sojeva virusa identifikovanih u drugim delovima sveta. Serena i sar., 2011. su upoređivali sekvence sojeva virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih kod svinja na području Argentine sa referentnim sojevima virusa i sojevima virusa čije su analogne nukleotidne sekvence objavljene u genskoj bazi podataka. Za preliminarno grupisanje sojeva virusa Aujeckijeve bolesti je korišćena nukleotidna sekvenca dela gena koji kodira sintezu glikoproteina E navedenog virusa. Svrstavanje izolovanih sojeva virusa u genotipove je izvršeno primenom metode direktnog sekvenciranja tokom koje je određivan redosled dela gena koji kodira sintezu glikoproteina C. Dobijeni rezultati su potvrdili da sojevi virusa Aujeckijeve bolesti izolovani kod svinja na teritoriji Argentine pripadaju genotipu I virusa. Za ovaj genotip je tokom ispitivanja ustanovljeno da je dominantno prisutan na teritoriji Argentine. Sojevi virusa Aujeckijeve bolesti koji su pripadali genotipu I su na filogenetskom stablu grupisani zajedno sa američkim i brazilskim sojevima virusa. Pored ovoga, dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili i to da sojevi Yamagat S-81 i Mer su grupisani zajedno i pripadaju genotipu II. Rita de Cassia da Silva Paes i sar., 2013. su ispitivali prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Aujeckijeve bolesti u uzorcima divljih svinja poreklom iz oblasti Pantanal u Brazilu. Ispitivanja su vršena primenom metode ELISA i serum neutralizacije (SN test). Od ukupno 218 uzoraka seruma, prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Aujeckijeve bolesti je ustanovljeno primenom metode ELISA kod 88 ispitanih uzoraka, dok je primenom SN testa njihovo prisustvo ustanovljeno kod 57 uzoraka. Primenom metode PCR uz korišćenje prajmera za glikoprotein B prisustvo nukleinske kiseline virusa Aujeckijeve bolesti je ustanovljeno kod 5 od ukupno 104 uzorka. Primenom metode PCR uz korišćenje prajmera za glikoprotein E, prisustvo virusa je ustanovljeno kod 12 ispitanih uzoraka. Genotipizacija identifikovanih virusa, odnosno određivanje pripadnosti određenom genotipu virusa Aujeckijeve bolesti je izvršena metodom sekvenciranja. U ispitivanjima je izvršeno određivanje redosleda nukleotida dela UL56

gena i njegovo poređenje sa sekvencama nukleotida navedenog glikoproteina drugih sojeva virusa koji su objavljeni u okviru genske baze podataka. Izrada filogenetskog stabla je vršena posle izvođenja metode sekvenciranja dela gena za glikoprotein C. Uvidom u filogenetsko stablo je utvrđeno da sojevi poreklom od divljih svinja se nisu grupisali zajedno sa izolatima poreklom od domaćih svinja. Rezultati ispitivanja su pokazali da su dobijene sekvence virusa Aujeckijeve bolesti poreklom od divljih svinja sa teritorije Brazila grupisane zajedno sa sojevima virusa identifikovanim na teritorijama Nemačke, Austrije, Slovačke i Mađarske i da pripadaju genotipu I virusa. Sara Verpoest i sar., 2014. su izvršili molekularnu karakterizaciju devet arhiviranih sojeva virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih na teritoriji Belgije pre 1990. godine i pet sojeva navedenog virusa utvrđenih kod divljih svinja na teritorijama Belgije i Luksemburga tokom 2006.godine. Molekularna karakterizacija navedenih sojeva je izvršena primenom RFLP analize i filogenetske analize. Filogenetskom analizom svi sojevi navedenog virusa izolovani kod divljih svinja su svrstani u kladu A i kladu B, dok su svi sojevi virusa Aujeckijeve bolesti izolovani kod domaćih svinja svrstani u kladu A. Na zajedničkom filogenetskom stablu sojeva virusa Aujeckijeve bolesti izolovanih kod domaćih i divljih svinja može se uočiti da postoje izolati koji imaju identične nukleotidne sekvence, a prisutni su i kod divljih i kod domaćih svinja. Imajući ovo u vidu, autori smatraju da postoji opravdan rizik od ponovne pojave infekcije izazvane sojevima virusa Aujeckijeve bolesti u populaciji domaćih svinja koja bi bila izazvana sojevima virusa prisutnim u populaciji divljih svinja. U našim ispitivanjima primenom metode direktnog sekvenciranja po Sanger-u izvršeno je određivanje redosleda nukleotida dela gena koji kodiraju sintezu glikoproteina B (gB) spoljašnjeg omotača tri identifikovana virusa Aujeckijeve bolesti. Rezultati ispitivanja su pokazali da je redosled sekvenci nukleotida dela gB gena kod sva tri identifikovana virusa poreklom od svinja sa teritorije Crne Gore bio identičan (100% sličnosti između analognih nukleotidnih sekvenci). Nukleotidne sekvence gB gena virusa Aujeckijeve bolesti identifikovanih u uzorcima svinja poreklom iz Crne Gore imale su 100% sličnosti sa analognim sekvencama sojeva Kaplan (JF797218.1) i Bartha (JF797217.1) poreklom iz Mađarske, zatim sojeva Kolchis (KT983811.1) i Hercules (KT983810.1) poreklom iz Grčke (Velika Britanija, izolovani u Grčkoj), odnosno sa nukleotidnim sekvencama sojeva NIA3 (KU900059.1) poreklom iz Velike Britanije i Becker (JF797219.1) poreklom iz SAD. Na osnovu rezultata izvršene filogenetske analize ustanovljeno je da virusi Aujeckijeve bolesti

identifikovani kod svinja na teritoriji Crne Gore pripadaju genotipu I navedenog virusa. Sojevi virusa prikazani na filogenetskom stablu poreklom iz Kine pripadaju genotipu II virusa Aujeckijeve bolesti. Shangjina i sar., 2009. su bliže ispitali evoluciju i filogeniju svinjskog parvovirusa. U navedene svrhe vršena je molekularna analiza NS1 i VP1/VP2 gena sojeva BQ i ZJ navedenog virusa izolovanih u Kini. Nukleotidne sekvence NS1 i VP1/VP2 gena navedenih sojeva virusa su upoređivane sa istim sekvencama sojeva svinjskog parvovirusa koje su dostupne u banci gena. Na osnovu dobijenih nukleotidnih sekvenci NS1 i VP1/VP2 gena formirano je filogenetsko stablo uz korišćenje i drugih identičnih analognih nukleotidnih sekvenci sojeva virusa dostupnih u banci gena. Na ovaj način je određen položaj kineskih sojeva virusa na filogenetskom stablu u odnosu na druge sojeve, odnosno stepen srodnosti BQ i ZJ sojeva virusa sa drugim sojevima svinjskog parvovirusa prisutnih kod životinja u različitim krajevima sveta. Cadar i sar., 2012. su ispitali uzorke limfnih čvorova, pluća, slezine, jetre, bubrega i tonzila divljih svinja koji su prikupljeni tokom sezona lova u periodu od 2006.godine do 2011. godine. Uzorci organa bili su poreklom od ukupno 842 divlje svinje poreklom iz 315 lovišta. Uzorci organa poreklom od ukupno 120 životinja sa 10 različitih farmi domaćih svinja su takođe ispitivani u cilju komparativne genetske karakterizacije. Uzorci poreklom od domaćih i divljih svinja su ispitivani primenom metode PCR uz korišćenje odgovarajućih prajmera za VP1 i VP2 gene virusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je od ukupno 842 ispitana uzorka divljih, 44 je bilo pozitivno na prisustvo nukleinske kiseline, dok je 1 uzorak poreklom od domaćih svinja bio pozitivan na navedeni virus. Filogenetska analiza je pokazala da su sojevi parvovirusa svinja poreklom od domaćih i divljih životinja mogu grupisati u šest grupa na osnovu kompletne sekvence VP1/VP2 gena i u osam grupa na odnosu parcijalne VP1/VP2 sekvence. Rezultati filogenetske analize su pokazali da su sojevi parvovirusa svinja kod divljih životinja su delimično genetski različiti u odnosu na sojeve navedenog virusa ustanovljene kod domaćih svinja. Sojevi parvovirusa poreklom od domaćih svinja su na osnovu parcijalne VP1/VP2 sekvence nukleotida svrstani u klaster H, dok su sojevi virusa poreklom od divljih svinja svrstani u klastere A, B, C, D i E. Ren i sar., 2013. su dokazali da su sojevi svinjskog parvovirusa imali zajedničkog pretka pre oko 250 godina. Tri glavne grupe virusa I,II i III su identifikovane izradom filogenetskog stabla. Prva grupa sojeva virusa se odvojila pre 153 godine i nju su svrstani 4 evropska soja, 4 američka soja i 9 azijskih sojeva navedenog virusa. Druga

grupa sojeva vodi poreklo od pre 157 godina i u nju su svrstani 1 kineski soj i 13 evropskih sojeva. Treća grupa sojeva virusa vodi poreklo od pre 114 godina. Xu i sar., 2013. su ispitali virulentni soj NE/09 svinjskog parvovirusa koji je izolovan iz uzoraka poreklom od mumifikovanog fetusa svinje sa farme koja se nalazila u provinciji Jilin, Kina. Autori su izvršili molekularnu analizu navedenog soja virusa i to nukleotidne sekvence VP2 gena. Analiza nukleotidne sekvence VP2 gena soja NE/09 svinjskog parvovirusa i pokazala je sličnost sa analognim nukleotidnim sekvencama drugih sojeva navedenog virusa. Na osnovu rezultata filogenetske analize sekvence VP2 gena je ustanovljeno da je soj NE/09 novi soj svinjskog parvovirusa preovlađujuće prisutan na teritoriji Kine. Lukač i sar., 2016. su izvršili molekularnu karakterizaciju svinjskih parvovirusa identifikovanih kod svinja na teritoriji Republike Srpske. Identifikovani svinjski parvovirusi su imali visok stepen sličnosti sa sojevima Challenge izolovanim od svinja na teritoriji UK, zatim sojem Kresse poreklom iz SAD, odnosno sojevima 77 I LZ izolovanim od svinja na teritoriji Kine. U našim ispitivanjima primenom metode direktnog sekvenciranja po Sanger-u izvršeno je određivanje redosleda nukleotida dela VP2 gena pet odabranih svinjskih parvovirusa identifikovanih u uzorcima organa svinja poreklom sa teritorije Crne Gore. Pet odabranih svinjskih parvovirusa za izvođenje metode direktnog sekvenciranja bila su identifikovana u uzorcima svinja gajenih u različitim geografskim, područjima Crne Gore. Dobijeni rezultati ispitivanja primenom metode direktnog sekvenciranja po Sanger-u su pokazali da su nukleotidne sekvence pet svinjskih parvovirusa identifikovanih kod svinja u Crnoj Gori između sebe bile identične, odnosno identične sa analognim sekvencama soja Challenge (KF049426.1) poreklom iz Velike Britanije, zatim sojeva svinjskog parvovirusa 77 (KP245936.1) i LZ (HM627653.1) poreklom iz Kine i sojem Kresse (U44978.1) poreklom iz SAD. Iz tog razloga virusi identifikovani kod svinja na teritoriji Crne Gore su zajedno sa navedenim sojevima virusa iz drugih delova sveta na filogenetskom stablu grupisani zajedno u jednu monofiletsku grupu. Pored ovoga, filogenetskom analizom dela VP2 gena pet identifikovanih svinjskih parvovirusa je ustanovljeno da su isti svrstani u klaster E navedenog virusa zajedno sa sojevima svinjskog parvovirusa 77 (KP245936.1) poreklom iz Kine, sojevima S31 VP1/VP2 (FJ643431.1) i S30 VP1/VP2 (FJ6463430.1), 32-96 (AY145472.1) i 142-94 (AY145474.1) poreklom sa teritorije Brazila i sojevima Challenge (KF049426.1) poreklom iz Velike Britanije i Kresse (U44978.1) poreklom iz SAD. Ostali sojevi virusa 05-95 (AY145488),

155-95 (AY145493), 164-95 (AY145494) i 13-97 (AY145492) svi poreklom od domaćih svinja iz Brazila svrstani su zasebno u klaster H svinjskog parvovirusa. Perez i sar., 2010. su u ispitivanjima koristili šest sekvenci virusa PCV2 identifikovanih u tkivima svinja sa kliničkim simptomima infekcija respiratornog sistema i znacima gubitka telesne težine. Uzorci su bili poreklom od svinja iz šest zapata iz četiri različita geografska područja na teritoriji Kube. Metodom direktnog sekvenciranja je ustanovljen visok stepen sličnosti između nukleotidnih sekvenci svih šest sojeva virusa PCV2 koji se kretao od 99.15% do 100%. Filogenetskom analizom je potvrđeno da pet identifikovanih sojeva virusa PCV2 ima vrlo visokm stepen sličnosti sa sojevima navedenog virusa identifikovanih na teritoriji Kanade, dok je jedan kubanski soj virusa imao visok stepen sličnosti sa sojevima virusa poreklom iz Danske, Austrije, Holandije, Francuske, Brazila i Rumunije. Shen i sar., 2010. su vršili prikupljanje uzoraka krvnog seruma svinja iz 5 komercijalnih zapata kao i uzoraka kolostralnog seruma. Takođe, vršeno je prikupljanje uzoraka krvi prasadi pre početka sisanja. Uzorci su ispitani na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa PCV2 kao i na prisustvo virusne DNK. Kod 69.5% uzoraka seruma krmača, 84.3% uzoraka kolostruma krmača i 74.4% uzoraka seruma prasadi je utvrđen PCV2b genotip virusa PCV2, dok je kod 18.6% uzoraka seruma krmača, 9.8% uzoraka kolostruma krmača i 15.6% uzoraka seruma prasadi ustanovljeno je prisustvo PCV2a genotipa virusa. Mešovita infekcija izazvana sa oba genotipa virusa je ustanovljena kod 11.9% uzoraka seruma krmača, 5.9% uzoraka kolostruma i 10% uzoraka seruma prasadi. Dobijeni rezultati ispitivanja su prilog poznavanju karakteristika infekcije izazvane virusom PCV2 u komercijalnim zapatima svinja. Henriques i sar., 2011. su izvršili molekularnu i filogenetsku analizu 22 od ukupno 79 virusa PCV2 identifikovanih u uzorcima poreklom od domaćih svinja u period od 2003. do 2010. godine na teritoriji Portugala. Tokom ispitivanja primenom metode direktnog sekvenciranja celi genomi 22 soja virusa PCV2 su amplifikovani i sekvencirani. Između nukleotidnih sekvenci ustanovljen je visok stepen sličnosti koji se kretao od 94% do 99%. Najveći broj sojeva je pripadao genotipu PCV2b, dok je šest sojeva pripadalo genotipu PCV2a. Ova ispitivanja su izvršena kroz analizu cap i rep gena virusa PCV2. Dobijeni rezultati su pokazali i da je filogenetska analiza cap gena pouzdana alternativa filogenetskoj analizi celog genoma navedenog virusa. Vlasakova i sar., 2011. su ispitali ukupno 120 uzoraka poreklom od svinja, starosti između 6 i 24 nedelje poreklom sa 28 farmi iz šest od osam geografskih područja

Slovačke u period od 2005. do 2009.godine. Tokom ispitivanja identifikovano je prisustvo virusa PCV2 kod 77 ispitanih uzoraka. Metodom direktnog sekvenciranja je izvršeno sekvenciranja celog ORF2 gena tri odabrana soja virusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da tri identifikovana soja virusa PCV2 poreklom od svinja sa teritorije Slovačke pripadaju genotipovima PCV2a (jedan soj) i PCV2b (dva soja virusa). Pored ovoga, dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da su izolati virusa PCV2 su genetički stabilni i slični sa sojevima virusa poreklom iz Centralne i Zapadne Evrope. Ramos i sar., 2013. su koristili uzorke praseta koja su bila poreklom iz dva zapata svinja na teritoriji Urugvaja. Dva praseta ispoljavala su ispoljavala kliničke simptome cirkovirusne infekcije, dok kod trećeg praseta nisu ustanovljeni klinički simptomi bolesti. Molekularna karakterizacija identifikovanih sojeva virusa je izvršena na osnovu cap (ORF2) i rep gena (ORF1). Molekularna analiza nukleotidne sekvence cap gena je pokazala visok stepen sličnosti između sojeva virusa PCV2 poreklom iz Urugvaja koji je iznosio 99.7%. Nukleotidne sekvence urugvajskih izolata virusa PCV2 su takođe pokazale visok stepen sličnosti sa dva soja navedenog virusa poreklom iz Brazila koji je iznosio od 99.8% do 100%. Takođe, urugvajski izolati virusa su imali visok stepen sličnosti i sa argentiskim izolatima virusa koji se kretao od 99.1% do 99.5%. Argentinski sojevi virusa su opet imali visok stepen sličnosti sa sojevima virusa PCV2 poreklom iz Francuske, Kube, Kanade i SAD. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da sva tri soja virusa PCV2 pripadaju genotipu PCV2b virusa i da je ovaj genotip virusa dominantno prisutan na teritoriji Urugvaja i Južne Amerike. Urugvajski izolati virusa imali su niži stepen sličnosti sa sojevima virusa koji pripadaju genotipu PCV2c (od 90.1-90.7%), odnosno niži stepen sličnosti sa virusima koji pripadaju genotipu PCV2d. Wei i sar., 2013. su ispitali 66 sojeva virusa PCV2 poreklom sa teritoriji Kine. Uzorci u kojima je izvršena identifikacija virusa prikupljeni su od svinja tokom 2011. i 2012.godine sa 14 komercijalnih farmi svinja u provinciji Guandong, južna Kina. Dobijeni rezultati sekvenciranja celog ORF2 gena virusa PCV2 su pokazali da 66 sojeva pripada genotipovima PCV2a (pet sojeva) i PCV2b (61 soj), ukazujući na to da je genotip PCV2b predominantan na teritoriji Južne Kine. Pored ovoga, dobijeni rezultati su dali doprinos upoznavanju epidemiološke situacije vezane za virusa PCV2 na području Južne Kine. Franzo i sar., 2015. su ispitali 96 uzoraka organa i krvnog seruma svinja pozitivnih tokom ranijih ispitivanja na prisustvo virusa PCV2. Uzorci su bili poreklom sa 39 farmi iz 11 italijanskih provincija. Posle ekstrakcije virusne DNK iz arhiviranih uzoraka, za

dalja ispitivanja uzoraka su korišćene metode PCR i direktnog sekvenciranja. Na osnovu filogenetske analize sekvence ORF2 gena virusa PCV2 ustanovljeno je da su na teritoriji Italije kod svinja prisustna tri genotipa navedenog virusa PCV2a, PCV2b i PCV2d. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili i da je genotip PCV2b najzastupljeniji kod svinja na teritoriji navedene države. Lukač i sar., 2016. su primenom metode direktnog sekvenciranja i filogenetskom analizom izvršili molekularnu karakterizaciju svinjskih cirkovirusa 2 identifikovanih kod svinja na teritoriji Republike Srpske. Svi identifikovani PCV2 virusi pripadali su genotipu PCV2c navedenog virusa. U našim ispitivanjima primenom metode direktnog sekvenciranja po Sanger-u određen je redosled nukleotida dela ORF1 regiona genoma svinjskog cirkovirusa 2 šest odabranih svinjskih cirkovirusa tip 2 identifikovanih kod svinja na teritoriji Crne Gore. Odabrani virusi su bili poreklom iz različitih geografskih područja Crne Gore. Nukleotidne sekvence pet svinjskih cirkovirusa tip 2 identifikovanih kod svinja na teritoriji Crne Gore (MNE 3RM, MN3 8/11, MNE 1, MNE 2 i MNE 5) su imale visok stepen sličnosti (100%) sa analognim nukleotidnim sekvencama sojeva Treviso (KP231172.1) izolovanim kod svinja u Italiji, NIVS 3 (HQ378160.1) i NIVS 5 (HQ378159.1) identifikovanim kod svinja u Srbiji, zatim sojevima Aust3959 (EU886637.1), AUT4 (AY424404.1), AUT5 (AY424405.1) poreklom iz Austrije, odnosno sojevima YJ (HM038032.1) i Xt2008 (KM624032.1) poreklom od svinja sa teritorije Kine. Na osnovu filogenetske analize nukleotidnih sekvenci dela ORF1 regiona genoma virusa PCV2 identifikovanih kod svinja sa teritorije Crne Gore i analognih sekvenci nukleotida sojeva navedenog virusa iz drugih delova sveta ustanovljeno je da pet virusa PCV2 poreklom iz Crne Gore pripadaju genotipu PCV2b. Nukleotidna sekvenca jednog svinjskog cirkovirusa tip 2 imala je visok stepen sličnosti (100%) sa analognim sekvencama sojeva Mantova (KP231140.1) izolovanim kod svinja u Italiji, zatim sojevima DE222-13 (KP698398.1) poreklom iz Nemačke i JVNAN (KP313254.1) identifikovanim kod svinja u Kini. Na osnovu uporedne analize nukleotidnih sekvenci jednog svinjskog cirkovirusa tip 2 identifikovanog kod svinja na teritoriji Crne Gore (MNE 6) i analognih sekvenci nukleotida prethodno navedenih sojeva virusa poreklom iz Italije, Nemačke i Kine ustanovljeno je da se isti na filogenetskom stablu grupišu zajedno i da pripadaju genotipu PCV2c navedenog virusa.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja izvedeni su sledeći zaključci:

1. Primenom metode lančane reakcije polimeraze utvrđeno je prisustvo nukleinske kiseline virusa Aujeckijeve bolesti u tri ispitivana uzorka, svinjskog parvovirusa u 10 uzoraka i svinjskog cirkovirusa tip 2 u 9 uzoraka.
2. Na ćelijskim linijama PK15 i SK-6 nisu izolovani virus Aujeckijeve bolesti i svinjski parvovirus, dok je umnožavanje jednog svinjskog cirkovirusa tip 2 u ćelijskoj liniji PK-15 ustanovljeno primenom metode PCR.
3. Mešovita infekcija svinja izazvana virusom Aujeckijeve bolesti i svinjskim parvovirusom utvrđena je kod jedne svinje, a parvovirusom svinja i svinjskim cirkovirusom tip 2 kod tri životinje.
4. Nukleotidne sekvence tri virusa Aujeckijeve bolesti bile su identične analognim sekvencama nukleotida sojeva virusa poreklom iz Mađarske, Grčke i SAD. Filogenetska analiza uz primenu Neighbor-joining, Maximum likelihood i Maximum parsimony metoda je pokazala da sva tri virusa identifikovana kod svinja na teritoriji Crne Gore pripadaju genotipu 1.
5. Nukleotidne sekvence pet odabranih svinjskih parvovirusa identifikovanih kod svinja u Crnoj Gori bile su identične sa analognim sekvencama sojeva virusa poreklom iz Velike Britanije, Kine, Brazila i SAD.
6. Filogenetskom analizom uz primenu Neighbor-joining, Maximum likelihood i Maximum parsimony metoda je utvrđeno da identifikovani parvovirusi svinja poreklom iz Crne Gore i sojevi virusa poreklom iz Velike Britanije, Kine, Brazila i SAD pripadaju istoj monofiletskoj grupi, odnosno da pripadaju klasteru E navedenog virusa.
7. Nukleotidne sekvence pet svinjskih cirkovirusa tip 2 identifikovanih kod svinja u Crnoj Gori bile su identične analognim sekvencama sojeva virusa poreklom iz Italije, Srbije, Austrije i Kine, dok je nukleotidna sekvenca jednog identifikovanog virusa kod svinja u Crnoj Gori bila identična sa sekvencama sojeva virusa PCV2 poreklom iz Italije, Nemačke i Kine.

8. Filogenetskom analizom uz primenu Neighbor-joining, Maximum likelihood i Maximum parsimony metoda utvrđeno je da pet virusa PCV2 identifikovanih kod svinja u Crnoj Gori pripada genotipu PCV2b, odnosno da jedan identifikovani virus pripada genotipu PCV2c.

8. SPISAK LITERATURE

1. C.S. Choi, T.W. Molitor, H.S. Joo, R. Gunther: Patogenicity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses. *Veterinary Microbiology*, 15, 19-29, 1987.
2. F. Westernbrink, M.A. Veldhuis, J.M.A. Brinkhof: An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to porcine parvovirus. *Journal of virological methods*, 23, 169-178, 1989.
3. Roger K. Maes, Christopher E. Beisel, Stephen J. Spatz and Brad J. Thacker: Polymerase chain reaction amplification of pseudorabies virus DNA from acutely and latently infected cells. *Veterinary Microbiology*, 24, 281-295, 1990.
4. T.W.Molitor, K. Oraveeraku, Q.Q. Zhang, C.S. Choi and L.R. Ludemann: Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus. *Journal of Virological Methods*, 32, 201-211, 1991.
5. C.E.Jenkins: An enzyme – linked immunosorbent assay for detection of porcine parvovirus in fetal tissues. *Journal of Virological Methods*, 39, 179-184, 1992.
6. Gail Sherba, Linga Jin, William M. Schnitylein and Michael H. Vodkin: Differential polymerase chain reaction for detection of wild-type and vaccine strain of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. *Journal of Virological Methods*, 38, 131-144, 1992.
7. Kiyoyasu Ishikawa, Mariko Jin-yama, Akito Saitoh, Masami Takagi, Masatake Muramatsu, Osamu Itoh: Differentiation between glycoprotein III gene-deleted vaccine and wild-type strains of pseudorabies virus by polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Virological Methods*, 51, 267-276, 1995.
8. C. Ros Bascunana, L. Bjornerot, A. Ballagi-Pordany, J-A.Robertsson, S. Belak: Detection of pseudorabies virus genomic sequences in apparently uninfected “single reactor” pigs. *Veterinary Microbiology*, 55, 37-47, 1997.
9. Capua, C. Casaccia, G. Calzetta, V. Caporale: Characterization of Aujeszky disease viruses isolated from domestic animals and from a wild boar (*Sus Scrofa*) in Italy between 1972 and 1995. *Veterinary Microbiology*, 51, 143-149, 1997.

10. Roger K. Maes, Michael D. Sussman, Aivars Vilnis, Brad J. Thacker: Recent developments in latency and recombination of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. *Veterinary Microbiology*, 55, 13-27, 1997.
11. Monte B. McCaw, Fernando A. Osorio, Judy Wheeler, Jinsheng Xu, Gene A. Erickson: Effect of maternally acquired Aujeszky ' s disease (pseudorabies) virus-specific antibody in pigs on establishment of latency and seroconversion to differential glycoproteins after low dose challenge. *Veterinary Microbiology*, 55, 91-98, 1997.
12. M Balasch, J. Pujols, J. Segales, M. Pumarola: Aujeszky disease (pseudorabies) virus detection in cerebrospinal fluid in experimentally infected pigs. *Veterinary Microbiology*, 60, 99-106, 1998.
13. Aivars Vilnis, Michael D. Sussman, Brad J. Thacker, Michael Senn, Roger K. Maes: Vaccine genotype and route of administration affect pseudorabies field virus latency load after challenge. *Veterinary Microbiology*, 62, 81-96, 1998.
14. E. Sozzi, A. Moreno, D. Lelli, S. Cinotti, G.L. Alborali, A. Nigrelli, A. Luppi, M. Bresaola, A. Catella and P. Cordioli: Genomic characterization of Pseudorabies virus strains isolated in Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, doi:10.1111/tbed.12038.
15. R. Larochelle, M. Antaya, M. Morin, R. Magar: Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods*, 80, 69-75, 1999.
16. Rodrigo M. Soares, Edison L. Durigon, Josete G. Bersano, Leonardo J. Richtzenhain: Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *Journal of virological methods*, 78, 191-198, 1999.
17. W.L. Mengeling, K.M. Lager, A.C. Vorwald: The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 199-210, 2000.
18. Junghyun Kim, Dong Un Han, Changsun Choi, Chanhee Chae: Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 98, 25-31, 2001.

19. J. Ellis, E. Clark, D. Haines, K. West, S. Krakowka, S. Kennedy, G.M. Allan: Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Veterinary Microbiology*, 98, 159-163, 2004.
20. Chienjin Huang, Jui-Jung Hung, Ching-Ying Wu, Maw-Sheng Chien: Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses. *Veterinary Microbiology*, 101, 209-214, 2004.
21. J. Maldonado, J. Segales, D. Martinez-Puig, M. Calsamiglia, P. Riera, M. Domingo, C. Artigas: Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. *The Veterinary Journal*, 169, 454-456, 2005.
22. Shan Yu, Susan Carpenter, Tanja Opriessnig, Patrick G. Halbur, Eileen Thacker: Development of a reverse transcription-PCR assay to detect porcine circovirus type 2 transcription as a measure of replication. *Journal of Virological Methods*, 123, 109-112, 2005.
23. Caprioli, F. McNeilly, I. McNair, P. Lagan-Tregaskis, J. Ellis, S. Krakowka, J. McKillen, F. Ostanello, G. Allan: PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal swabs from experimentally infected pigs. *Research in Veterinary Science*, 81, 287-292, 2006.
24. Josefina Quintana, Joaquim Segales, Maria Calsamiglia, Mariano Domingo: Detection of porcine circovirus type 1 in commercial pig vaccines using polymerase chain reaction. *The Veterinary Journal*, 171, 570-573, 2006.
25. Sonja Wilhelm, Pia Zimmermann, Hans Joachim Selbitz, Uwe Truyen: Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *Journal of Virological Methods*, 134, 257-260, 2006.
26. Dong-Jun An, In-Soon Roh, Dae-Sub Song, Choi-Kyu Park, Bong-Kyun Park: Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006, 129, 115-122, 2007.
27. N. Pal, Y.W. Huang, D.M. Madson, C. Kuster, X.J. Meng, P.G. Halbur, T. Opriessnig: Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of porcine circovirus type 2 and an internal control on porcine semen samples. *Journal of Virological Methods*, 149, 217-225, 2008.

28. Hong-Ying Chen, Xiao-Kang Li, Bao – An Cui, Zhan – Yong Wei, Xin – Sheng Li, Yan-Bin Wang, Li Zhao, Zhen – Ya Wang: A TaqMan – based real-time polymerase chain reaction for the detection of porcine parvovirus. *Journal of Virological Methods*, 156, 84-88, 2009.
29. Kathleen A. McIntosh, Anju Tumber, John C.S. Harding, Steven Krakowka, John A. Ellis, Janet E. Hill: Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues. *Veterinary Microbiology*, 133, 23-33, 2009.
30. Hirohito Ogawa, Osamu Taira, Takuya Hirai, Hiromi Takeuchi, Aki Nagao, Yoshiki Ishikawa, Kotaro Tuchiya, Tetsuo Nunoya, Susumu Ueda: Multiplex PCR and multiplex RT-PCR for inclusive detection of major swine DNA and RNA viruses in pigs with multiple infections. *Journal of Virological Methods*, 160, 210-214, 2009.
31. J.S. Park, Y. H. B. Kwon, K. D. Cho, B. H. Lee and C. Chae: Detection of Porcine Circovirus 2 in Mammary and Other Tissues from Experimentally Infected Sows. *J. Comp. Path.*, 140, 208-211, 2009.
32. Cui Shangjina, Martí Cortey, Joaquim Segales: Phylogeny and evolution of the NS1 and VP1/VP2 gene sequences from porcine parvovirus. *Virus Research*, 140, 209-215, 2009.
33. Antonio Augusto Fonseca Jr, Marcelo Fernandes Camargos, Anapolino Macedo de Oliveira, Janice R. Ciacci-Zanella, Maria Aparecida C. Patricio, Alexandre C. Braga, Eliane S. Cunha, Regia D'Ambros, Marcos Bryan Heinemann, Romulo Cerqueira Leite, Jenner K. Pimenta dos Reis: Molecular epidemiology of Brazilian pseudorabies viral isolates, *Veterinary Microbiology* 141, 238–245, 2010.
34. Gan-Nan Chang, Jyi-Faa Hwang, Jing-Tsang Chen, Hau-Yang Tsen, Jyh-Jye Wang: Fast Diagnosis and Quantification for Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2) Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J Microbiol Immunol Infect*, 43, 2, 85-92, 2010.
35. Edwin C. Hahn, Bahaa Fadel-Alla, Carol A. Lichtensteiger: Variation of Aujeszky's disease viruses in wild swine in USA. *Veterinary Microbiology*, 143, 45-51, 2010.
36. Yonghou Jiang, Hanwu Shang, Hui Xu, Liangjun Zhu, Weijie Chen, Lingyan Zhao, Li Fang: Simultaneous detection of porcine circovirus type 2, classical swine fever virus,

porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs by multiplex polymerase chain reaction. *The Veterinary Journal*, 183, 172-175, 2010.

37. Huigang Shen, Chong Wang, Darin M. Madson, Tanja Opriessnig: High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. *Preventive Veterinary Medicine*, 97,228-236, 2010.

38. Lester J. Perez, Heidy Díaz de Arce, Maria T. Frias: Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 strains present in Cuban swine herds. *Research in Veterinary Science*, 89, 301-305, 2010.

39. Ana M. Henriques, Margarida Duarte, Teresa Fagulha, Fernanda Ramos, Sílvia C. Barros, Tiago Luís, Miguel Fevereiro: Molecular study of porcine circovirus type 2 circulating in Portugal. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 2162-2172, 2011.

40. A.R. Patterson, S. Ramamoorthy, D.M. Madson, X.J. Meng, P.G. Halbur, T. Opriessnig: Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after experimental infection. *Veterinary Microbiology*, 149, 91-98, 2011.

41. M.S.Serena, G.E. Metz, E.C. Mortola, M.G. Echeverria: Phylogenetic analysis of Suid herpesvirus 1 isolates from Argentina. *Veterinary Microbiology*, 154, 78-85, 2011.

42. M. Vlasakova, A. Jackova, S. Vilcek: Genetic typing of porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from Slovakia. *Research in Veterinary Science*, 90, 168-173, 2011.

43. Daniel Cadar, Adam Dan, Kata Tombasz, Marta Lorincz, Timea Kiss, Zsolt Becskei, Marina Spinu, Tamas Tuboly, Attila Csagola: Phylogeny and evolutionary genetics of porcine parvovirus in wild boars, *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 1163-1171, 2012.

44. Attila Csagola, Marta Lorincz, Daniel Cadar, Kata Tombasz, Imre Biksi, Tamas Tuboly: Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. *Arch Virol*, 157, 1003-1010, 2012.

45. Lester J. Perez, Carmen L. Pereraa, Maria T. Frías, Jose I. Núñez, Lillianne Ganges, Heidy Díaz de Arce: A multiple SYBR Green I-based real-time PCR system for the simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, pseudorabies virus and Torque teno sus virus 1 and 2 in pigs. *Journal of Virological Methods*, 179, 233-241, 2012.

46. Nicolas Rose, Tanja Opriessnig, Beatrice Grasland, Andre Jestin: Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*, 164,78-89, 2012.

47. Adolf Steinrigl, Sandra Revilla-Fernandez, Jolanta Kolodziejek, Eveline Wodak, Zoltan Bago, Norbert Nowotny, Friedrich Schmoll, Josef Kofer: Detection and molecular characterization of Suis herpesvirus 1 in Austrian wild boar and hunting dogs, *Veterinary Microbiology* 157, 276-284, 2012.
48. Joaquim Segales: Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research*, 164,10-19, 2012.
49. A.S. Dias, P.F. Gerber, A.S. Araujo, P.A. Auler, G.C. Gallinari, Z.I.P. Lobato: Lack of antibody protection against Porcine circovirus 2 and Porcine parvovirus in naturally infected dams and their offspring. *Research in Veterinary Science*, 94, 341-345, 2013.
50. Jian-Kui Liu, Chun-Hua Wei, Xiao-Yan Yang, Ai-Ling Dai, Xiao-Hua Li: Multiplex PCR for the simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, classical swine fever virus, and porcine circovirus in pigs. *Molecular and Cellular Probes*, 149-152, 2013.
51. Rita de Cassia da Silva Paes, A.A. Fonseca Junior, L.A.R.C. Monteiro, G.C. Jardim, U. Piovezan, H.M. Herrera, R.A. Mauro, O. Vieira – da- Motta: Serological and molecular investigation of the prevalence of Aujeszky's disease in feral swine (*Sus scrofa*) in the subregions of the Pantanal wetland, Brasil. *Veterinary Microbiology*, 165, 448-454, 2013.
52. Françoise Pol, Céline Deblanc, Aurélie Oger, Mireille Le Dimna, Gaëlle Simon, Marie-Frédérique Le Potier: Validation of a commercial real-time PCR kit for specific and sensitive detection of Pseudorabies. *Journal of Virological Methods*, 187, 421-423, 2013.
53. Natalia Ramos, Santiago Mirazo, Gustavo Castro, Juan Arbiza: Molecular analysis of Porcine Circovirus Type 2 strains from Uruguay: Evidence for natural occurring recombination. *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 23-31, 2013.
54. Xiofeng Ren, Ye Tao, Jin Cui, Siqingaowa Suo, Yingying Cong, Peter Tijssen: Phylogeny and evolution of porcine parvovirus. *Virus Research*, 178, 392-397, 2013.
55. Lan-lan Zheng, Ya –bin Wang, Ming-feng Li, Homg-ying Chen, Xian –po Guo, Jing-wei Geng, Zhen-ya Wang, Zhan-yong Wei, Bao-an Cui: Simultaneous detection of porcine parvovirus and porcine circovirus type 2 by duplex real-time PCR and amplicon melting curve using SYBR Green. *Journal of viological methods*, 187, 15-19, 2013.

56. Chao-Ting Xiao, Priscilla F. Gerber, Luis G. Gimenez-Lirola, Patrick G. Halbur, Tanja Opriessnig: Characterization of porcine parvovirus type 2 (PPV2) which is highly prevalent in the USA *Veterinary Microbiology*, 161,325-330, 2013.
57. Yi G. Xu, Li C. Cui, Hong W. Wang, Gui C. Huo, Su L. Li: Characterization of the capsid protein VP2 gene of a virulent strain NE/09 of porcine parvovirus isolated in China. *Research in Veterinary Science*, 219-224, 2013.
58. Shuang-Hui Yin, Chao-Ting Xiao, Priscilla F. Gerbera, Nathan M. Beach, Xiang-Jin Meng, Patrick G. Halbur, Tanja Opriessnig: Concurrent porcine circovirus type 2a (PCV2a) or PCV2b infection increases the rate of amino acid mutations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) during serial passages in pigs. *Virus Research*, 178,445-451, 2013.
59. Chun Wang, Victor Fei Pang, Fan Lee, Tien-Shine Huang, Shu-Hwae Lee, Yu-Ju Lin, Yeou-Liang Lin, Shiow-Suey Lai, Chian-Ren Jeng: Prevalence and genetic variation of porcine circovirus type 2 in Taiwan from 2001 to 2011. *Research in Veterinary Science*, 94, 789-795, 2013.
60. Chunya Wei, Minze Zhang, Ye Chen, Jiexiong Xie, Zhen Huang, Wanjun Zhu, Tingchuang Xu, Zhenpeng Cao, Pei Zhou, Shuo Su, Guihong Zhang: Genetic evolution and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 infections in southern China from 2011 to 2012. *Infection, Genetics and Evolution*, 17,87-92, 2013.
61. Chun-Hua Wang, Jin Yuan, Hua-Yang Qin, Yuzi Luo, Xin Cong, Yongfeng Li, Jianing Chen, Su Li, Yuan Sun, Hua-Ji Qiu: A novel gE-deleted pseudorabies virus (PRV) provides rapid and complete protection from lethal challenge with the PRV variant emerging in Bartha-K61-vaccinated swine population in China. *Vaccine*, 32,3379-3385, 2014.
62. Tanja Opriessnig, Chao-Ting Xiao, Priscilla F. Gerber, Patrick G. Halbur: Identification of recently described porcine parvoviruses in archived North America samples from 1996 and association with porcine circovirus associated disease. *Veterinary Microbiology*, 173, 9-16, 2014.
63. Sara Verpoest, Ann Brigitte Cay, Nick De Regge: Molecular characterization of Belgian pseudorabies virus isolates from domestic swine and wild boar, *Veterinary Microbiology*, 172, 72-77, 2014.

64. Kerstin Wernike, Martin Beer, Conrad M. Freuling, Barbara Klupp, Thomas C. Mettenleiter, Thomas Muller, Bernd Hoffmann: Molecular double-check strategy for the identification and characterization of Suid Herpesvirus 1. *Journal of Virological Methods*, 209, 110-115, 2014.
65. M. Eddicks, R. Fux, F. Szikora, L. Eddicks, M. Majzoub-Altweck, W. Hermanns, G. Sutter, A. Palzer, E. Banholzer, M. Ritzmann: Detection of a new cluster of porcine circovirus type 2b strains in domestic pigs in Germany. *Veterinary Microbiology*, 176, 337-343, 2015.
66. Giovanni Franzo, Claudia M. Tucciarone, Giorgia Dotto, Alessandra Gigli, Letizia Ceglie, Michele Drigo: International trades, local spread and viral evolution: The case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy. *Infection, Genetics and Evolution*, 32, 409-415, 2015.
67. Danielle Gava, Carine K. Souza, Rejane Schaefer, Amy L. Vincent, Maurício E. Cantao, Arlei Coldebella, Janice R. Ciacci-Zanellaa: A TaqMan-based real-time PCR for detection and quantification of porcine parvovirus 4. *Journal of Virological Methods*, 14-17, 2015.
68. Ana Moreno, Enrica Sozzi, Guido Grilli, Lucia Rita Gibelli, Daniela Gelmetti, Davide Lelli, Mario Chiari, Paola Prati, Giovanni Loris Alborali, Maria Beatrice Boniotti, Antonio Lavazza, Paolo Cordioli: Detection and molecular analysis of Pseudorabies virus strains isolated from dogs and a wild boar in Italy. *Veterinary Microbiology*, 177, 359-365, 2015.
69. Gerald Reine, Regina Hofmeister, Hermann Willems: Genetic variability of porcine circovirus 2 (PCV2) field isolates from vaccinated and non-vaccinated pig herds in Germany. *Veterinary Microbiology*, 180, 41-48, 2015.
70. M.A. Ssemadaala, M. Ilha, S. Ramamoorthy: Genetic diversity of porcine circovirus type 2 and implications for detection and control. *Research in Veterinary Science*, 103, 179-186, 2015.
71. Brendan Davies, Xiong Wang, Cheryl M.T. Dvorak, Douglas Marthaler, Michael P. Murtaugh: Diagnostic phylogenetics reveals a new Porcine circovirus 2 cluster, *Virus Research*, 217, 32-37, 2016.

72. Lukač B., Knežević A., Milić N., Krnjaić D., Veljović Lj., Milićević V., Zorić A., Đurić S., Stanojević M., Nišavić J: Molecular detection of PCV2 and PPV in pigs in Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina. *Acta veterinaria*, 66, 51-60, 2016.

73. Xiju Shi, Xuming Lic, Qin Wang, Amaresh Das, Guiping Ma, Lu Xu, Qing Sun, Lalitha Peddireddi, Wei Jia, Yanhua Liu, Gary Anderson, Jianfa Bai, Jishu Shi: A multiplex real-time PCR panel assay for simultaneous detection and differentiation of 12 common swine viruses. *Journal of Virological Methods*. 236, 258-265, 2016.

74. Yuan Sun, Yuzi Luo, Chun-Hua Wang, Jin Yuan, Na Li, Kun Song, Hua-Ji Qiu: Control of swine pseudorabies in China: Opportunities and limitations. *Veterinary Microbiology*, 183, 119-124, 2016.

Biografija

Kandidat Radoš D. Miković, dr vet med. rođen je 21.11.1985.godine u Beogradu. Osnovnu školu završio je u Beranama, Republika Crna Gora. Srednju poljoprivrednu – smer veterinarski tehničar završio je u Andrijevici 2004.godine. Fakultet veterinarske medicine Unioverziteta u Beogradu upisao je 2004.godine i na istom diplomirao 2010.godine sa prosečnom ocenom 9,42. Doktorske studije na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu upisao je školske 2011./2012. godine. Sve ispite predviđene planom i progamom studija položio je sa prosečnom ocenom 9,0. Od 1.10.2010.godine zaposlen u Specijalističkoj veterinarskoj laboratoriji u Podgorici na poslovima saradnika u mikrobiološkoj laboratoriji.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Радош Миковић

број уписа 17/4

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

МОЛЕКУЛАРНА ДЕТЕКЦИЈА И ФИЛОГЕНЕТСКА АНАЛИЗА ВИРУСА

АУЈЕЦКИЈЕВЕ БОЛЕСТИ, ПАРВОВИРУСА И СВИЊСКОГ ЦИРКОВИРУСА ТИП 2

КОД СВИЊА У ЦРНОЈ ГОРИ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 25.01.2017.

P. Mirovich

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Радош Миковић

Број уписа 17/4

Студијски програм ДОКТОРСКЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ

Наслов рада МОЛЕКУЛАРНА ДЕТЕКЦИЈА И ФИЛОГЕНЕТСКА АНАЛИЗА ВИРУСА АУЈЕЦКИЈЕВЕ БОЛЕСТИ, ПАРВОВИРУСА И СВИЊСКОГ ЦИРКОВИРУСА ТИП 2 КОД СВИЊА У ЦРНОЈ ГОРИ

Ментор ДР ЈАКОВ НИШАВИЋ, ВАН ПРОФЕСОР

Потписани РАДОШ МИКОВИЋ

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 25.01.2017.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

МОЛЕКУЛАРНА ДЕТЕКЦИЈА И ФИЛОГЕНЕТСКА АНАЛИЗА ВИРУСА

АУЈЕЦКИЈЕВЕ БОЛЕСТИ, ПАРВОВИРУСА И СВИЊСКОГ ЦИРКОВИРУСА ТИП 2

КОД СВИЊА У ЦРНОЈ ГОРИ

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду 25.01.2017

