

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Bojan M. Lukač

IDENTIFIKACIJA I MOLEKULARNA
KARAKTERIZACIJA CIRKOVIRUSA2 I
PARVOVIRUSA KOD SVINJA SA
TERITORIJE REPUBLIKE SRPSKE, BIH

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.godina

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Bojan M. Lukač

IDENTIFICATION AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION CIRCOVIRUS2 AND
PARVOVIRUS IN PIGS FROM TERRITORY
REPUBLIC OF SRPSKA, BIH

Doctoral dissertation

Belgrade, 2016.

Mentor

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

Članovi komisije:

1. Dr Jakov Nišavić, van.prof.
2. Dr Nenad Milić, red.prof.
3. Dr Dejan Krnjaić, van.prof.
4. Dr Jovan Bojkovski, red.prof.
5. Dr Aleksandra Knežević, van.prof.

Medicinski fakultet Univerziteta u Beograd

Datum odbrane

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem Mojoj majci i Krajini.

Ogromnu zahvalnost dugujem mentoru prof. dr Jakovu Nišaviću, na безусловnoj podršci, pomoći i savjetima pri izradi ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr vet. med. Marku Čegar i dr vet. med. Igoru Čegar koji su svojom безусловnom podrškom doprinjeli da ova disertacija ugleda svjetlo dana, kao i firmi MIM COOP iz Banja Luke i INTERVET iz Srpca i radnim kolegama.

Veliku zahvalnost dugujem doktorandu dr vet. med. Kristini Šević koja je pomogla oko prikupljanja uzorka za izradu ove doktorske disertacije.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj majci, ona je moj heroj.

IDENTIFIKACIJA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA CIRKOVIRUSA 2 I PARVOVIRUSA KOD SVINJA SA TERITORIJE REPUBLIKE SRPSKE, BIH

REZIME

Prisustvo svinjskog cirkovirusa 2 i parvovirusa svinja ispitano je u osamdeset zbirnih uzoraka (slezina, limfni čvorovi, pluća) poreklom od nevakcinisanih svinja primenom lančane reakcije polimeraze. Sve životinje su bile iz ekstenzivnog načina gajenja i iz različitih regiona Republike Srpske, BiH. Četiri uzorka limfnih čvorova i dva uzorka slezine su bili pozitivni na prisustvo DNK svinjskog cirkovirusa 2 (7,5%), dok je kod pet uzoraka limfnih čvorova utvrđeno prisustvo DNK parvovirusa svinja (6,25%). U uzorcima poreklom od tri svinje utvrđeno je prisustvo nukleinske kiseline oba prethodno navedena virusa (3,75%). Metodom sekvenciranja određena je nukleotidna sekvenca dela ORF1 regiona genoma svih izolata svinjskog cirkovirusa 2 i dela VP2 gena identifikovanih sojeva parvovirusa svinja. Nukleotidne sekvence virusa PCV2 utvrđene u uzorcima svinja poreklom iz RS-BiH uključene u filogenetsku analizu su pokazale visok stepen sličnosti sa nukleotidnim sekvencama soja Mantova izolovanog kod svinja u Italiji, zatim sojeva DE006-14 i DE222-13 izolovanih kod svinja u Nemačkoj kao i sa sojem Jvnan izolovanog kod svinja u Kini. Istovremeno, virusi PCV2 utvrđeni kod svinja u RS-BiH su bili delimično slični sa sojem NIV-C SRB virusa PCV2 izolovanim kod svinja u Srbiji. Nukleotidnesekvence svinjskih parvovirusa identifikovanih kod svinja u Republici Srpskoj uključene u filogenetsku analizu su pokazale visok stepen sličnosti sa sojem analognim sekvencama sojeva Challenge izolovanim kod svinja u UK, Kresse izolovanim kod svinja u SAD-u kao i sa sojevima 77 i LZ izolovanim kod svinja u Kini.

Ključne reči: svinjski cirkovirus 2, parvovirus svinja, nukleotidna sekvenca, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Mikrobiologija sa imunologijom

UDK broj: 579.62 : 578.822 : 636.4

IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CIRCOVIRUS
TYPE 2 AND PARVOVIRUS IN SWINE IN REPUBLIC OF SRPSKA, BIH

SUMMARY

The presence of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus was examined in eighty clinical samples of spleen, lymph nodes and lungs originating from non-vaccinated swine by polymerase chain reaction. All animals were reared in extensive livestock farming systems in different geographical districts of Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina. Porcine circovirus 2 DNA was detected in four lymph node and two spleen samples (7.5%), while porcine parvovirus DNA was identified in five lymph node samples (6.25%). The presence of both viruses was detected in three lymph node samples (3.75%). Partial nucleotide sequence of ORF1 gene of porcine circovirus 2 and VP2 gene of porcine parvovirus isolates was determined. The nucleotide sequences of identified PCV2 viruses from RS-BIH included in phylogenetic typing are similar and cluster together with strain Mantova isolated from domestic pigs in Italy, strains DE006-14 and DE222-13 isolated from pigs in Germany as well as with the strain Jvnan isolated from pigs in China. Also, analyzed PCV2 isolates were partially similar with the strain NIV-C SRB isolated from pigs in Serbia. The nucleotide sequences of identified PPV viruses that were included in phylogenetic typing showed a high level of similarity with the strain Challenge isolated from pigs in UK, strain Kresse isolated from pigs in USA and strains 77 and LZ isolated from pigs in China.

Key words: porcine circovirus 2, porcine parvovirus, nucleotide sequence, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Microbiology and Immunology

UDK Number: 579.62 : 578.822 : 636.4

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLEDLITERATURE.....	8
2.1. Etiologija	8
2.2. Raširenost	17
2.3. Patogeneza	20
2.4. Klinička slika	24
2.5. Patološke promene u organizmu izazvane infekcijom životinja svinjskim cirkovirusom tip 2 i parvovirusom svinja	33
2.6. Dijagnostika infekcije izazvane svinjskim cirkovirusom tip 2 i parvovirusom svinja	39
2.7. Imunoprofilaksa cirkovirusne i parvovirusne infekcije svinja	47
3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA	49
4. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA	51
4.1. Materijal	51
4.1.1. Uzorci tkiva	51
4.1.2. Referentni sojevi virusa PCV2 i PPV	51
4.1.3. Čelijske linije	51
4.1.4. Lančana reakcija polimeraze	51
4.1.5. Reagensi za izvođenje metode horizontalne gel elektroforeze	52
4.1.6. PCV2 i PPV direktno sekvenciranje	52
4.2. Metode	53
4.2.1. Priprema uzoraka za ispitivanja	53
4.2.2. Ekstrakcija virusne DNK	53
4.2.3. Postupak pravljenja reakcione smeše za izvođenje lančane reakcije polimeraze – PCR	54
4.2.4. Lančana reakcija polimeraze (PCR)	55
4.2.5. Horizontalna gel elektroforeza	55
4.2.6. Postupak sa čelijskim linijama	56
4.2.7. Izolacija virusa	56
4.2.8. Testovi hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije za identifikaciju svinjskog parvovirusa iz ispitivanih uzoraka	57
4.2.9. Metode PCV2 i PPV direktnog sekvenciranja	58
5. REZULTATI ISPITIVANJA	61
5.1. Lančana reakcija polimeraze	61
5.1.1. Svinjski cirkovirus tipa 2 (PCV2)	61
5.1.2. Parvovirus svinja	62
5.1.3. Mešana infekcija	63
5.1.4. Izolacija virusa PCV2 i PPV u čelijskim linijama	63
5.1.5. Nukleotidne sekvence i filogenetska analiza PCV2	64
5.1.5.1. PCV2.....	64
5.1.5.2. PPV.....	69
6. DISKUSIJA	74
7. ZAKLJUČCI	79
8. SPISAK LITERATURE	80

1. UVOD

Cirkovirus svinja tip 2 (PCV2) je široko rasprostranjen u zapatima svinja u različitim delovima sveta kod kojih izaziva oboljenja koja se manifestuju različitim kliničkim simptomima. Svinjski cirkovirus tip 2 pripada porodici *Circoviridae* i rodu *Circovirus*. Genom virusa čini jednolančani cirkularni molekul DNK. Virus PCV2 ne poseduje spoljašnji omotač. Cirkovirus svinja tip 2 je veoma stabilan u odnosu na delovanje faktora spoljašnje sredine, tako da na primer, može da zadrži infektivnost tokom 30 minuta na temperaturi od 60°C. Dobro podnosi i različite vrednosti pH. Do danas su, na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja više autora koja su se odnosila na karakteristike genoma virusa, opisana četiri genotipa virusa PCV2, odnosno genotipovi PCV2a, PCV2b, PCV2c i PCV2d.

Svinjski cirkovirus tip 2 izaziva oboljenja kod svih starosnih kategorija svinja, ali najčešće oboljevaju prasadi. Infekcija izazvana pomenutim virusom može biti ispoljena u vidu kliničkih simptoma bolesti, a može biti i subkliničkog toka. Druge vrste životinja, po svemu sudeći nisu prijemčive na infekciju virusom PCV2. Neka ranija ispitivanja primenom tehnike indirektno imunofluorescencije su pokazala da nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv svinjskog cirkovirusa tip 2 u uzorcima krvnog seruma goveda, ovaca, koza, kokošaka, ćuraka, miševa i čoveka.

Do danas su potvrđene dve vrste cirkovirusa kod svinja i to svinjski cirkovirus tip 1 (PCV1) i svinjski cirkovirus tip 2 (PCV2). Svinjski cirkovirus tip 1 (PCV1) je izolovan 1974.godine iz uzoraka ćelijskih linija poreklom od svinja. Na taj način je ustanovljeno da je pomenuti virus kontaminant ćelijskih linija poreklom od svinja. Cirkovirus svinja tip 2 je prvi put izolovan 1997.godine. Za nepunih dvadeset godina svinjski cirkovirus tipa 2 je postao jedan od glavnih uzročnika značajnih ekonomskih gubitaka u svinjarskoj proizvodnji koji, na primer u zemljama Evropske Unije, iznose nekoliko stotina miliona evra godišnje.

U populaciji svinja svinjski cirkovirus tip 2 se prenosi na različite načine. Do danas postoje brojni literaturni podaci stranih autora koji opisuju načine prenošenja virusa u prirodnim uslovima u zapatima svinja. 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. Virulencija virusa ima značajnu ulogu u njegovom

prenošenju u zapatima svinja. Svinjski cirkovirus tipa 2 se prenosi horizontalnim putem, mada veći broj autora ističe mogućnost i vertikalnog načina prenošenja virusa.

Danas mnogi autori širom sveta smatraju da je virus PCV2 ubikvitaran agens prisutan u velikom broju zapata svinja širom sveta. Istovremeno, dobijeni rezultati ispitivanja većeg broja autora su pokazala da je, u odnosu na broj inficiranih svinja, broj životinja sa klinički manifestnim simptomima oboljenja značajno manji. Naime, poznato je da je u zapatima veći broj svinja inficiran bez ispoljavanja klinički ispoljenih simptoma oboljenja što je navelo više autora da smatraju da je supklinička infekcija i najčešći oblik infekcije svinja pomenutim virusom.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja više autora danas se smatra da je subklinička infekcija najčešći oblik infekcije svinja pomenutim virusom. Prema literaturnim podacima, infekcija svinja izazvana virusom PCV2 se klinički može ispoljavati na nekoliko načina:

- Subklinička infekcija svinja izazvana svinjskim cirkovirusom tip 2 je najčešći oblik infekcije kod životinja koja se manifestuje smanjenim dnevnim prirastom u telesnoj težini. Pojednim imunohistohemijskim metodama se kod subklinički inficiranih životinja može otkriti prisustvo virusa PCV2 u limfatičnim tkivima. Neki autori u svetu na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja pretpostavljaju da do subkliničke infekcije svinja izazvane svinjskim cirkovirusom tip 2 dolazi kao posledica nedovoljne efikasnosti vakcina koje se koriste u cilju vakcinacije svinja u zapatima.
- 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). Multisistemski sindrom kržljivosti prasadi posle zalučenja (PMWS) je prvi put ustanovljen kod svinja sredinom osamdesetih godina 20. veka. Ovaj vid oboljenja se manifestuje pojavom gubitaka u telesnoj težini inficiranih životinja i bledilom kože sa mogućom pojavom crvenih jasno ograničenih promena na njoj koje kasnije konfluiraju. Obolela prasadi su mršava (kržljivost prasadi), dolazi do pojave povraćanja, proliva i dispneje. Dlaka je gruba i duga, a javlja se kašalj i kataralni enteritis. U pojedinim slučajevima dolazi do pojave ikterusa ili žutice. Limfni čvorovi obolelih

životinja, posebno supkutani limfni čvorovi, su uvećani samo u ranoj fazi bolesti. Od ovog oblika infekcije najčešće oboljevaju prasadi posle zalučenja. Stopa morbiditeta se može kretati i do 35%, a stopa mortaliteta od 5 do 20%. Ovo zavisi od prisustva drugih virusnih infekcija u zapatu svinja kao što su infekcije izazvane virusom respiratornog i reproduktivnog sindroma svinja (PRRS) ili parvovirusom svinja (PPV).

- 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 prasadi su nedovoljne telesne mase i slabo sisaju. Posle nekoliko dana obolele životinje su potpuno iscrpljene i na kraju uginjavaju. Kod pobačenih fetusa je utvrđeno povećanje i kongestija jetre kao i kardijalna hipertrofija sa multifokalnim diskoloracijama. Ovaj vid klinički manifestne pojave infekcije svinja izazvane virusom PCV2 se retko javlja u terenskim uslovima. Uzrok tome je najverovatnije činjenica da je zabeležena izuzetno visoka seroprevalencija specifičnih antitela protiv pomenutog virusa u uzorcima krvnog seruma odraslih životinja koji pripadaju zapatima gde nije ustanovljena pojava oboljenja sa ispoljavanjem kliničkih simptoma bolesti. Ovaj vid oboljenja se kod svinja najčešće javlja u zapatima sa velikim brojem nazimica ili velikim brojem seronegativnih svinja. Uprkos tome što krmače i nerastovi mogu biti subklinički inficirani, ishod bolesti kod njihove prasadi još uvek nije poznat.
- 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. Stopa morbiditeta iznosi oko 1%, dok je stopa mortaliteta visoka i kreće se do 100%. 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. Kod obolelih životinja limfni čvorovi ingvinalne regije su povećani. Promena 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. Ovde treba napomenuti da se slični klinički simptomi mogu javiti i kod sistemskog oboljenja izazvanog pomenutim virusom.
- U SAD je 2009. godine kod svinja vakcinisanih protiv infekcije izazvane virusom PCV2 zabeležena pojava perakutnog sindroma nazvanog akutni pulmonalni edem (APE) i to kod prasadi na sisi i prasadi u tovu. Stopa mortaliteta je iznosila i do 20% u nekim zapahtima, a klinički simptomi oboljenja su se karakterisali naglom pojavom respiratornih simptoma praćenih brzim smrtnim ishodom. Jedini infektivni agens detektovan u svim ispitivanim tkivima uginulih životinja je bio svinjski cirkovirus tip 2. Prema literaturnim podacima danas se smatra da do ispoljavanja kliničke slike bolesti dolazi kao posledica replikacije velikih količina virusa u mononuklearnim i endotelnim ćelijama krvnih sudova pluća mlade prasadi osetljive na infekciju kao posledica odsustva vakcinalnog titra antitela, odnosno titra maternalnih antitela.

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 (PK-15, SK-6). 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. Međutim, danas u svetu se u cilju laboratorijske dijagnostike cirkovirusne infekcije svinja sve više koriste molekularne metode zasnovane na lančanoj reakciji polimeraze kao što su konvencionalni PCR, Real-Time PCR, odnosno metoda direktnog sekvenciranja po Sanger-u kojom se utvrđuju sličnosti i razlike u genomima između pojedinih sojeva virusa PCV2.

U cilju sprečavanja pojave oboljenja u zapatima svinja širom sveta se primenjuje postupak aktivne veštačke imunizacije životinja primenom više vrsta komercijalnih vakcina dostupnih na tržištu. Multisistemski sindrom kržljivosti prasadi posle zalučenja (PMWS) kao najvažniji klinički manifestni oblik oboljenja životinja izazvanog virusom PCV2 je multifaktorijalne prirode, tako da ishrana i uslovi držanja svinja mogu da doprinesu nastanku bolesti. Takođe, mešovita infekcija svinja izazvana virusom reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja (PRRS) i parvovirusom svinja (PPV) doprinosi ispoljavanju kliničkih simptoma bolesti i značajno utiče na uspeh vakcinacije svinja u zapatu.

Parvovirus svinja (PPV) izaziva infekcije u zapatima svinja širom sveta i za njega se može reći da je jedan od glavnih etioloških agenasa odgovornih za reproduktivne poremećaje kod svinja. Ovaj virus, osim što ima ključnu ulogu u patogenezi reproduktivnih poremećaja, može i da potencira patogeno delovanje svinjskog cirkovirusa tip 2. Prvi literaturni podaci o infekciji svinja izazvanoj parvovirusom svinja potiču iz 1967. godine. U jednom vremenskom periodu za ovaj virus i enteroviruse koristio se termin *SMEDI (Stillbirth, Mummification, Embryonic Death, Infertility)*. Kod inficiranih svinja, parvovirus svinja izaziva poremećaje reproduktivnih organa sa pojavom uginuća embriona i fetusa.

Parvovirus svinja (PPV) pripada familiji *Parvoviridae*, subfamiliji *Parvovirinae* i rodu *Parvovirus*. Posедуje jednolančani molekul DNK koji je negativno orijentisan, veličine od 5kb. Ne poseduje spoljašnji omotač. Parvovirus svinja je otporan na dejstvo rastvarača masti, na različite vrednosti pH, a na temperaturi od 56°C može da opstane tokom vremenskog perioda od 30 minuta do 1 čas. Formalin, beta-propiolakton, natrijum hipohlorit i oksidaciona sredstva ga inaktivišu. Enzimi RNK-aza, DNK-aza, tripsin, himotripsin i papin ne utiču na aktivnost virusa.

Prema sastavu i redosledu nukleotida u molekulu DNK, parvovirus svinja je sličan parvovirusima glodara, mačaka i pasa. U zemljama gde postoji razvijena proizvodnja svinja, parvovirusna infekcija ima endemski karakter. Priplodne nazimice su najosetljivije na infekciju izazvanu parvovirusom svinja. Posebno su osetljive one životinje koje pre oplodjenja nisu stekle imunitet od infekcije izazvane virusom. Oboljenje kod priplodnih nazimica prati pojava poremećaja funkcije reproduktivnih organa.

Infekcija svinja izazvana svinjskim parvovirusom predstavlja veliki ekonomski i uzgojni problem i značajno utiče na ekonomsku održivost proizvodnje u jednom zapatu svinja. Svinje

su jedini prirodni domaćini za ovaj virus. U zaptima svinja gde je bolest endemska, mnoge životinje su imune na infekciju.

Parvovirus svinja se u zapt životinja najčešće unosi preko novonabavljenih jedinki ili preko semena za veštačko osemenjavanje. U spoljašnjoj sredini virus može da sačuva infektivnost do 20 nedelja tako da, osim direktnog kontakta, infekcija svinja može nastati i preko kontaminisane hrane, vode i predmeta, odnosno indirektnim putem. Infekcija oronazalnim putem ili preko sperme dovodi do pojave lokalne replikacije virusa na mestu ulaska u organizam koja je posledično praćena viremijom. Virus pokazuje naročiti tropizam prema mitotički aktivnim ćelijama fetusa. U vreme prašenja nazimice i krmače koje su imune i poseduju visok titar specifičnih antitela protiv svinjskog parvovirusa u krvi, prenose antitela na potomstvo putem kolostruma.

Tok i ishod parvovirusne infekcije svinja zavisi od imunog statusa plotkinje i stadijuma graviditeta u trenutku infekcije. Ako krmače nisu imune na infekciju parvovirusom svinja, a infekcija nastane do 30. dana graviditeta dolazi do uginuća i resorpcije ploda. Ukoliko do infekcije dođe oko 70. dana graviditeta, virus prolazi transplacentarnu barijeru i dovodi do uginuća i mumifikacije fetusa. Infekcija svinja posle 70. dana graviditeta dovodi do toga da krmače rađaju zdravu seropozitivnu prasad.

Na infekciju svinja izazvanu svinjskim parvovirusom ukazuje veliki broj mumificiranih ili abortiranih fetusa u jednom zaptu. Krmače i nazimice oprašuju manji broj prasadi, a u leglu pored živih mogu da se nađu i mrtvorodena prasad, odnosno mumificirani plodovi u različitim fazama intrauterinog razvića. Novorođena prasad su obično slabo vitalna, podležu sekundarnim bakterijskim infekcijama i nemaju dovoljno snage da sisaju. Pored ovoga, u zaptima svinja inficiranim parvovirusom svinja uočava se pojava lažnog graviditeta

U cilju postavljanja tačne dijagnostike infekcije izazvane parvovirusom svinja u zaptima svinja danas se primenjuje više klasičnih i molekularnih metoda laboratorijske dijagnostike. Tu se pre svega misli na metodu izolacije virusa u ćelijskim linijama i virus neutralizujući test, zatim testove hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije, odnosno tehnike imunofluorescencije. Od molekularnih metoda danas su najviše u primeni konvencionalni PCR, Real – time PCR, odnosno metoda direktnog sekvenciranja. Molekularne metode omogućavaju kako brzu i pouzdanu detekciju virusne nukleinske kiseline, tako i razlikovanje divljih (terenskih) od vakcinalnih sojeva virusa.

Ovde se mora napomenuti da se danas u zapaćima svinja širom sveta u cilju sprećavanja pojave infekcije izazvane parvovirusom svinja, kod životinja sprovode mere aktivne veštaćke imunizacije primenom više vrsta komercijalnih vakcina dostupnih na tržištu.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. ETIOLOGIJA

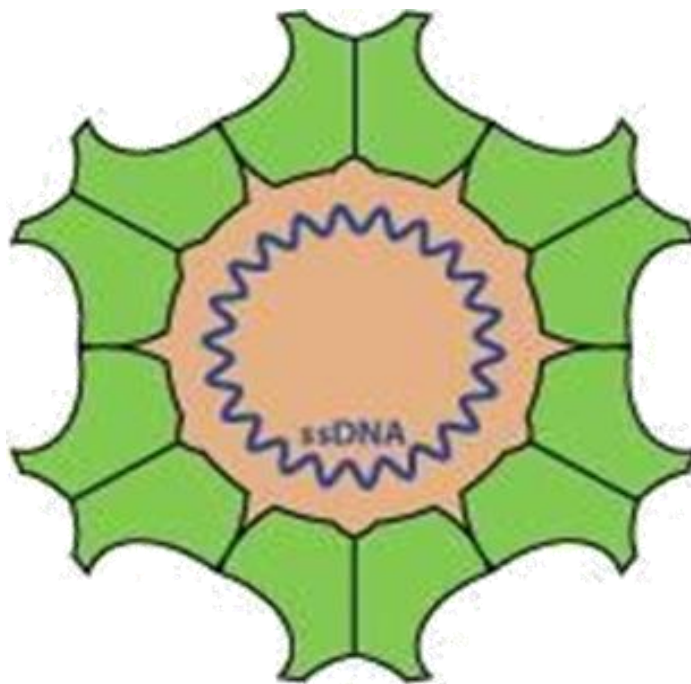
Multisistemska sindrom kržljivosti prasadi posle odlučanja (PMWS) je prvi put opisan 1991. godine u Saskatchewan-u u Kanadi kao sporadično oboljenje prasadi koje karakterišu progresivna kržljivost i žutica [1]. Ovo oboljenje se vrlo brzo proširilo u zaptima svinja širom sveta, uključujući i Australiju [2]. Bolest se manifestovala pojavom kržljivosti, bledila kože, respiratornih smetnji, a povremeno dijareje i žutice kod odlučene prasadi u tovu [3]. Na obdukciji obolelih životinja bile su zapažene karakteristične lezije u većem broju tkiva (multisistemske), najviše prisutne u limfoidnim organima [1, 4]. Ubrzo posle prvog opisa ovog oboljenja, utvrđeno je prisustvo antigena svinjskog cirkovirusa tip 2 (PCV2) u promenjenim organima uginulih životinja [1, 5], što je bilo u suprotnosti sa rezultatima pojedinih autora u prošlosti koji su tvrdili da je virus PCV2 apatogen za svinje [6]. Sledeće godine je izvršeno sekvenciranje genoma virusa PCV izolovanog iz promenjenih organa obolelih svinja pri čemu je otkrivena značajna razlika u genomima izolovanog virusa i do tada poznatog svinjskog cirkovirusa (PCV) izolovanog iz PK-15 ćelijske linije [1]. Posle navedenog otkrića, pomenuti virusi su preimenovani i virus izolovan iz ćelijske linije je dobio naziv svinjski cirkovirus tip 1 (PCV1), dok je virus izolovan iz organa obolele prasadi nazvan svinjski cirkovirus tip 2 (PCV2) [6].

Familija *Circoviridae* obuhvata viruse koji izazivaju oboljenja kod kičmenjaka i biljaka. Virusi koji pripadaju ovoj familiji su svrstani u tri roda i to *Gyrovirus*, *Circovirus* i *Nanovirus*. U rod *Gyrovirus* spada virus uzročnik anemije kokoši. U rod *Nanovirus* spadaju uzročnici oboljenja biljaka, dok su u rodu *Circovirus* svrstani uzročnici infekcija kod svinja, odnosno ptica u vidu promena na kljunu i perju. Noviji podaci dobijeni u istraživanjima ukazuju na to da postoji i četvrti rod u okviru prethodno navedene familije virusa čiji su predstavnici izolovani iz uzoraka fecesa ljudi, majmuna i slepih miševa. Ovaj rod virusa nazvan je *Cyclovirus* [7].

Svinjski cirkovirusi pripadaju rodu *Circovirus*. Virusi iz ove familije poseduju jednolančani, cirkularni molekul DNK i sferičnog su oblika. Nemaju spoljašnji omotač [8]. Kapsid svinjskih cirkovirusa je ikosaedrične simetrije, a prečnik viriona iznosi od 17nm do 22nm. Ovo su najmanji DNK virusi sposobni za nezavisnu replikaciju. U rod *Circovirus* spadaju dva virusa i to svinjski cirkovirus tip 1 (PCV1) i svinjski cirkovirus tip 2 (PCV2) [9]. Svinjski cirkovirus tip 1 je identifikovan 1974.godine u uzorcima kulture ćelija svinjskih bubrega

(PK-15). Danas je poznato da je pomenuti virus široko rasprostranjen u populaciji svinja, ali i to da kod inficiranih životinja ne izaziva vidljive kliničke simptome [6]. Ovaj virus je kontaminant ćelijskih linija pripremljenih od tkiva svinja.

Svinjski cirkovirus tip 2 poseduje jednolančani molekul cirkularne DNK, kapsid ikosaedrične simetrije i nema spoljašnji omotač. Genom virusa se sastoji od 1767 do 1768 nukleotida [10]. On sadrži tri ORF regiona. Region ORF1 (*rep geni*) nosi informacije za sintezu proteina koji učestvuju u procesu replikacije virusa, a ORF2 (*cap geni*) region za sintezu proteina kapsida virusa. Treći ORF3 region nosi informacije za sintezu proteina koji najverovatnije učestvuju u procesu apoptoze ćelije indukovane virusom. Protein čiju sintezu kodira ORF3 region svinjskog cirkovirusa tip 2 se vezuje za E3 ubikvitin ligazu. Ovo u krajnjem ima za posledicu aktivaciju enzima kaspaze koji indukuje apoptozu ćelije. Na osnovu filogenetske analize genoma svinjskog cirkovirusa tipa 2 je utvrđeno da danas postoje četiri genotipa pomenutog virusa [11]. Identifikacija ORF2 regiona koji kodira sintezu *cap* proteina se koristi za serološku detekciju prisustva virusa PCV2 u ispitivanim uzorcima [12] (Slika 1.).



Slika 1. Morfološki izgled svinjskog cirkovirusa tipa 2

Svinjski cirkovirus tip 2 ulazi u ćeliju u procesu koji podrazumeva vezivanje virusa za receptore na površini ćelije koji mogu da budu glikozaminoglikani (GAG), heparin-sulfati ili hondroitin sulfat [13]. Posle vezivanja za receptore na površini ćelije virus putem endocitoze ulazi u ćeliju, a nakon toga koristi odgovarajući signal sa ORF2 regiona genoma virusa koji omogućava ulazak virusa u jedro ćelije [11].

Proces replikacije svinjskog cirkovirusa tip 2 se ne razlikuje od procesa replikacije drugih jednolančanih DNK virusa. Genom virusa kodira sintezu nekoliko proteina neophodnih za odvijanje replikacije virusa u inficiranoj ćeliji. Ovde treba naglasiti da je otkriveno da su dva proteina ključna za odvijanje pomenutog procesa. To su REP protein (Replication - Associated Protein) i CAP (Capsid-Associated Protein) protein. Proces formiranja nove virusne čestice podrazumeva učešće proteina kapsida čiju sintezu kodira ORF2 region genoma virusa, odnosno dva replikativna proteina, čiju sintezu kodira ORF1 region genoma virusa. Dva replikativna proteina kodirana od strane ORF1 regiona genoma virusa nazvani REP i REP' su visoko konzervirani između pojedinih sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2. Razlikuju se u tome što REP protein predstavlja kompletan transkript ORF1 regiona genoma virusa i čini ga 312 aminokiselina, dok je REP' protein skraćeni transkript ORF1 regiona genoma virusa koji je sastavljen od 168 aminokiselina. Replikacija jednolančanih DNK virusa, na primer parvovirusa i cirkovirusa, koji se replikuju u jedru ćelije, odvija se tako što se najpre pod dejstvom ćelijske DNK polimeraze sintetiše dvolančani molekul DNK. Novonastali dvolančani molekul DNK se zatim u jedru pod dejstvom ćelijske DNK zavisne RNK polimeraze II transkribuje u iRNK. Novonastala iRNK nosi informacije za sintezu virusnih proteina. U daljem toku replikacije se pod dejstvom enzima DNK zavisne DNK polimeraze kopira negativan lanac DNK iz prelaznog dvolančanog replikativnog oblika i nastaje jednolančani, pozitivno orijentisani molekul DNK koji ulazi u sastav virusa. S obzirom da genom ovih virusa sadrži nekoliko gena, replikacija ovih virusa je vezana pre svega za ćelije koje se brzo dele [9].

Prema dostupnim literaturnim podacima, do danas su opisana tri genotipa svinjskog cirkovirusa tipa 2 i to PCV2a, PCV2b i PCV2c [14]. Filogenetska analiza svinjskog cirkovirusa tipa 2 se uglavnom zasniva na analizi redosleda nukleotida ORF2 regiona genoma navedenog virusa. Dužina genoma PCV2a genotipa virusa iznosi 1768 bp, a dužina genoma PCV2b genotipa iznosi 1767bp [14]. Pojedini literaturni podaci ukazuju da postoji i četvrti genotip svinjskog

cirkovirusa tipa koji je označen kao PCV2d [15]. Ovde treba napomenuti da su kao izazivači infekcija svinja širom sveta, utvrđeni različiti genotipovi svinjskog cirkovirusa tipa 2 [16, 17, 18].

Genotipovi PCV2a i PCV2b su široko rasprostranjeni u zapaćima svinja u svetu [19]. PCV2 genetski evoluirala taćkastim mutacijama i genetskim rekombinacijama. Podaci objavljeni od 2000. godine na ovamo, ukazuju na povećanje genetićke raznovrsnosti virusa PCV2. Od 2007. godine, genetićke rekombinacije između sojeva istog ili razlićitih genotipova PCV2 su prijavljene u nekoliko zemalja uključujući i Kinu [16, 14, 18, 20]. Neki autori su ukazali na mogućnost pojave mešovitih infekcija razlićitim genotipovima virusa PCV2 [21]. Rezultati pojedinih studija su ukazali da ORF2 region genoma virusa ima znaćajnu ulogu u rekombinaciji između PCV2a i PCV2b genotipova virusa [18]. Kao posledica toga dolazi do pojave novih sojeva virusa sa razlićitim velićinama regiona ORF2 genoma virusa. Kao što je prethodno napomenuto, region ORF2 virusne DNK kodira sintezu proteina koji su ključni za formiranje virusne ćestice i virulenciju virusa. Jedan od tih proteina je *cap* protein [22]. Ovaj protein je antigen i ućestvuje u procesu virusne infekcije ćelije kroz proces vezivanja za ćelijske receptore [23, 24]. Ramos i sar., (2013.) [25] su izvršili molekularnu karakterizaciju sojeva virusa PCV2 identifikovanih kod svinja na teritoriji Urugvaja. Na osnovu molekularne analize *cap* gena je ustanovljeno da postoji visok stepen slićnosti između nukleotidnih sekvenci navedenih sojeva virusa PCV2 identifikovanih u Urugvaju, odnosno visok stepen slićnosti između urugvajskih sojeva virusa i brazilskih sojeva virusa PCV2. Ispitane nukleotidne sekvence urugvajskih sojeva virusa PCV2 su imale visok stepen slićnosti sa sekvencama argentinskih sojeva virusa koja je iznosila od 99,1 do 99,5%. Argentinski sojevi virusa PCV2 su istovremeno pokazivali visok stepen slićnosti sa sojevima svinjskog cirkovirusa tipa 2 poreklom iz Francuske, Kube, Kanade i SAD. Filogenetska analiza urugvajskih sojeva virusa je pokazala da pripadaju genotipu 2a virusa PCV2. Chanhee Chae i sar., (2012.) [26] su opisali molekularne karakteristike pojedinih sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2 koji su identifikovani na teritoriji Jućne Koreje. Autori navode da je svinjski cirkovirus tipa 2 od 1999.godine, od kada se pojavio, postao jedan od najznaćajnijih uzročnika infekcija svinja na teritoriji Jućne Koreje. Najćešće klinićeke forme oboljenja kod svinja u Jućnoj Koreji izazvanog virusom PCV2 su multisistemski sindrom krćljivosti prasadi posle zalućenja (PMWS), odnosno pojava respiratorne forme bolesti (PRDC). Rana forma multisistemskog sindroma krćljivosti zalućene prasadi se javlja kod životinja u starosti od 4 do 8 nedelja i karakteriše se pojavom gubitka telesne tećine životinja, povećanjem limfnih ćvorova i dispnejom.

Kasna forma ovog oblika oboljenja se javlja kod životinja u starosti od 8 do 12 nedelja i manifestuje se pojavom proliva kao dominantnog kliničkog simptoma. U toku dosadašnjih ispitivanja prethodno navedenih autora, izvršeno je sekvenciranje 21 soja svinjskog cirkovirusa tipa 2. Od tog broja, sedamnaest sojeva virusa je pripadalo genotipu PCV2b virusa. Ostali sojevi virusa identifikovani na teritoriji Južne Koreje su pripadali genotipovima PCV2a i PCV2c. Molekularna karakterizacija sojeva virusa PCV2 koji su pripadali genotipu PCV2b je pokazala da postoji visok stepen sličnosti između genoma navedenih sojeva virusa koji se kretao od 94.6% do 99.6%. Ove varijacije su bile izražene u delu ORF2 regiona genoma virusa i kretale su se od 91.1% do 99.7%. ORF1 region genoma svinjskog cirkovirusa tipa 2 je visoko konzerviran i kod njega nisu utvrđene značajne varijacije u redosledu nukleotida (od 96.5% do 100%). Chunya Wei i sar., (2013.) [27] su ispitivali prevalenciju različitih genotipova svinjskog cirkovirusa tipa 2 na području južne Kine u periodu od 2011. godine do 2012.godine. Tokom ispitivanja je izvršena molekularna karakterizacija i filogenetska analiza ukupno 66 sojeva navedenog virusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da su identifikovani sojevi virusa PCV2 pripadali genotipu PCV2a i genotipu PCV2b virusa. Međutim, na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja može se zaključiti da je genotip PCV2b virusa ipak dominantan u ovom delu Kine. Molekularna karakterizacija identifikovanih sojeva virusa je potvrdila i visok stepen sličnosti između nukleotidnih sekvenci ORF2 regiona genoma virusa između sojeva virusa PCV2 koji se kretao od 89.3% do 100%. M. Vlaskova i sar., (2011.) [28] su izvršili molekularnu karakterizaciju identifikovanih sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2 identifikovanih kod svinja na teritoriji Slovačke. Ukupno je ispitano 120 uzoraka poreklom od svinja sa farmi na kojima je utvrđena pojava multisistemskog sindroma kržljivosti prasadi posle zalučenja. Prisustvo pomenutog virusa je ustanovljeno kod 77 ispitanih uzoraka primenom metode PCR. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da identifikovani sojevi svinjskog cirkovirusa tipa 2 kod svinja na teritoriji Slovačke pripadaju genotipovima PCV2a i PCV2b navedenog virusa. Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su odgovarajući zaključci koji su podrazumevali to da su izolati virusa identifikovani na teritoriji Slovačke veoma slični sa izolatima virusa identifikovanih u drugim delovima Centralne i Zapadne Evrope. Rene Larochelle i sar., (2002.) [29] su ispitali molekularne karakteristike i izvršili filogenetsku analizu 34 soja svinjskog cirkovirusa tipa 2 identifikovanih u uzorcima svinja poreklom iz istočnih delova Kanade u periodu od 1990.godine do 2001.godine. Nukleotidne sekvence navedenih sojeva virusa su upoređivane sa analognim sekvencama 36

sojeva svinjskog cikrovirusa tip 2 objavljenih u genskoj bazi podataka. Tokom ispitivanja je utvrđeno da se stepen sličnosti između nukleotidnih sekvenci 34 soja virusa PCV2 identifikovanih kod svinja u Istočnoj Kanadi kretao od 96% do 100%. Istovremeno, nukleotidne sekvence navedenih sojeva virusa su imale visok stepen sličnosti sa analognim sekvencama sojeva identifikovanih na području Zapadne Kanade, SAD, Evrope i Azije. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je ORF1 region genoma virusa visoko konzerviran kod svih ispitanih sojeva virus PCV2, odnosno da se stepen sličnosti između nukleotidnih sekvenci navedenog regiona genoma kod svih sojeva virusa kretao od 97% do 100%. Analizirajući stepen sličnosti nukleotidnih sekvenci ORF2 regiona genoma virusa PCV2 ustanovljeno je da se on, kod svih ispitanih sojeva navedenog virusa kretao od 91% do 100%. Dong – Jun An i sar., (2007.) [30] su izvršili molekularnu karakterizaciju sojeva virusa PCV2 identifikovanih kod svinja u Južnoj Koreji u periodu od 1999.godine do 2006.godine. Ispitani su uzorci jetre, slezine, tonzila i limfnih čvorova svinja koje su ispoljavale kliničke simptome multisistemskog sindroma kržljavosti zalučene prasadi (PMWS), odnosno promene na koži i bubrezima u vidu sindroma PDNS. Za molekularnu karakterizaciju su korišćena 36 identifikovanih sojeva virusa PCV2. Nukleotidne sekvence svih identifikovanih sojeva virusa uključenih u molekularnu karakterizaciju bile međusobno slične, odnosno stepen sličnosti redosleda nukleotida u ORF2 regionu genoma virusa se kretao od 88% do 100%. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da su u jednoj filogenetskoj grupi bili svrstani sojevi virusa PCV2 poreklom iz Holandije, Tajlanda, Velike Britanije i Južne Koreje dok su drugoj grupi pripadali sojevi poreklom iz Japana, Kanade, Španije, Tajvana i Južne Afrike. Zanella i sar, (2009.) [31] su vršili otkrivanje prisustva svinjskog cirkovirusa tipa 2 u različitim zapahtima svinja poreklom iz više regiona u Brazilu. Nukleotidne sekvence svih šest sojeva navedenog virusa su upoređivane sa analognim sekvencama drugih 35 sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2 iz drugih delova sveta koje su prijavljene u genskoj bazi podataka. Filogenetska analiza je pokazala da su sojevi virusa poreklom iz Brazila grupisani u klaster 1, odnosno da su pripadali genotipu PCV2b virusa.

Virusi koji pripadaju familiji *Parvoviridae* su prečnika viriona od 16 do 26nm. Ne poseduju spoljašnji omotač. Kapsid virusa je ikosaedrične simetrije. Genom parvovirusa čini jednolančana, linearna DNK čija veličina iznosi 46kb [32]. Familiju *Parvoviridae* čine dve podfamilije i to *Parvovirinae*, kojoj pripadaju virusi koji izazivaju infekcije kičmenjaka i *Densovirinae* u koju spadaju virusi koji izazivaju infekcije kod artropoda. Subfamilija

Parvovirinae obuhvata tri roda: *Parvovirus*, *Erythrovirus* i *Dependovirus*. Samo rod *Parvovirus* sadrži viruse koji su od značaja za veterinarsku medicinu.

Pojedini virusi iz familije *Parvoviridae* su odgovorni za neke veoma ozbiljne infekcije kod ljudi i životinja (parvovirus svinja, parvovirus pasa, humani parvovirus B19, humani bocavirus), odnosno za neke blage i subkliničke infekcije [33, 34]. U rod *Parvovirus* svrstan je veći broj virusa izolovan iz različitih domaćina. Do danas su opisani virusi koji izazivaju infekcije kod pacova, miševa, svinja, goveda i mačaka. Kasnije su ovom rodu virusa priključeni i virusi hepatitisa gusaka, hepatitisa čoveka, gastroenteritisa čoveka kao i pseći parvovirus.

Parvovirusi su sferičnog oblika. Kapsid virusa se sastoji od 32 kapsomere. U sastav virusa ulaze najmanje tri, a najviše četiri proteina koje kodira virusna DNK. Parvovirusi ne poseduju spoljašnji omotač. Genom parvovirusa sadrži dva velika ORF regiona koji su označeni kao ORF1 i ORF2. Jedan kodira sintezu nestrukturnog proteina, a drugi sintezu struktturnog virusnog proteina. Strukturni protein virusa je odgovoran za stepen virulencije virusa [33], dok nestrukturni protein ima aktivnost helikaze i nikaze koje su odgovorne za replikaciju virusu i formiranje novih viriona. Proces replikacije parvovirusa se odigrava u jedru inficirane ćelije i ne razlikuje se od procesa replikacije drugih jednolančanih DNK virusa. Virusna DNK ulazi u jedro posle oslobađanja virusa iz proteinskog omotača gde se i replikuje. Proteini kapsida virusa sintetisani tokom procesa replikacije u jedu ćelije učestvuju u odvijanju procesa formiranja virusne čestice, odnosno sazrevanje i formiranja novih viriona. Novostvorene virusne čestice se oslobađaju iz ćelije posle ćelijske lize. Xiofeng Ren i sar., (2013.) [35] su ispitali evolutivni razvoj i filogeniju svinjskog parvovirusa. Ispitano je ukupno 46 nukleotidnih sekvenci sojeva navedenog virusa poreklom iz genske baze podataka. Dobijeni rezultati ispitivanja NS1, VP2 i celog ORF regiona genoma parvovirusa svinja su pokazali da je zajednički predak svim sojevima pomenutog virusa postojao još pre oko 250 godina. Cadar D. i sar., (2012.) [17] su ispitali uzorke tkiva i organa poreklom od 842 divlje svinje koji su prikupljeni u periodu od 2006.godine do 2011.godine u zapadnim regionima Rumunije. Pored navedenih uzoraka, ispitani su i uzorci poreklom od 120 domaćih svinja sa deset različitih farmi. Dobijeni rezultati su ukazali na to da je svinjski parvovirus najviše divergirao u poslednjih 20 do 60 godina i da su sojevi navedenog virusa identifikovani kod divljih svinja pokazali veću genetičku raznolikost u odnosu na sojeve svinjskog parvovirusa identifikovanih kod domaćih svinja. Pored toga, tokom ispitivanja je u jednom broju uzoraka poreklom od divljih svinja utvrđeno prisustvo visoko virulentnog 27 soja

virusa PPV. Xu i sar. (2013.) [36] su upoređivali nukleotidnu sekvencu VP2 gena PPV NE/09 soja sa analognim nukleotidnim sekvencama sojeva svinjskog parvovirusa identifikovanih kod životinja na teritoriji Kine. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali visok stepen sličnosti između soja NE/09 parvovirusa svinja i drugih sojeva virusa PPV identifikovanih kod svinja na teritoriji Kine, odnosno da predstavlja soj mutant već postojećeg soja svinjskog parvovirusa koji ima najveću prevalenciju infekcije kod svinja na teritoriji Kine. Tanja Opriessnig i sar., (2014.) [37] su vršili identifikaciju sojeva svinjskih parvovirusa i svinjskog cirkovirusa tip 2 iz uzoraka tkiva svinja poreklom iz pojedinih delova Severne Amerike. Uzorci svinja su prikupljeni u periodu od 1996.godine do 2013.godine. Ukupno je ispitano 586 uzoraka krvnog seruma i 164 uzorka pluća svinja. Prisustvo virusa PCV2 je utvrđeno kod 27,7% (162/586), dok je prisustvo specifičnih antitela protiv svinjskog parvovirusa utvrđeno u 48,8% (286/586) uzoraka krvnog seruma. Prisustvo virusa PCV2 je ustanovljeno kod 78,7% (129/164) uzoraka tkiva pluća, dok je 56,7% (93/164) uzoraka pluća bilo pozitivno na prisustvo svinjskog parvovirusa. Mešovita infekcija svinja izazvana virusima PCV2 i PPV je ustanovljena kod 14,3% (84/586) uzoraka seruma, odnosno u 49,4% (81/164) uzoraka tkiva pluća. Pored toga, prevalencija DNK virusa PPV je značajno veća u tkivima koja sadrže velike količine DNK virusa PCV2 u poređenju sa uzorcima tkiva koja ne potiču od životinja sa kliničkim simptomima sistemske cirkovirusne infekcije. Učestalost istovremene, mešovite PPV/PCV2 infekcije je veća u zapatima svinja sa sistemskom infekcijom prouzrokovanom virusom PCV2 u odnosu na negativne ili subklinički inficirane zapate svinja. Drugi parvovirusi svinja kao što su PPV2, PPV3 i PPV4 su identifikovani u uzorcima krvnog seruma i pluća svinja prikupljenih tokom 1998. godine, a virus PPV5 iz uzoraka prikupljenih tokom 2006.godine. Rezultati ovih ispitivanja ukazuju da su virusi PCV2 i PPV široko rasprostranjeni u populaciji svinja u Sjevernoj Americi. F.S. Campos i sar., (2016.) [38] su izvršili sekvenciranje kompletnog genoma svinjskog parvovirusa. Utvrđivanje prisustva svinjskog parvovirusa je vršeno u uzorcima poreklom od životinja sa farmi u pojedinim delovima Brazila. Izvršeno je sekvenciranje, odnosno određivanje redosleda nukleotida u kompletnom genomu identifikovanih sojeva pomenutog virusa. Giovanni Franzo i sar., (2015.) [39] su vršili molekularnu karakterizaciju sojeva virusa PCV2 kod svinja na teritoriji Italije. Ovde treba napomenuti da su svi do sada poznati genotipovi virusa ovom prilikom identifikovani, izuzev genotipa PCV2c. Strukturu PCV2 genotipova u Italiji karakteriše jasna predominacija genotipa PCV2b, što je u skladu sa ranijim izvještajima o ispitivanjima sprovedenim u drugim zemljama

[40, 6]. Prisustvo genotipa PCV2a virusa je ustanovljeno u manjem broju uzoraka, što ukazuje da ovaj genotip virusa gubi epidemiološki značaj na području Italije. Tokom ovih ispitivanja utvrđeno je i prisustvo genotipa PCV2d virusa koji je nedavno identifikovan kao novi genotip pomenutog virusa. Ovaj genotip virusa je prvi put identifikovan u zapatima svinja na teritoriji Kine. Ovakva distribucija različitih genotipova svinjskog cirkovirusa tip 2 je razumljiva imajući u vidu međunarodni promet životinja i određenu otpornost pomenutog virusa [40, 6] što omogućava njegovo prenošenje na veće razdaljine. Ljudi takođe kao pasivni vektori mogu biti prenosiooci virusa [7].

Krajem šezdesetih godina prošlog veka prvi put je objavljeno da poremećaje u reprodukciji kod svinja može da prouzrokuje nepoznati virusni agens. Dalja ispitivanja su pokazala da se radi o virusu koji je na osnovu svojih bioloških karakteristika svrstan u familiju *Parvoviridae*. Ovaj parvovirus adaptiran na svinje pokazuje značajni, za DNK viruse neobičan stepen variranja antigenske strukture. Danas se smatra da u populaciji svinja cirkulišu najmanje dvije varijante ovog virusa što utiče na uspešnost spovođenja odgovarajućih imunoprolifaktičkih mera. Na osnovu do sada prikupljenih podataka o karakteristikama genoma svinjskog parvovirusa može se ustanoviti da je isti sličan parvovirusima izazivačima infekcija kod glodara, mačaka i pasa.

Parvovirus svinja je stabilan u sredinama sa širokim rasponom pH vrednosti koje se kreću u od 3-9. Na temperaturi od 56°C zadržava infektivnost oko 60 minuta. Svinjski parvovirus je otporan na rastvarače masti. U materijalu u spoljašnjoj sredini može zadržati infektivnost od nekoliko meseci do nekoliko godina [9].

2.2. RAŠIRENOST

Godine 1991. na teritoriji Kanade se kod svinja pojavilo oboljenje danas poznato kao multisistemski sindrom kržljivosti prasadi posle zalučenja (post weaning multisystemic wasting syndrome- PMWS). Klinička slika bolesti se manifestovala pojavom gubitka telesne mase obolelih životinja, zatim pojavom respiratornih poremećaja kao i promenama na koži [1]. Oboljenje se kasnije javilo i u Francuskoj [42], SAD-u [37], većini Evropskih zemalja i zemalja Jugoistočne Azije [1]. Bliska povezanost između multisistemskog sindroma kržljivosti prasadi posle zalučenja (PMWS) i svinjskog cirkovirusa tip 2 (PCV2) je eksperimentalno potvrđena od strane više autora [43, 44, 45]. Do sada je kao rezultat istraživanja većeg broja autora ustanovljeno da svinjski cirkovirus tipa 2 učestvuje u etiologiji ne samo PMWS-a, već i kompleksa respiratornih oboljenja svinja (PRDC) [44, 46]. Pored ovoga, virus PCV2 je izazivač dermatitisa i nefropatije, reproduktivnih poremećaja kod nazimica [45, 47, 4, 48], odnosno enteritisa kod odraslih svinja u tovu [49].

Literaturni podaci ukazuju da je svinjski cirkovirus tipa 2 prisutan u populaciji svinja širom sveta [50, 4]. Do kasnih 90-ih godina došlo je do pojave epidemije infekcije ovim virusom u više zemalja Evrope, Jugoistočne Azije, a od sredine prve decenije 21.veka i SAD [19].

Rodriquez Arriola i sar. (2002.) [51] su ispitivali uzorke tkiva poreklom od 198 svinja, odnosno uzorke seruma poreklom od 388 svinja. Uzorci su prikupljeni od svinja na teritoriji Španije u periodu od 1985.godine do 1997.godine. Ispitivanje uzoraka krvnog seruma na prisustvo specifičnih antitela protiv svinjskog cirkovirusa tipa 2 je izvršeno metodom testa imunoperoksidaze (IPMA), dok su na prisustvo virusne nukleinske kiseline uzorci ispitani primenom metode hibridizacije *in situ*. Ukupno je 41,3% (78/189) uzoraka od ukupnog broja ispitanih metodom *in situ* hibridizacije bilo pozitivno na prisustvo virusa PCV2, dok je testom imunoperoksidaze kod 72,7% (282/388) od ukupnog broja ispitanih uzoraka krvnog seruma utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa PCV2. Prisustvo specifičnih antitela protiv svinjskog cirkovirusa tipa 2 je ustanovljeno i u uzorcima krvnog seruma poreklom od svinja sa teritorije Severne Irske. Uzorci krvnog seruma su prikupljeni u periodu od 1973.godine do 1999.godine (Walker IW, Konoby CA, 2000). Procenat seropozitivnih svinja je bio najveći kod životinja od kojih su navedeni uzorci prikupljeni 1988. godine (100%; 80/80) i 1999. godine (92,1%; 129/140). Manji procenat seropozitivnih je ustanovljen kod prikupljanja uzoraka krvnog seruma svinja tokom 1981. godine (61.3%; 49/80) i 1984.godine (55%; 44/80). Slična ispitivanja

su vršena na teritoriji Kanade. McIntosh KA, Harding JC, 2006. [52] su primenom metode indirektno imunofluorescencije vršili otkrivanje prisustva i visine titra specifičnih antitela protiv svinjskih cirkovirusa tipa 1 i 2. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je kod 8% od ukupno 177 ispitanih uzoraka krvnog seruma prikupljenih tokom 1985.godine utvrđeno prisustvo virusa PCV1, dok je 13.6% uzoraka od ukupno 177 ispitanih bilo pozitivno na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa PCV2. Ispitivanjem uzoraka svinja prikupljenih tokom 1989.godine, utvrđeno je prisustvo specifičnih atitela protiv virusa PCV1 kod 41,4% (60/145) uzoraka, dok je 72,4% (105/145) je bilo pozitivno na prisustvo specifičnih antitela protiv svinjskog cirkovirusa tipa 2 [51]. Jacobsen i sar, (2009.) [53] su ispitivali prikupljene uzorke poreklom od svinja sa područja Nemačke. Uzorci su ispitivani metodama *in situ* hibridizacije i lančane reakcije polimeraze (PCR). Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali povećanje prevalencije prisustva svinjskog cirkovirusa tipa 2 u zapatima svinja u svetu. Slična ispitivanja su vršena i u Velikoj Britaniji i dala su skoro identične rezultate [2]. Kada se govori o rasprostranjenosti pojedinih genotipova svinjskog cirkovirusa tipa 2 u zapatima svinja u svetu, treba napomenuti da su pre 2005.godine genotipovi pomenutog virusa PCV2a i PCV2b bili endemski u severnoameričkim zemljama. Međutim, tokom 2005.godine na području Kanade je došlo do izbijanja oboljenja kod svinja za koje je utvrđeno da je bilo izazvano genotipom PCV2b svinjskog cirkovirusa tip 2 [22, 14]. Navedeni genotip virusa PCV2 je kao izazivač infekcije naveden i u zapatima svinja u Kini [15], Tajlandu [54], Koreji [55], Danskoj [56] i Švajcarskoj. Ispitivanja uzoraka krvnog seruma svinja poreklom iz pojedinih delova Francuske su pokazala je najveći procenat svinja kod kojih su ustanovljena specifična antitela protiv virusa PCV2 bio starosti od 13 nedelja [4]. U ovom istraživanju procenat životinja u čijim uzorcima krvnog seruma je utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv svinjskog cirkovirusa tip 2, koja su bila starosti od 20 nedelja, nije bio značajno različit u odnosu na onaj utvrđen kada su u ispitivanjima ispitani uzorci svinja sa gazdinstava zahvaćenih infekcijom izazvanom svinjskim cirkovirusom tipa 2, odnosno onih zapata svinja koje nisu bile inficirane. Slični rezultati su dobijeni tokom ispitivanja izvršenih na uzorcima svinja sa teritorije Španije u periodu od 2002. godine do 2003.godine [25]. Segales i sar., (1998.) [57] su dokazali da je prevalencija infekcije svinja izazvana svinjskim cirkovirusom tipa 2 bila najveća kod životinja od 16 do 20 nedelja starosti i to na farmama na kojima je utvrđena infekcija prethodno navedenim virusom. Dobijeni rezultati ispitivanja [4], su potvrdili da ukoliko se

infekcija svinja izazvana svinjskim cirkovirusom tipa 2 javi kod životinja u mlađem starosnom dobu postoji veći rizik od razvoja sistemske infekcije.

U odnosu na prisustvo svinjskog cirkovirusa tip 2 u zapaćima svinja, odnosno pojave multisistemskog sindroma kržljivosti prasadi posle zalućenja (PMWS) u populacijama svinja, zemlje Evrope mogu se podeliti u 5 razlićitih kategorija [3]:

1. Zemlje u kojima je prisustvo oboljenja bilo znaćajno ili izuzetno znaćajno. Ova kategorija može biti dalje podeljena, jer se u nekim zemljama sindrom PMWS i dalje smatra kao najznaćajnije oboljenje u proizvodnji svinja (Velika Britanija, Danska, Austrija, Irska i Švedska), dok su druge zemlje imale ozbiljne probleme vezane za infekciju kod svinja između 1995.-2003. godine, ali je PMWS sindrom manje prisutan kod životinja (Francuska, Španija, Portugalija, Italija, Nemaćka, Grćka, Āeška, Maćarska, Poljska, Hrvatska, Slovenija i Holandija).
2. Zemlje u kojima uprkos prijavljivanju slućajeva sindroma PMWS-a, ova bolest ne predstavlja veliki zdravstveni problem ili je u potpunosti iskorenjena (Švajcarska, Belgija i Norveška).
3. Zemlje koje su prijavile prisustvo infekcije kod svinja izazvane svinjskim cirkovirusom tip 2, odnosno sindroma PMWS-a, ali nema podataka ćijom analizom može da se potvrdi znaćaj ove infekcije u zapaćima svinja (Srbija, Crna Gora, Bugarska, Litvanija i Letonija).
4. Zemlje koje nikad nisu prijavile ovu bolest kod svinja kao što je Finska.
5. Zemlje sa nepoznatim statusom infekcije izazvane virusom PCV2 u zapaćima svinja (Estonija, Albanija, Island, Makedonija, Kipar, Bosna i Hercegovina, Belorusija, Ukrajina i Moldavija).

2.3. PATOGENEZA

Ćelije koje u organizmu inficiranih životinja omogućavaju replikaciju virusa nisu do sada sa sigurnošću identifikovane, tako da patogeneza infekcije svinja izazvane svinjskim cirkovirusom tip 2 još uvek nije dovoljno razjašnjena. Pretpostavlja se da se virus PCV2 najpre replikuje u tonzilama. Allan i sar., (2000.) [19] smatraju da virusi PPV i PCV2 mogu zajedno da inficiraju svinje. Tokom ovakvih infekcija u organizmu svinja dolazi do razvoja imunosupresije, što po mnogim autorima, predstavlja preduslov za nastanak kliničkih simptoma bolesti kod svinja izazvanih svinjskim cirkovirusom tip 2.

Neki autori su primenom metoda imunohistohemije otkrili prisustvo antigena svinjskog cirkovirusa tipa 2 u citoplazmi makrofaga i dendritičnim ćelijama [19, 58]. Međutim, oni ipak smatraju da je to posledica nagomilavanja komponenti virusa u ovim ćelijama i da nije rezultat odvijanja procesa replikacije virusa. Prisustvo svinjskog cirkovirusa tip 2 je sporadično otkriveno i u limfocitima. U timusu je virus PCV2 otkriven u samo nekoliko histiocita što ukazuje na to da su timociti i T limfociti otporni na infekciju pomenutim virusom [34]. Antigeni svinjskog cirkovirusa tipa 2 mogu se naći i u epitelnim ćelijama pluća i bubrega, ćelijama glatkih mišića i endotelnim ćelijama nekoliko tkiva kod eksperimentalno inficiranih svinja [59] i prirodno inficiranih svinja virusom PCV2 kod kojih je utvrđena pojava multisistemskog sindroma kržljivosti prasadi posle zalučenja (PMWS) [60, 4]. Pored ovoga, Sorden i sar., (2000.) [59] su utvrdili prisustvo antigena svinjskog cirkovirusa tipa 2 i u intersticijalnim makrofagima, odnosno u epitelnim ćelijama testisa [61]. Prisustvo virusa PCV2 je najveće u ćelijama kardiomiocita, hepatocita i makrofaga tokom fetalnog perioda života, odnosno monocita u ranom postnatalnom životu [34].

Multisistemski sindrom kržljivosti prasadi posle zalučenja predstavlja najvažniji klinički oblik infekcije svinja izazvane svinjskim cirkovirusom tip 2. Danas se smatra da u nastanku ovog sindroma kod svinja značajnu ulogu imaju i nespecifični faktori spoljašnje sredine. Zbog toga mnogi stručnjaci smatraju da je etiopatogeneza bolesti daleko složenija nego što se ranije pretpostavljalo. Virus koji se replikuje u ćelijama monocitno-markofagnog sistema kao što su parvovirus svinja [6,62] i virus svinjskog reproduktivnog i respiratornog sindroma (PRRS) [19,44] stvaraju preduslove za replikaciju svinjskog cirkovirusa tip 2 u organizmu. Ovo ima za posledicu povećanu incidencu pojave multisistemskog sindroma kržljivosti prasadi posle zalučenja (PMWS) kao najčešćeg kliničkog simptoma bolesti izazvane virusom. Uprkos

prisustvu virusa PCV2 u marofagima i dendritičnim ćelijama, *in vitro* studije ukazuju na to da monociti ne predstavljaju ciljne ćelije u kojima se replikuje virus [63]. Monociti i makrofagi su testirani na sposobnost replikacije PCV2 u *in vitro* uslovima. Replikacija svinjskog cirkovirusa tipa 2 u ovim ćelijama nije utvrđena [63]. Slično tome, ne postoje dokazi ni o tome da se svinjski cirkovirus tip 2 umnožava u *in vitro* uslovima u dendritičnim ćelijama. Međutim, ovde treba napomenuti da svinjski cirkovirus tip 2 opstaje u dendritičnim ćelijama bez opadanja sopstvene virulencije ili izazivanja ćelijske smrti, odnosno apoptoze ćelije. Sinha i sar., (2011.) [64] su ispitivali uticaj svinjskog reproduktivnog i respiratornog virusa (PRRS) na pojavu infekcije svinja izazvane svinjskim cirkovirusom tipa 2, odnosno njegovim genotipovima PCV2a i PCV2b. Dobijeni rezultati ispitivanja navedenih autora su potvrdili da virus reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja u inficiranim ćelijama indukuje proces replikacije svinjskog cirkovirusa tipa 2. U *in vitro* uslovima je dokazano da se povećava proinflamatorni odgovor organizma koji nastaje kao posledica prisutva virusa PRRS i njegovog uticaja na alveolarne makrofage, što poboljšava replikaciju PCV2 [63]. Retrospektivna analiza pojave multisistemskog sindroma kržljivosti prasadi posle zalučenja sprovedena kod svinja na teritoriji Južne Koreje je pokazala da je prisustvo svinjskog cirkovirusa tip 2 ustanovljeno kod samo 15% slučajeva klinički manifestnih slučajeva oboljevanja svinja. Mešovita infekcija izazvana virusima PCV2 i svinjskim parvovirusom je ustanovljena kod 25,6% slučajeva, dok je mešovita infekcija izazvana virusom reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja utvrđena kod 29,3% slučajeva oboljevanja svinja [49]. Pojava mešovite infekcije izazvane svinjskim cirkovirusom tipa 2 i svinjskim parvovirusom ustanovljena je u velikom broju slučajeva u zapatima svinja na teritoriji Kanade [58]. U zapatima svinja na teritoriji Ujedinjenog Kraljevstva, tokom jednog ispitivanja je utvrđen samo jedan slučaj mešovite infekcije svinje sa svinjskim parvovirusom [66].

Tok i ishod parvovirusne infekcije zavisi od imunog statusa inficirane životinje i stadijuma graviditeta u trenutku nastanka infekcije. Ovo podrazumeva da ako su svinje stekle imunitet pre parenja, infekcija parvovirusom u bilo kojoj fazi graviditeta, ne izaziva reproduktivne poremećaje. Intrauterina infekcija fetusa svinja izazvana svinjskim parvovirusom je dobro opisana u literaturi. Infekcija gravidnih svinja izazvana svinjskim parvovirusom se manifestuje pojavom fetalne smrti i mumifikacijom plodova [67]. Više autora je u svojim ispitivanjima dokazalo da svinjski parvovirus uglavnom ne dovodi do oboljenja kod svinja sa pojavom vidljivih kliničkih simptoma bolesti [68, 67]. Cutlip i Mengeling (1975) [67] su dokazali

da, iako je svinjski parvovirus široko rasprostranjen u tkivima eksperimentalno inficiranih svinja, nije bilo ispoljavanja kliničke slike bolesti. Međutim, ako se odrasle krmače inficiraju virusom PPV pre parenja ili tokom graviditeta virus prolazi kroz placentu i inficira embrion ili fetus [67]. Fetus inficirani pre 70. dana graviditeta obično uginjavaju, dok fetus inficirani kasnije, sintetiziraju specifična antitela protiv parvovirusa svinja i obično preživljavaju [68, 67]. Značajna karakteristika mnogih virusnih infekcija je virusom uzrokovana imunosupresija u organizmu domaćina [34]. Nedostatak informacija u vezi sa ovim mogućim efektom koji izaziva svinjski parvovirus navelo je pomenute autore da ispituju da li intrauterina infekcija fetusa svinja može izazvati oštećenje imunološkog sistema u fetalnom i perinatalnom životu. U studiji koju su sprovedli Nielsen i saradnici (1991.) [69] na nazimicama 40.,50.,60.,80. i 100. dana graviditeta, odvojeno je sedam nazimica i u anesteziji podvrgnuto dijagnostičkoj laparatomiji. Gravidni rogovi materice su otvarani i nakon lokalizacije fetusa, isti bili veštački inficirani svinjskim parvovirusom u amnionsku šupljinu. Lezije na fetusima koje su ustanovljene u ovim ispitivanjima su bile karakteristične za intrauterine infekcije fetusa svinja izazvane svinjskim parvovirusom [68, 67]. S obzirom da je svinjski parvovirus bio jedini virus izolovan iz tkiva fetusa svinja sa patološkim promenama, dokazano je da je pomenuti virus izazvao promene na fetusu. Pored ovoga, infekcija fetusa svinja izazvana svinjskim parvovirusom izvršena 40., 50. i 60. dana graviditeta izazivala je smrt fetusa i mumifikaciju plodova kao i širenje infekcije na neinficirane fetuse. Ovo je bilo u skladu sa prethodnim zapažanjima potvrđenim od strane Ren i sar., (2012.) [35]. Ovi autori nisu prijavljivali bilo kakve patološke lezije ili smrt fetusa kod kojih nije bilo infekcije izazvane svinjskim parvovirusom. Ovde treba napomenuti da su rezultati dosadašnjih ispitivanja pokazali da su fetus svinja veštački inficirani svinjskim parvovirusom između 80. i 100. dana graviditeta, uglavnom ostajali živi dvanaest i dvadeset dana od izvođenja oglada veštačke infekcije. Utvrđeno je da se svinjski parvovirus lakše širi u organizmima mlađih fetusa. Međutim naknadni eksperimenti tokom kojih je vršena veštačka infekcija svinjskih fetusa između 60. i 80. dana graviditeta virusom PPV je pokazala je da se virus proširio na sve fetuse u materici, odnosno da je izazvao infekciju svih fetusa kod gravidne krmače. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja, u slučaju krmača koje nisu bile imune na infekciju svinjskim parvovirusom, utvrđeno je da ukoliko dođe do infekcije pre 70. dana graviditeta, virus prolazi placentarnu barijeru i izaziva infekciju fetusa. Posle 70. dana graviditeta infekcija više ne predstavlja nikakvu opasnost za fetuse krmača, jer u ovom periodu razvija fetus postaju u određenom stepenu

imunokompetentni i mogu da odgovore na infekciju. Na osnovu svega prethodno iznetog fetusi inficirani pre 70. dana intrauterinog razvića ne preživljavaju.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja koji su prikazani u više studija koje su se bavile parvovirusnom infekcijom svinja, dokazano je da nedovljno razvijen imuni sistem mlađih fetusa i brzo diferentovanje ćelija fetusa u ranom fetalnom dobu predstavljaju preduslov za replikaciju parvovirusa svinja, što treba uzeti u obzir. Utvrđivanje prisustva specifičnih antitela protiv parvovirusa svinja u uzorcima krvnog seruma poreklom fetusa svinja, siguran su dokaz intrauterine infekcije [67]. Prisustvo specifičnih antitela protiv virusa PPV je posledica njihovog prolaska kroz placentarnu barijeru. Međutim takav prolazak može uključiti i prolazak drugih antitela. Ovde treba napomenuti da ako se infekcija svinja dogodi u ranoj fazi graviditeta, plotkinje obično povadaju u redovnim vremenskim intervalima od 21 dan. Istovremeno, ako infekcija nastane između 15. i 35. dana graviditeta i pri tome propadaju i resorbuju se svi plodovi, povadanja su u neredovnim i mnogo dužim vremenskim razmacima. U slučaju da se svi plodovi ne resorbuju, estrus može da izostane do kraja graviditeta, a mamarni kompleksi mogu da se razviju kao u toku normalnog graviditeta. Pošto u očekivanom terminu ne nastupi prašenje, takvo stanje je poznato još i kao lažni graviditet.

2.4. KLINIČKA SLIKA

Svinjski cirkovirus tipa 2 izaziva oboljenja kod svinja koja se klinički manifestuju u zavisnosti od lokalizacije patološkog procesa i uzrasta svinja. Najčešće oboljevaju prasadi posle zalutivanja u uzrastu od 2-4 meseca. Na osnovu nekih seroloških studija koje su rađene ustanovljeno je da je infekcija svinja izazvana svinjskim cirkovirusom tipa 2 raširena širom sveta [3], dok je prevalencija kliničke slike mnogo manja. S druge strane, prvi dokaz o infekciji izazvanoj cirkovirusom tipa 2 svinja pronađen je u Nemačkoj 1962 [53], dok je prva dijagnoza cirkovirusne infekcije svinja postavljena sredinom 80-ih godina [53, 51]. Ovde se može napomenuti da je najčešći oblik manifestacije infekcije sa svinjskim cirkovirusom tipa 2 subklinička infekcija. Mnogi autori smatraju da primena aktivne veštačke imunizacije svinja tokom subkliničke infekcije životinja, može da poboljša njihove produktivne parametre (prosečni dnevni prirast, kondiciju životinja i težinu trupova) [12].

Danas je oboljenje izazvano virusom PCV2 najpoznatije kao sindrom multisistemski sindrom kržljivosti prasadi. Multisistemski sindrom kržljivosti prasadi posle odlutivanja (PMWS) je prvi put opisan 1991. godine u Saskatchewan-u u Kanadi kao sporadično oboljenje prasadi [1]. Ovo novootkriveno oboljenje karakterisala je pojava kržljivosti, bledila kože, respiratornih smetnji, a povremeno dijareje i žutice kod odlučene prasadi u tovu [3]. Na obdukciji obolelih životinja bile su zapažene karakteristične lezije u većem broju tkiva (multisistemске), najviše prisutne u limfoidnim organima [1, 4].

Infekcija svinja izazvana virusom PCV2 je danas u svetu poznata još i kao cirkovirusna infekcija svinja [4], odnosno PCV2 povezana sistemska infekcija [42] ili kao PCV2 udruženo oboljenje (PCVAD) [65]. Svinjski cirkovirus tip 2 izaziva kod životinja kliničke oblike oboljenja sa pojavom dermatitisa i nefropatije koji su u stranoj literaturi poznati kao PDNS sindrom [19, 4] zatim oblike bolesti sa ispoljavanjem reproduktivnih poremećaja [70,47,48], promene na plućima u vidu proliferativne i nekrotizujuće pneumonije [50, 5, 57], respiratorne simptome bolesti [65,46] i enteritisa [49, 42]. Sva ova klinička stanja prvobitno su bila označena kao cirkovirusne bolesti svinja (PCVD) [19]. Ovakav naziv je bio široko prihvaćen u Evropi, dok 2006. godine u Severnoj Americi nije odlučeno da mora da se doda novi termin i kao ključna reč koristi termin „povezan” što je dovelo do stvaranja i uvođenja naziva (PCVAD). Sa kliničke tačke gledišta infekcije izazvane cirkovirusom, potencijalno mogu obuhvatiti sledeće kliničke simptome:

- PCV-2 sistemska bolest (PCV2-SD) - stepen morbiditeta u inficiranim zapaćima svinja se kreće od 4 do 30% (povremeno od 50% do 60%), dok se stopa smrtnosti kreće od 4% do 20% [5]. Ova vrsta oboljenja izazvana svinjskim cirkovirusom tipa 2 koja ima sistemski karakter se kliniċki manifestuje slabijim prirastom ili gubitkom težine, bledilom kože, respiratornim poremećajima, prolivom i povremenim ikterusom [1, 4] (Slika 2.). Povećani limfni ćvorovi su vrlo ćest nalaz u ranim fazama bolesti [1].



Slika 2. Uperedan prikaz praseta bez oboljenja i praseta sa multisistemskom bolesti i kržljanjem prasadi (www.pig333.com)

Retrospektivna analiza pojave multisistemskog sindroma kržljivosti prasadi posle zalućenja kod svinja na teritoriji Južne Koreje je otkrila da je infekcija svinja izazvana svinjskim cirkovirusom tip 2 utvrđena u samo 15% slučajeva oboljevanja [26]. Mešovita infekcija svinja izazvana parvovirusom svinja i svinjskim cirkovirusom tip 2 je ustanovljena u 25,6% slučajeva. Imajući to u vidu neki farmeri u Južnoj Koreji su pokušali da vrše imunizaciju svinja protiv

svinjskog cirkovirusa tip 2 u starosti od 3 do 5 nedelja u cilju ublažavanja kliničkih simptoma sindroma PMWS i smanjenja pojave lezija na limfatičnom tkivu koje su karakteristične za mešanu infekciju izazvanu svinjskim parvovirusom i PCV2 u zaptima svinja. Međutim, imunizacija svinja vakcinom protiv svinjskog parvovirusa nije ublažila niti otklonila kliničke simptome multisistemskog sindroma kržljivosti prasadi posle zalučenja, zatim pojavu limfoidne deplecije i drugih promena kod svinja utvrđenih kod mešovite infekcije izazvane visusima PPV/PCV2 [35] (Slike 3.).



Slika 3. Hronično slabljenje prasadi uzrokovano sistemskom infekcijom izazvanom virusom PCV2

- PCV-2 bolest pluća (PCV2 –LD) i PCV2 crevna bolest - glavni klinički simptomi ovog oblika cirkovirusne infekcije svinja su respiratorni poremećaji [44, 46] i pojava dijareje [47, 40]. Ovde se mora naglasiti da se ovi klinički simptomi mogu javiti i u slučaju razvoja sistemske bolesti svinja izazvane virusom PCV2 [40] (Slika 3. i 4.).
- PCV-2 reproduktivna bolest (PCV2-RD) – infekcija svinja izazvana svinjskim cirkovirusom 2 može dovesti do pojave kasnog abortusa kod svinja i rađanja slabo vitalne prasadi [34,48] odnosno mumifikacije prasadi [70] slično onoj izazvanoj svinjskim parvovirusom [67]. Međutim, reproduktivni poremećaji izazvani svinjskim cirkovirusom tip 2 se veoma retko javljaju kod svinja u ekstenzivnom načinu držanja. Ovo je verovatno povezano sa činjenicom da je seroprevalencija infekcije kod odraslih svinja visoka i samim tim većina uzgojnih zapata nema problema sa klinički izraženom infekcijom. Najugroženiji su zapati svinja u kojima je broj nazimica visok, odnosno seronegativni zapati životinja [42, 48]. Iako krmače [51, 71] i nerastovi [10, 70, 67] mogu biti subklinički inficirani virusom PCV2, ne mora doći do ispoljavanja oboljenja kod njihove prasadi. Količina DNK virusa PCV2 u spermi eksperimentalno inficiranog nerasta koja se kreće u rasponu od $10^{5,6}$ do $10^{5,8}$ virusnih genomskih kopija/ml [70] verovatno nije dovoljna da izazove reproduktivni poremećaj, serokonverziju kod krmača ili infekciju fetusa. Neki podaci iz strane literature ukazuju da infekcija svinja izazvana svinjskim cirkovirusom tipa 2 može biti povezana sa izostajanjem koncepcije, jer se virus PCV2 može replikovati u embrionu i dovoditi do embrionalne smrti i ponovnog pojavljivanja estrus. Ovde je važno napomenuti da kod malog procenta embriona starih do 21 dan izloženost virusu PCV2 nije dovela do štetnih posledica po njihov razvoj [47].

Značajan broj autora se do sada bavio infekcijom svinja izazvanoj virusom PCV2. U prvoj polovini prve decenije 21. veka svinjski cirkovirus tipa 2 je bio najčešće detektovan virus kod svinja [49]. Međutim, pojava cirkovirusne infekcije svinja koja se manifestuje reproduktivnim poremećajima sa pojavom mumificiranih, mrtvorodenih ili abortiranih fetusa je bila veoma retka. Moguće objašnjenje za smanjenu učestalost ovih reproduktivnih poremećaja krmača može biti činjenica da je prevalencija PCV2 seropozitivnih krmača gotovo dostigla 100%. U Južnoj Koreji je utvrđeno vertikalno prenošenje virusa PCV2 sa majke na plod ili preko kolostruma. Vertikalni način prenošenja virusa sa majke na plod je izuzetno važan put prenošenja virusa, naročito u

zdravim zapačima svinja. Virus PCV2 može da prođe kroz placentu i dovede do infekcije fetusa. Na ovaj način transplacentarno inficirana prasadi mogu da ispolje multisistemski sindrom kržljivosti posle zalučenja ako su postnatalno inficirana sa svinjskim parvovirusom ili ako su im aplikovana sredstva koja deluju kao imunomodulatori. Izlučivanje svinjskog cirkovirusa tipa 2 je ustanovljeno u kolostrumu i mleku kod prirodno i veštački inficiranih krmača [64]. Vakcinacija krmača protiv svinjskog cirkovirusa tipa 2 ne sprečava transplacentarnu infekciju fetusa ili unošenje virusa u organizama putem kolostruma [70]. Chanhee Chaei sar., (2012.) [26] navode da su multisistemski sindrom kržljivosti prasadi posle zalučenja i kompleks respiratornih bolesti svinja (PRDC) najčešći klinički oblici infekcije svinja izazvane svinjskim cirkovirusom tipa 2 u zapačima svinja na teritoriji Južne Koreje. Isti autor tvrdi da su u periodu od 2000. godine do 2001.godine iz uzoraka svinja sa kliničkim simptomima multisistemskog sindroma kržljivosti prasadi posle zalučenja izolovani sojevi svinjskog cirkovirusa tipa 2 pripadali genotipu PCV2a, dok su od 2005.godine na ovamo u uzorcima svinja identifikovani sojevi koji su pripadali genotipu PCV2b. Isti autor je sindrom PMWS podelio u dve faze: ranu i kasnu. Rana faza multisistemskog sindroma kržljivosti prasadi posle zalučenja se javlja kod prasadi u starosti između 4 i 8 nedelja. Ovaj oblik je tipičan prikaz PMWS-a i karakteriše se pojavom opšte slabosti obolele životinje, smanjenim prirastom, povećanjem limfnih čvorova i dispnejom. Kasna faza multisistemskog sindroma kržljivosti prasadi posle zalučenja se prvenstveno javlja kod prasadi u starosti između 8 i 12 nedelja. Glavna klinička manifestacija je pojava proliva kod životinja. Kod ovako obolelih životinja dolazi u značajnom broju slučajeva do razvoja sekundarne bakterijske infekcije bakterijama iz roda *Salmonella spp.*

Kim i sar., (2002. i 2003.) [46, 49] su utvrdili da je sperma nerastova jedan od načina infekcije krmača. Prisustvo virusa svinjskog cirkovirusa tipa 2 u spermi nerastova ukazuje da postoji rizik za infekciju krmača prilikom izvođenja pripusta ili postupka veštačkog osemenjavanja [70]. Veštačko osemenjavanje se rutinski sve više koristi u zapačima svinja na teritoriji Južne Koreje. Tehnologija gajenja svinja u Južnoj Koreji podrazumeva da se više od 90% krmača veštački osemenjava, a više od 80% farmera kupuje seme za veštačko osemenjavanje iz komercijalnih centara za proizvodnju semena. Vakcinacijom svinja se postiže smanjivanje izlučivanja virusa putem semena [71]. Iz navedenih razloga preporučuje se da se nerastovi imunizuju sa vakcinom protiv svinjskog cirkovirusa tipa 2 da bi se smanjila količina pomenutog virusa u spermi.

- Dermatitis i nefropatija sindrom (PDNS) - svinje kod kojih se javlja dermatitis i nefropatija su anoreksične i depresivne sa blago povišenom ili normalnom telesnom temperaturom [56]. Obolele svinje su apatične i nerado se kreću. Na koži zadnjih ekstremiteta i u perinealnoj regiji, a nekad i distribuirane po celom telu mogu se uočiti crvene do ljubičaste makule i papule. Sa vremenom ove promene na koži bivaju pokrivenne tamnim krastama. Nakon otpadanja krasti, kožne lezije ostaju blede, ponekad sa ožiljcima [56, 57] (Slike 4. i 5.). Ovaj oblik cirkovirusne infekcije svinja se javlja kod mladih životinja, svinja u tovu i kod odraslih svinja [56]. Ovi klinički simptomi bolesti se javljaju kod manje od 1% životinja u zapatu [57], a opisana je i veća učestalost [63]. Smrtnost može dostići 100% i to kod svinja starijih od 3 meseca, a kod životinja mlađih od 3 meseca stopa mortaliteta se kreće oko 50%. Svinje obolele u akutnom toku uginjavaju za nekoliko dana od pojave kliničkih simptoma bolesti. Životinje koje prežive se brzo oporavljaju i to u roku od 7 do 10 dana [57].



Slika 4. PDNS kod svinja

Oboljenje pluća i creva se kod svinja manifestuje pojavom respiratornih poremećaja, odnosno dijareja. Ovde treba napomenuti da se slični klinički simptomi mogu javiti i kod sistemskog oboljenja izazvanog pomenutim virusom.

Kod svinja u SAD koje su bile vakcinisane protiv infekcije izazvane svinjskim cirkovirusom tipa 1 tokom 2009.godine su zabeleženi slučajevi perakutnog toka bolesti sa pojavom akutnog edema pluća. Ovaj oblik infekcije se javljao kod prasadi u odlučuju i u fazi predtova. U nekim zapažanjima svinja u kojima je ustanovljena pojava ovog oblika oboljenja, stepen mortaliteta životinja je iznosio oko 20%. Životinje su naglo uginjavale sa usled pojave respiratornih simptoma bolesti. Ispitivanje uzoraka prikupljenih od uginulih svinja utvrđeno je prisustvo virusa PCV2 u najvećem broju uzoraka [72]. Smatra se da oboljenje nastaje kao posledica replikacije virusa u mononuklearnim i endotelnim ćelijama krvnih sudova pluća mladih svinja. Oštećenje endotelnih ćelija krvnih sudova pluća i oslobađanje citokina iz makrofaga, dovodi do oštećenja integriteta zida krvnih sudova što ima za posledicu pojavu krvi u intersticijumu pluća. Ispitivanje uzoraka krvnog seruma svinja ustanovljeno je da svinje koje su osetljive na akutni pulmonalni edem imaju niži nivo titra specifičnih antitela protiv virusa PCV2 i lakše podležu infekciji navedenim virusom pre vakcinacije [72]. Iz ovoga proizilazi zaključak do kojeg je došla ova grupa autora da je imunizacija jedan od načina sprečavanja ovog kliničkog oblika infekcije svinja [72]. Međutim, još uvek se vodi polemika oko toga da li je svinjski cirkovirus tip 2 jedini uzročnik ovog kliničkog oblika bolesti kod svinja.



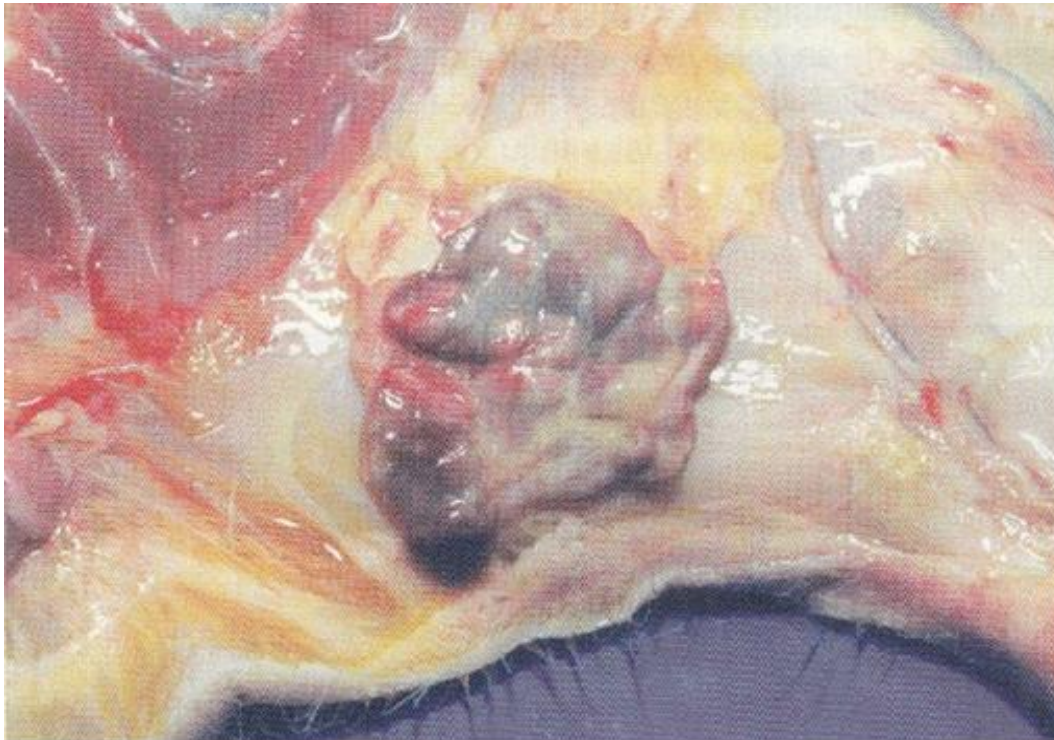
Slika 5. Svinja obolela od PDNS-a. Prisustvo iregularnih crveno-ljubičastih makula i papula po koži lokalizovanih po celom telu, izraženije na ekstremitetima i perinealnoj regiji.

Parvovirus svinja je ubikvitaran u zapatima svinja širom sveta i njegova uloga u reproduktivnim poremećajima je do sada prilično dobro ispitana. Dosadašnja mnogobrojna ispitivanja su pokazala da je infekcija krmača izazvana parvovirusom svinja glavni uzrok fetalne smrti i mumifikacije. Serološki podaci ukazuju na to da je većina zapata svinja endemski zaražena, a samo manji broj zapata osetljiv na infekciju [73]. R.B. Morrison i H.S. Joo, (1984.) [74] su ispitivali reproduktivne gubitke prouzrokovane infekcijom svinja svinjskim parvovirusom i to posebno u zapatima u kojima je dolazilo do pojave prašenja većeg broja krmača u kratkim vremenskim intervalima. Dobijeni rezultati ispitivanja navedenih autora su pokazali da je u jednoj grupi krmača prosek mumifikovanih prasadi u leglu po jednoj krmači iznosio od 0,22 do do 4,10 po jednoj krmači. Ispitivanjem uzoraka mumifikovanih fetusa utvrđeno je prisustvo svinjskog parvovirusa. U drugoj grupi krmača samo 8 od 35 krmača se oprasilo i dalo u proseku

0,25 mumificiranih fetusa po leglu. Kod preostalih krmača u zaptu nije došlo do prašenja niti rađanja zdrave i vitalne prasadi. Kod njih je ustanovljena pojava ranog embrionalnog uginuća i resorpcije. Kod treće grupe krmača, 19 životinja je oprášeno sa prosekom od 0,32 mumificirana fetusa po leglu. S obzirom na kliničku sliku i broj uzoraka mumificiranih fetusa zaključeno je da je do infekcije krmača izazvane svinjskim parvovirusom u prvoj grupi krmača došlo u drugoj trećini graviditeta, u drugoj grupi u prvoj trećini graviditeta, dok je u trećoj grupi infekcija nastala pre parenja. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja je zaključeno da se infekcija krmača izazvana svinjskim parvovirusom manifestuje pojavom fetalne smrti i mumifikacijom, iako su rano embrionalno uginuće, pobačaji, rađanje mrtvorodne prasadi i slabo vitalne prasadi takođe posledica infekcije krmača izazvane prethodno navedenim virusom. Iz navedenih podataka se zaključuje da infekcija svinja izazvana svinjskim parvovirusom izaziva značajne ekonomske gubitke u zaptima svinja. Nielsen i sar., (1991.) [69] su ispitivali ulogu svinjskog parvovirusa u eksperimentalnoj intrauterinoj infekciji fetusa različitih uzrasta. Veštačka infekcija gravidnih krmača je vršena 40., 50. i 60. dana graviditeta. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je došlo do pojave uginuća fetusa, mumifikacije plodova i širenja virusne infekcije sa jednog fetusa na drugi. Veštačka infekcija krmača između 80. i 100. dana graviditeta je dovela do pojave patoloških promena u tkivu fetusa, dok je širenje infekcije sa jednog na drugi fetus bilo sporadično.

2.5. PATOLOŠKE PROMENE U ORGANIZMU IZAZVANE INFEKCIJOM ŽIVOTINJA SVINJSKIM CIRKOVIRUSOM TIP 2 I PARVOVIRUSOM SVINJA

Promene koje virus svinjski cirkovirus tip 2 (PCV2) izaziva u tkivima i organima obolelih životinja su do sada opisane u radovima brojnih autora [34, 65, 1, 69, 42, 4, 5, 48]. Kod prirodno inficiranih svinja (oko 10%), kod kojih je usled infekcije svinjskim cirkovirusom tipa 2 došlo do razvoja sistemske infekcije, zapažena je pojava nekrotizujućeg limfadenitisa koji uglavnom zahvata folikule limfnih čvorova [5]. Kod ovih životinja uočava se granulomatozno zapaljenje limfnih čvorova koje prati smanjenje broja limfocita [42]. U nekim studijama je kod obolelih svinja opisana pojava hipertrofije i hiperplazije limfnih čvorova koji su prethodno bili zahvaćeni nekrozom, zatim pojačana ekspresija von Willebrandovog faktora kao i postojanje sekundarne tromboze. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja je zaključeno da vaskularne promene koje nastaju kao posledica razvoja tromboze predstavljaju osnov nastanka nekrotizujućeg limfadenitisa kod svinja inficiranih virusom PCV2 [63]. U nekrotizujućim lezijama nije bio ustanovljen vaskulitis, ali ukupni nalazi ukazuju da su nekrotične promene povezane sa oštećenjima krvnih sudova [42], odnosno da nastaje kao posledica oštećenja krvnih sudova. Međutim, ovde treba napomenuti da je nekrotizujući limfadenitis opisan i kod klinički zdravih svinja [65, 72]. Iz navedenih razloga se ne može sa sigurnošću reći da je nekrotizujući limfadenitis posledica cirkovirusne infekcije svinja [65, 46]. U ispitivanjima nekih autora je utvrđeno prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti u nekrotičnim fokusima limfnih čvorova, što je ukazivalo na to da je navedni virus uzrok ovih promena [51].



Slika 6. Potkožna žutica i povećanje ingvinalnog limfnog čvora (Ivetić i sar., 2004.)

Rinku Sharma i G. Saikumar, 2014. [75] su vršili ispitivanja uzoraka tkiva i organa svinja uginulih sa kliničkom slikom multisistemskog sindroma kržljivosti prasadi posle zalučenja i ustanovili nekoliko značajnih pojava. Patoanatomskim nalazom je utvrđeno da su skeletini mišići obolelih svinja bili blede žute boje, a limfni čvorovi povećani i edematozni (Slika 6.). Pluća nisu bila kolabirana, ali jesu bila edematozna sa delimičnim kongestijama i jasno ograničenim promena na dijafragmatskim režnjevima koje su bile konsolidovane. Srčani mišić je bio blede žute boje. Jetra obolelih i uginulih životinja je bila blago uvećana sa narandžastim diskoloracijama i jasno ograničenim oblastima kongestije na rubovima. Bubrezi su bili uvećani i zadebljali, kapsula bubrega se teško uklanjala. Površina tkiva bubrega posle uklanjanja kapsule je bila neravna sa sivo-belim ili blede žutim prebojenjima. Patohistološki nalaz pluća je otkrio da je u tkivu pluća bilo prisutno blago do umereno intersticijalno zapaljenje koje se karakterisalo infiltracijom limfocitnih ćelija, proliferacijom alveolarnih i intersticijalnih makrofaga, degeneracijom i deskvamacijom bronhijalnih epitelnih ćelija sa alveolarnim hemoragijama. Prisutan je bio perikarditis, kongestija, blaga krvarenja, edem i vakuolarna degeneracija epikarda. Bila je uočena i degeneracija miokardiocita i fokalna infiltracija mononuklearnih ćelija u blizini

zakrčenih krvnih sudova. U tkivu jetre je zapažena degeneracija hepatocita (masna nekroza) i nekroza, multifokalna infiltracija mononuklearnih ćelija, proliferacija kupferovih ćelija, akumulacija limfoidnih ćelija u portnim oblastima jetre, blaga hiperplazija žučnog epitela i proliferacija vezivnog tkiva. Na bubrezima su uočene ograničene kongestije u korteksu i srži, degenerativne promjene u epitelnim ćelijama proksimalnih i distalnih tubula. Limfni čvorovi i slezina su pokazivali depleciju limfoidnih ćelija i izraženu proliferaciju makrofaga. U tkivu mozgu je bio prisutan fokalni meningitis koji se karakteriše kongestijom i infiltracijom mononuklearnih ćelija. U cerebralnom korteksu su se nalazile fokalne glioze, a uočena je i infiltracija mononuklearnih ćelija oko proširenih krvnih sudova.

Jedna od posledica infekcije svinja izazvane svinjskim cirkovirusom tipa 2 je i insuficijencija srčanog mišića. Ona nastaje kao posledica akutnog nekrotizujućeg ili hroničnog fibroznog miokarditisa. Prisustvo virusa PCV2 je otkriveno u citoplazmi miokardiocita kao i unutar vaskularnih endotelnim ćelija miokarda [42]. Kod životinja, posebno onih sa sistemskom infekcijom izazvanom virusom PCV2, dolazi do pojave limfohistiocitnog i plazmocitnog vaskulitisa [42]. Ove promene na tkivima i organima obolelih životinja izazvani virusom PCV2 ukazuju da promene na kardiovaskularnom sistemu i endotelnim ćelijama mogu igrati značajnu ulogu u patogenezi infekcije prethodno navedenim virusom. Poznati su raniji nalazi nekih autora da je prisustvo antigena i virusne nukleinske kiseline, kao i replikacija virusa u njima potvrđena u epitelnim i endotelnim ćelijama [60, 4]. Lezije na mozgu su vrlo retko prisutne sistemske infekcije izazvane virusom PCV2 [4]. Međutim, neki autori su utvrdili postojanje cerebralnog limfohistiocitnog vaskulitisa u kombinaciji sa hemoragijama i/ili limfohistiocitnim meningitisom kod svinja prirodno inficiranih sa virusom PCV2 [4]. Opis degeneracije i nekroze sive i bele mase mozga koje je praćeno nekrotizujućim vaskulitisom je takođe prikazan u okviru jedne studije [76]. U oba prethodna slučaja u makrofagima i endotelnim ćelijama je utvrđeno prisustvo PCV2.

Pojedini autori opisuju pojavu negnojnog poliencefalomijelitisa u slučajevima sistemske infekcije izazvane virusom PCV2 koje je udružena sa infekcijom Techovirusom. Smatra se da imunosupresija izazvana infekcijom svinja virusom PCV2 omogućava infekciju životinja Techovirusom. Međutim, da danas nije u potpunosti potvrđeno da virus PCV2 pokazuje tropizam prema endotelnim ćelijama mozga i meždanih ovojnica, a studije u kojima je rađeno sekvenciranje pojedinih sojeva virusa PCV2 pokazuju da 89-100% izolata ne izazivaju promene

u mozgu. Kod svinja inficiranih virusom PCV2 dolazi do pojave razvoja intersticijalnog nefritisa [5]. Virus PCV2 je prisutan u tkivu bubrega. Promene u tkivu bubrega mogu da budu veoma izražene i upadljive kod cirkovirusne infekcije svinja koja se ispoljava promena na bubrezima i koži (PDNS). Ovde se u bubrezima uočava pojava fibro-nekrotizujućeg glomerulitisa sa negnojnim intersticijalnim nefritisom i nekrotizujućim vaskulitisom u bubrežnoj karlici [56, 57]. U slučaju cirkovirusne infekcije svinja koja se manifestuje sindromom PDNS, virus PCV2 je otkriven u ćelijskom infiltratu u slučajevima intersticijalnog nefritisa kao i u ćelijama bubrežnih tubula [4]. Neki autori opisuju pojavu tubularne nekroze bubrega i pojavu intersticijalnih krvavljenja kod Jorkširskih svinja. Ovi autori tvrde da bubrežne lezije kod ovih svinja nisu tipične za sistemsku infekciju izazvanu virusom PCV2 i oblik infekcije navedenim virusom koji se ispoljava pojavom dermatitisa i nefritisa. Međutim, ove životinje su imale nekrotizujući vaskulitis u bubrezima i slezini što sugerise na pojavu sistemskih lezija na krvnim sudovima [5]. Sinha i sar. (2011.) [64] su ispitivali uticaj virusa PRRS na dinamiku infekcije svinja izazvane sa genotipovima PCV2a i PCV2b svinjskog cirkovirusa tipa 2. Ispitivanja su vršena na 23 ogledne svinja, starosti od dve do šest nedelja koje su bile podeljene u pet oglednih grupa: negativna kontrola (n=3), svinje inficirane virusom PCV2a (n=5), svinje inficirane virusima PCV2a i PRRS (n=5), svinje inficirane svinjskim cirkovirusom tipa 2 genotip PCV2b (n=5) i svinje inficirane virusima PCV2b i PRRS (n=5). Tokom ispitivanja su od oglednih svinja prikupljani uzorci krvi, nosnih briseva i briseva fecesa. Navedeni uzorci su prikupljani u pravilnim vremenskim intervalima od 0. dana izvođenja veštačke infekcije do 70. dana od izvođenja veštačke infekcije. Ispitivanje prisustva specifičnih antitela protiv prethodno navedenih virusa u uzorcima krvnog seruma vršeno je primenom metode ELISA, dok je utvrđivanje prisustva nukleinskih kiselina pomenutih virusa vršeno primenom metode real-time PCR. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da su znatno veće prisustvo virusa PCV2 u ispitivanim uzorcima poreklom od svinja koje su bile istovremeno veštački inficirane virusima PCV2 i PRRS u odnosu na prisustvo virusa PCV2 u uzorcima poreklom od veštački inficiranih svinja. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja je ustanovljeno da prisustvo virusa reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja poboljšava replikaciju svinjskog cirkovirusa tipa 2 u organizmu. Istovremeno, infekcija svinja izazvana virusom PRRS produžava prisustvo virusa PCV2 u krvnom serumu i povećava količinu svinjskog cirkovirusa tipa 2 u oralnim, nazalnim i fekalnim sekretima u kasnijim fazama infekcije, posebno između 28 i 70 dana. Rezultati ovog ispitivanja ukazuju na interakcije između

virusa PRRS i PCV2 u inficiranom organizmu i na važnost kontrole prisustva virusa reproduktivnog i respiratornog sindroma u zapaćtima svinja u cilju smanjenja intenziteta infekcije životinja u zapaćtima izazvane svinjskim cirkovirusom tipa 2.

Parvovirus svinja inficira i replikuje se u ćelijama fetusa koje se brzo dele što dovodi do pojave uginuća istog. Infekcija fetusa ne rezultira viremijom. Umesto toga, virus se distribuira iz jednog fetusa u drugi unutar materice gravidnih krmaća. Zbog toga se kod uginulih ili pobaćenih fetusa vide patološke promene razlićitih razvojnih stadijuma. U slućaju uginjavanja embriona pre ili oko 30.-35. dana graviditeta, dok još nisu formirani koža i koštani sistem, dolazi do njegove resorpcije i raćanja manjeg broja prasadi u leglu. Posle 35. dana graviditeta, infekcija svinja izazvana svinjskim parvovirusom dovodi do pojave mumifikacije prasadi. Infekcija svinja u kasnijim fazama graviditeta dovodi do raćanja mrtve ili slabo vitalne prasadi. Siegl i sar., (1984.) [32] su ispitivali patogenezu parvovirusne infekcije svinja na uzorcima tkiva fetusa svinja koje su bile inficirane u različitim periodima graviditeta. Kod jedne krmaće koja je ųrtvovana 63. dana graviditeta, odnosno 35. dana posle izvoćenja veštaćke infekcije je utvrćeno prisustvo 12 fetusa od kojih su kod četiri bila prisutna krvavljenja sa pojavom edema i mumifikacijom. Kod druge životinje utvrćene su promene kod tri fetusa, dok je osam fetusa bilo klinićki zdravo. Kod tri krmaće ųrtvovane između 90. i 98. dana graviditeta ustanovljene su sledeće promene: kod jedne životinje ųezdeset dva dana posle izvoćenja ogleda veštaćke infekcije ustanovljeno je sedam abnormalno razvijenih fetusa i tri klinićka zdrava fetusa; kod druge krmaće, trideset pet dana posle veštaćke infekcije utvrćeno je osam klinićki promenjenih fetusa i dva klinićki zdravih fetusa i kod treće krmaće ćetrdeset devet dana od veštaćke infekcije ustanovljeno je pet promenjenih fetusa i tri klinićki zdrava fetusa. Kod inficiranih fetusa je ustanovljena pojava petehijalnih krvavljenja, edema i mumifikacije. U telesnim ųupljinama fetusa utvrćena je pojava serozne i hemoragićne tećnosti, dok su jetra i bubrezi bili povećani sa tamnim kongestijama. Na plućima nisu ustanovljene bilo kakve promene kao ni u tkivu slezine, srca i na koųi. Znaćajne promene su mećutim uoćene u placenti, bubrezima, jetri i mozgu kod starijih fetusa. Najviše stalno prisutnih lezija je utvrćeno u tkivu mozga starijih fetusa, posebno u delu mozga gde je bila vidljiva intravaskularna akumulacija adventicijskih ćelija, plazma ćelija i ćelija monocitno-makrofagnog sistema. Takva infiltracija pronaćena je i u sivoj i u beloć masi mozga i oko moųdanih ovojnica. Više kapilara je ispoljilo pojavu vaskulitisa. Oųtećenja mozga su bila izraćenija kod fetusa od 42 do 69 dana posle infekcije, ali ne i kod fetusa od 21 do 35 dana od

veštačke infekcije. Nakupine mononuklearnih ćelija su zabeležene u intersticijalnom tkivu bubrega kao i oko glomerula bubrega, odnosno u portalnom području jetre. Slične upalne reakcije su bile difuzno ili fokalno raspoređene u posteljicama fetusa. Fokalna kalcifikacija je ustanovljena u alantohorionu placente bez obzira na vreme gestacije (Slika 7.).



Slika 7. Pobačeni fetusi svinja u različitim stadijumima razvoja (Richard M. Jakowski, 2012)

D. M. Bolt i sar., (1997.) [77] su ispitivali pojavu negojnog miokarditisa kod prasadi za koji su smatrali da je nastala kao posledica infekcije svinjskim parvovirusom. Uzorci tkiva prasadi su ispitani na prisustvo parvovirusa svinja primenom lančane reakcije polimeraze (PCR). Kod petnaest od ukupno dvadeset uzoraka tkiva srčanog mišića sa lezijama je ustanovljeno prisustvo nukleinske kiseline svinjskog parvovirusa.

2.6. DIJAGNOSTIKA INFEKCIJE SVINJA IZAZVANE SVINJSKIM CIRKOVIRUSOM TIP 2 I PARVOVIRUSOM SVINJA

Imajući u vidu da je infekcija svinja izazvana svinjskim cirkovirusom tip 2 i parvovirusom svinja rasprostranjena širom sveta u zaptima svinja i da nanosi značajne ekonomske gubitke u svinjarskoj proizvodnji, danas je u upotrebi više klasičnih i molekularnih metoda koje se koriste u dijagnostici ovih virusnih infekcija životinja. Međutim, ovde treba napomenuti da je detekcija individualnih slučajeva oboljenja izazvanih PCV2 neekonomična i cilj novijih studija predstavlja mogućnost postavljanja dijagnoze na nivou zapata na osnovu kojeg će se sprovoditi mere kontrole i prevencije navedenog oboljenja. Predložen je i način postavljanja ovakve dijagnoze koji se zasniva na dva elementa: (1) značajan porast mortaliteta prasadi posle odlučnja u kombinaciji sa kliničkim simptomima koji odgovaraju PMWS uz detaljnu anamnezu na nivou zapata i (2) postavljanje dijagnoze na osnovu patomorfološkog nalaza kod najmanje jednog od 3 do 5 uginulih prasadi. Pored toga, neophodno je i postavljanje diferencijalne dijagnoze jer klinički simptomi navedene bolesti nisu specifični. U današnje vreme postoji tendencija da se prasad masovno vakciniše protiv infekcije izazvane virusom PCV2 kako na farmama sa klinički manifestnim pojavom oboljevanja, tako i u zaptima sa subklinički inficiranim životinjama. U takvim uslovima, laboratorijska dijagnostika koja prethodi vakcinaciji gubi smisao. Međutim, postavljanje laboratorijske dijagnoze je značajno kakao u zaptima svinja prethodno vakcinisanim protiv infekcije izazvane virusom PCV2 koje pokazuju kliničke simptome koji odgovaraju oboljenju izazvanom navedenim virusom tako i u zaptima u kojima vakcinacija protiv PCV2 nije dala očekivane rezultate. Lan-lan Zeng i sar., (2013.) [78] su primenom metode duplex real-time PCR vršili otkrivanje prisustva svinskog cirkovirusa tipa 2 i parvovirusa svinja u ispitivanim uzorcima. Mešovita infekcija svinja izazvana delovanjem prethodno navedenih virusa je ustanovljena u 18 ispitanih uzoraka. Od ukupno 72 uzorka semena nerastova, 37 je bilo pozitivno na prisustvo virusa PPV, dok je 35 uzoraka bilo pozitivno na prisustvo virusa PCV2. Kresse i sar., (1985.) [73] su izvršili izolaciju parvovirusa svinja iz uzoraka unutrašnjih organa životinja. Prisustvo virusnih antigena je dokazivano primenom testa direktne imunofluorescencije. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost korišćenja navedene metode u rutinskoj dijagnostici infekcija svinja izazvanih svinjskim parvovirusom. J. Maldonado i sar., (2005.) [79] su ispitivali reproduktivne poremećaje kod svinja u pojedinim delovima Španije. Ispitivani su uzorci poreklom od abortiranih i mrtvorodenih fetusa u cilju

identifikacije virusnih patogena koji su bili uzrok ovih reproduktivnih poremećaja. U ispitivanim uzorcima je vršeno otkrivanje prisustva virusa reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja (PRRS), virusa Aujeckijeve bolesti (VAD), svinjskog parvovirusa (PPV) i svinjskog cirkovirusa tipa 2 (PCV2). Ukupno je ispitivano 293 uzoraka poreklom od abortiranih fetusa u posljednjoj trećini graviditeta i mrtvorodne prasadi poreklom od svinja iz 15 provincija. Primenom metode RT-PCR, virus PRRS je ustanovljen u devet uzoraka, dok je prisustvo virusa PCV2 utvrđeno u jednom uzorku. Prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti i parvovirusa svinja nije ustanovljeno u ispitivanim uzorcima. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je virus PRRS jedan od najvažnijih infektivnih agenasa koji je uzročnik pobačaja i preranog prašenja u Španiji. Drugi patogeni (PPV, PCV2 i virus Aujeckijeve bolesti) imaju manji uticaj na reproduktivne poremećaje. Caprioli i sar., (2006.) [80] su vršili otkrivanje prisustva nukleinske kiseline virusa PCV2 u uzorcima krvi, tonzilarnih i rektalnih briseva poreklom od veštački inficiranih svinja primenom metode PCR. U ogledu je učestvovalo ukupno 12 svinja, veštački inficiranih virusom PCV2 u 5. nedelji života. Četiri ogledne svinje su bile imunizovane protiv virusa PRRS, pre izvođenja ogleda veštačke infekcije. Sve ogledne životinje su zatim bile klinički opservirane na prisustvo kliničkih simptoma cirkovirusne infekcije kao što su gubitak telesne težine, otežano disanje, povećanje limfnih čvorova, dijareja i eventualna pojava žuzice. Uzorci krvi (puna krv, serum i plazma), rektalnih i tonzilarnih briseva prikupljeni su najpre pre izvođenja ogleda veštačke infekcije i zatim svaka naredna tri dana sve do 21. dan posle infekcije. Kod uzoraka poreklom od četiri svinje je ustanovljeno prisustvo nukleinske kiseline svinjskog cirkovirusa tipa 2. Kod preostalih osam inficiranih životinja nije utvrđeno prisustvo patoloških lezija u organima, niti prisustvo virusa. U uzorcima krvi prisustvo DNK svinjskog cirkovirusa tipa 2 nije utvrđeno sve do devetog dana od izvođenja ogleda veštačke infekcije. Od dvanaestog dana posle infekcije broj pozitivnih uzoraka krvnog seruma poreklom od životinja je rastao sve do dvadeset prvog dana kada su sve ogledne svinje bile pozitivne na prisustvo virusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da se metoda lančana reakcija polimeraze (PCR) može sa uspehom koristiti za ranu dijagnostiku svinjskog cirkovirusa tipa 2 kod svinja. Jiang Y. i sar., (2010.) [81] su primenom metode multiplex PCR vršili simultanu detekciju virusa PCV2, virusa svinjske kuge, zatim svinjskog parvovirusa i virusa PRRS. Primenom navedene metode je ispitano sedamdeset šest uzoraka svinja starosti od 4 do 12 nedelja, kao i 27 abortiranih fetusa poreklom sa 11 farmi iz provincije Zhejiang u Kini. Uzorci za ispitivanja su bili prikupljeni u periodu od juna

2006.godine do jula 2007.godine. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili prisustvo virusa PCV2 kod 7 uzoraka svinja, virusa klasične svinjske kuge kod 4 uzorka, dok je prisustvo virusa PRRS i virusa PPV utvrđeno kod 3 uzorka. Mešovita infekcija izazvana virusom PCV2 i virusom PPV je ustanovljen a kod dve svinje, virusom PCV2 i PRRS kod 14 svinja, dok je mešana infekcija izazvana virusom PCV2 i virusom klasične svinjske kuge utvrđena kod 5 uzoraka. Mešovita infekcija izazvana virusima PCV2, PRRS i klasične svinjske kuge. Trideset četiri uzorka poreklom od svinja bila su negativna na prisustvo nukleinskih kiselina prethodno navedenih virusa. Liu i sar., (2013.) [11] su primenom multiplex PCR metode vršili otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina nekoliko virusa. Ukupno je ispitano pedeset osam uzoraka pluća, tonzila, limfnih čvorova i slezina, kao i 24 uzorka abortiranih fetusa. Uzorci su bili poreklom sa 20 farmi svinja u porvinciji Fujian u Kini. Prikupljani su u periodu od maja 2011.godine do juna 2012.godine. Primenom prethodno pomenute metode kod 12.19% od ukupnog broja ispitanih uzoraka utvrđeno je prisustvo virusa PRRS i klasične kuge svinja, kod 21.95% uzoraka virusa PRRS i PCV2, dok je kod 13.41% uzoraka bilo ustanovljeno prisustvo virusa klasične kuge svinja i svinjskog cirkovirusa tipa 2. Prisustvo nukleinske kiseline sva tri virusa je utvrđeno kod 3.66% uzoraka. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja metoda multiplex PCR se pokazala kao brza i pouzdana u brznoj identifikaciji prethodno pomenutih virusa u uzorcima poreklom od svinja i da se može koristiti u rutinskoj dijagnostici infekcija svinja izazvanih virusom PCV2, klasične kuge svinja i virusom PRRS. Ogawa i sar. (2009.) [61] su koristili multiplex PCR i multiplex RT-PCR za detekciju svinjskog cirkovirusa tipa 2, virusa Aujeckijeve bolesti, svinjskog parvovirusa, virusa PRRS, virusa japanskog encefalitisa, svinjskog rotavirusa, virusa epidemične dijareje svinja, virusa transmisibilnog gastroenteritisa i getah virusa u uzorcima poreklom od svinja. Ukupno je ispitano 75 uzoraka i to 33 uzorka organa, 16 uzoraka fecesa i 26 uzoraka abortiranih fetusa na prisustvo prethodno pomenutih virusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je kod 32 uzorka utvrđeno prisustvo svinjskog cirkovirusa tipa 2, kod devet uzoraka prisustvo svinjskog parvovirusa i kod devet uzoraka virusa PRRS. Prisustvo nukleinskih kiselina virusa PPV, PRRS i PCV2 je ustanovljeno kod devet ispitanih uzoraka. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost primene metoda multiplex PCR i multiplex RT-PCR u brznoj i pouzdnoj dijagnostici virusnih infekcija izazvanih pojedinim DNK i RNK virusima svinja. Huang i sar., (2013.) [20] su primenom multiplex PCR metode ispitali 58 uzoraka limfnih čvorova, tonzila i pluća svinja poreklom od prasadi starosti od 4 do 8 nedelja poreklom sa 11 farmi.

Prisustvo virusa PCV2 je utvrđeno kod 30 ispitanih uzoraka, virusa PCV1 kod dva uzorka, dok je prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti ustanovljeno u jednom uzorku. Kod osam uzoraka utvrđeno je prisustvo nukleinskih kiselina virusa PCV1 i PCV2, a kod šest uzoraka virusa PCV2 i virusa Aujeckijeve bolesti. Kod tri ispitana uzorka je utvrđeno prisustvo nukleinskih kiselina svinjskog cirkovirusa tipa 2 i svinjskog parvovirusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost korišćenja metode multiplex PCR u brznoj detekciji prisustva prethodno navedenih virusa u uzorcima poreklom od svinja. Soares R i sar., (1999.) [82] su ispitali ukupno 24 uzorka fetusa (pluća, jetra, bubrezi) na prisustvo svinjskog parvovirusa primenom testova hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije, lančane reakcije polimeraze (PCR) i nested PCR. Za izvođenje molekularnih metode korišćeni su prajmeri za visoko konzervirani nestrukturani NS-1 gen. Upoređivanjem dobijenih rezultata ispitivanja istih uzoraka primenom metoda izolacije virusa u kulturi ćelija i PCR, utvrđeno je da je PCR metoda osetljivija jer je, njenom primenom, detektovana virusna nukleinska kiselina u višim razređenjima supernatantne tečnosti poreklom od uzoraka inokulisanih kultura ćelija u odnosu na razređenja navedene tečnosti u kojima je primenom prethodno navedene metode i testova hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije utvrđeno prisustvo antigena svinjskog parvovirusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je metoda nested PCR osetljivija metoda od konvencionalnog PCR. Naime, tokom ispitivanja je utvrđeno da pet ispitivanih uzoraka poreklom od svinja – fetusa, koji su primenom metode PCR bili negativni na prisustvo nukleinske kiseline virusa, bilo pozitivno posle ispitivanja primenom metode nested PCR. Pored ovoga, na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja je potvrđeno da se metode nested PCR i PCR mogu sa uspehom koristiti u rutinskoj dijagnostici parvovirusne infekcije svinja. McKillen J. i sar., (2007.) [50] su ispitali četrnaest uzoraka tkiva i organa svinja poreklom iz Severne Irske. Ispitani su uzorci slezine, mezenterijalnih limfnih čvorova, tonzila i mozga primenom metode real-time PCR. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da se prethodno navedena metoda može koristiti u cilju brze, precizne i pouzdane dijagnostike infekcija svinja izazvanih virusom Aujeckijeve bolesti, zatim virusom afričke svinjske kuge, svinjskim cirkovirusom tipa 2 i svinjskim parvovirusom. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja je potvrđeno da je metoda real-time PCR posebno pogodna za primenu u cilju otkrivanja prisustva nukleinskih kiselina prethodno navedenih virusa u uzorcima krvi, seruma, a posebno pojedinih tkiva. U poređenju sa konvencionalnim PCR, ova metoda se pokazala kao osetljivija i specifičnija. Militior i sar., (1991.) [83] su koristili metodu lančane reakcije polimeraze u cilju

detekcije prisustva nukleinske kiseline svinjskog parvovirusa u ispitivanim uzorcima poreklom od svinja. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost korišćenja navedene metode u svrhu brze i pouzdane dijagnostike parvovirusne infekcije svinja. Wilhelm S. i sar. (2006.) [84] su koristili real-time PCR metodu za detekciju prisustva nukleinske kiseline svinjskog parvovirusa u ispitivanim uzorcima. Ispitani su supernatanti ćelija prethodno inokulisanih ispitivanim uzorcima, zatim deset različitih organa prevremeno rođene prasadi i mumificiranih fetusa i to uzorci srčanog mišića, bubrega, pluća, slezine, duodenuma, jejunuma, timusa i limfnih čvorova. Primenom navedene metode je utvrđeno prisustvo nukleinske kiseline svinjskog parvovirusa u svim uzorcima u kojima je prethodno primenom konvencionalne PCR metode ustanovljeno prisustvo pomenutog virusa. Specifičnost metode real-time PCR je ispitivana korišćenjem virusa Aujeckijeve bolesti, svinjskog cirkovirusa tipa 2, virusa PRRS, virusa panlukopenije mačaka kao i parvovirusa B19 kod ljudi. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost primene metode real-time PCR u brznoj i pouzdanoj rutinskoj dijagnostici parvovirusne infekcije kod svinja. Hong-Ying Chena i sar., (2009.) [85] su primenom metoda real-time PCR i PCR ispitivali uzorke svinja na prisustvo svinjskog parvovirusa. Primenom metode PCR prisustvo nukleinske kiseline svinjskog parvovirusa je ustanovljeno u 48 od ukupno 80 uzoraka. Svi uzorci svinja koji su bili pozitivni na prisustvo svinjskog parvovirusa posle ispitivanja konvencionalnim PCR, bili su pozitivni i posle ispitivanja metodom real-time PCR. Dvanaest uzoraka od ukupno 32 koji su bili negativni na prisustvo virusne nukleinske kiseline posle ispitivanja primenom metode PCR, bili su pozitivni na prisustvo virusa posle ispitivanja primenom metode RT-PCR. F. Westenbrink i sar., (1989.) [86] su izvršili uporedno ispitivanje osetljivosti i specifičnosti metode ELISA i testa inhibicije hemaglutinacije u dijagnostici parvovirusne infekcije svinja. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali podjednaku osetljivost primenjenih metoda za otkrivanje prisustva i titra specifičnih antitela protiv parvovirusa svinja u uzorcima krvnog seruma. Međutim, autori navedenih ispitivanja su dali prednost korišćenju metode ELISA u široj upotrebi u dijagnostičke svrhe. Značajan broj autora u svetu se do danas bavio molekularnom karakterizacijom pojedinih sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2 i svinjskog parvovirusa. Tako su Ramos i sar., (2013.) [25] vršili molekularnu karakterizaciju sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2 poreklom od svinja sa teritorije Urugvaja. Analizirana je nukleotidna sekvenca *cap* gena virusa i ustanovljeno je da postoji visok stepen sličnosti između nukleotidnih sekvenci sojeva virusa PCV2 identifikovanih u Urugvaju, odnosno visok stepen sličnosti između

urugvajskih sojeva virusa i brazilskih sojeva virusa PCV2. Ispitane nukleotidne sekvence urugvajskih sojeva virusa PCV2 su imale visok stepen sličnosti sa sekvencama argentinskih sojeva virusa koja je iznosila od 99,1 do 99,5%. Argentinski sojevi virusa PCV2 su istovremeno pokazivali visok stepen sličnosti sa sojevima svinjskog cirkovirusa tipa 2 poreklom iz Francuske, Kube, Kanade i SAD. Filogenetska analiza urugvajskih sojeva virusa je pokazala da pripadaju genotipu 2a virusa PCV2. Chanhee Chae i sar., (2012.) [26] su izvršili molekularnu karakterizaciju sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2 identifikovanih kod svinja na teritoriji Južne Koreje. Od ukupno 21 soja virusa, sedamnaest sojeva je pripadalo genotipu PCV2b virusa. Ostali sojevi virusa identifikovani na teritoriji Južne Koreje su pripadali genotipovima PCV2a i PCV2c. Molekularna karakterizacija sojeva virusa PCV2 koji su pripadali genotipu PCV2b je pokazala da postoji visok stepen sličnosti između genoma navedenih sojeva virusa koji se kretao od 94.6% do 99.6%. Ove varijacije su bile izražene u delu ORF2 regiona genoma virusa i kretale su se od 91.1% do 99.7%. ORF1 region genoma svinjskog cirkovirusa tipa 2 je visoko konzerviran u kod njega nisu utvrđene značajne varijacije u redosledu nukleotida (od 96.5% do 100%). Wei i sar., (2013.) [27] su ispitivali prevalenciju različitih genotipova svinjskog cirkovirusa tipa 2 na području južne Kine u periodu od 2011. godine do 2012.godine. Toko ispitivanja je izvršena molekularna karakterizacija i filogenetska analiza ukupno 66 sojeva navedenog virusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da su identifikovani sojevi virusa PCV2 pripadali genotipu PCV2a i genotipu PCV2b virusa. Međutim, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je genotip PCV2b virusa dominantan na području južne Kine. Molekularna karakterizacija identifikovanih sojeva virusa je potvrdila da je značajan stepen sličnosti između nukleotidnih sekvenci ORF2 regiona genoma virusa između sojeva virusa PCV2 koji se kretao od 89.3% do 100%. Vlaskova i sar., (2011.) [28] su izvršili molekularnu karakterizaciju identifikovanih sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2 poreklom od svinja sa teritorije Slovačke. Ukupno je ispitano 120 uzoraka poreklom od svinja sa farmi na kojima je utvrđena pojava multisistemskog sindroma kržljivosti prasadi posle zalučenja. Prisustvo pomenutog virusa je ustanovljeno kod 77 ispitanih uzoraka primenom metode PCR. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da identifikovani sojevi svinjskog cirkovirusa tipa 2 kod svinja na teritoriji Slovačke pripadaju genotipovima PCV2a i PCV2b navedenog virusa. Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su odgovarajući zaključci koji su podrazumevali to da su izolati virusa identifikovani na teritoriji Slovačke veoma slični sa izolatima virusa identifikovanih u drugim delovima Centralne i Zapadne Evrope.

Larochelle i sar., (2002.) [10] su izvršili molekularnu karakterizaciju i filogenetsku analizu 34 soja svinjskog cirkovirusa tipa 2 identifikovanih u uzorcima svinja poreklom iz istočnih delova Kanade u periodu od 1990.godine do 2001.godine. Nukleotidne sekvence navedenih sojeva virusa su upoređivane sa analognim sekvencama 36 sojeva virusa PCV2 objavljenih u genskoj bazi podataka. Tokom ispitivanja je utvrđeno da se stepen sličnosti između nukleotidnih sekvenci 34 soja virusa PCV2 identifikovanih kod svinja u Istočnoj Kanadi međusobno kretao od 96% do 100%. Istovremeno, navedeni sojevi virusa su bili slični sa sojevima virusa identifikovanih na području Zapadne Kanade, SAD, Evrope i Azije. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da je ORF1 region genoma virusa visoko konzerviran kod svih ispitanih sojeva virusa PCV2, odnosno da se stepen sličnosti između nukleotidnih sekvenci kod svih sojeva kretao od 97% do 100%. Analizirajući stepen sličnosti nukleotidnih sekvenci ORF2 regiona genoma virusa PCV2 ustanovljeno je da se on, kod svih ispitanih sojeva navedenog virusa kretao od 91% do 100%. An i sar., (2007.) [30] su izvršili molekularnu karakterizaciju sojeva virusa PCV2 identifikovanih u Južnoj Koreji u periodu od 1999.godine do 2006.godine. Ispitani su uzorci jetre, slezine, tonzila i limfnih čvorva svinja koje su ispoljavale kliničke simptome multisistemskog sindroma kržljivosti zalučene prasadi (PMWS), odnosno promene na koži i bubrezima u vidu sindroma PDNS. U ispitivanjima je korišćeno 36 identifikovanih sojeva virusa PCV2. Tokom ispitivanja je utvrđeno da su nukleotidne sekvence svih identifikovanih sojeva virusa uključenih u molekularnu karakterizaciju bili međusobno slične, odnosno da se stepen sličnosti redosleda nukleotida u ORF2 regionu genoma virusa kretao od 88% do 100%. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da su u jednoj filogenetskoj grupi bili svrstani sojevi virusa PCV2 poreklom iz Holandije, Tajlanda, Velike Britanije i Južne Koreje, dok su drugoj grupi pripadali sojevi poreklom iz Japana, Kanade, Španije. Xu i sar., (2013.) [36] su upoređivali nukleotidne sekvence VP2 gena soja NE/09 virusa PPV i drugih sojeva navedenog virusa poreklom iz Kine. Dobijeni rezultati su pokazali visok stepen sličnosti između soja NE/09 parvovirusa svinja i drugih sojeva virusa PPV identifikovanih na teritoriji Kine, odnosno da NE/09 predstavlja soj mutant već postojećeg sojeva svinjskog parvovirusa koji ima najveću prevalencu infekcije kod svinja na teritoriji Kine. Cadar D. i sar., (2013.) [17] su ispitali uzorke poreklom od 842 divlje svinje koji su prikupljeni u periodu od 2006.godine do 2011.godine u zapadnim regionima Rumunije. Pored navedenih uzoraka, ispitano su i uzorci poreklom od 120 domaćih svinja sa deset različitih farmi. Dobijeni rezultati su ukazali da je svinjski parvovirus najviše divergirao u poslednjih 20 do 60 godina i da

su sojevi navedenog virusa identifikovani kod divljih svinja pokazali veću genetičku raznolikost u odnosu na sojeve svinjskog parvovirusa identifikovane kod domaćih svinja. Pored toga, tokom ispitivanja je u jednom broju uzoraka poreklom od divljih svinja utvrđeno prisustvo visoko virulentnog 27 soja virusa PPV. Ren X. i sar., (2013.) [35] su proučavali evolutivni razvoj i filogeniju svinjskog parvovirusa. Ispitano je ukupno 46 nukleotidnih sekvenci sojeva navedenog virusa poreklom iz genske baze podataka. Dobijeni rezultati ispitivanja NS1, VP2 i celog ORF regiona genoma parvovirusa svinja su pokazali da je zajednički predak svim sojevima pomenutog virusa postojao još pre oko 250 godina.

2.7. IMUNOPROFILAKSA CIRKOVIRUSNE I PARVOVIRUSNE INFEKCIJE SVINJA

Imajući u vidu značajne ekonomske gubitke u svinjarskoj proizvodnji koji nastaju kao posledica infekcije izazvane svinjskim cirkovirusom tip 2, danas se u mnogim zapaćtima svinja u svetu primenjuju mere aktivne veštaćke imunizacije ųivotinja primenom više vrsta komercijalnih vakcina dostupnih na trųištu. Imunizacija svinja protiv infekcije izazvane svinjskim cirkovirusom tipa 2 se danas najćeće primenjuje kod zalućene prasadi. Pored zašćite ųivotinja od infekcije, imunizacija prasadi doprinosi i poboljšanju proizvodnih parametara vakcinisanih ųivotinja. Do danas je pripremljeno više vakcina protiv infekcije svinja izazvanih virusom PCV2, a evaluacija imunopofilaktićkog delovanja istih je bila i predmet istraųivanja pojedinih autora. Pejsak i sar., (2010.) [87] su potvrdili da vakcina Circovac® kod imunizovanih ųivotinja izaziva povećanje prosećnog dnevnog prirasta i smanjuje stopu mortaliteta prasadi posle zalućenja. Veći broj studija dokazuje znaćajno smanjenje stepena mortaliteta, duųine trajanja viremije, kao i povećanje dnevnog prirasta kod vakcinisanih ųivotinja posle vakcinacije CircoFLEX® vakcinom [88]. Ovde treba napomenuti da visok titar maternalnih antitela ometa aktivnu serokonverziju nakon vakcinacije, iako vakcina znaćajno redukuje pojavu viremije i širenje virusa u organizmu [89]. U studiji u kojoj je korišćena Ingelvac Circoflex vakcina, nije bilo razlike u efikasnosti vakcine, bez obzira da li su prasad vakcinisana u 3-oj ili 6-oj nedelji starosti, što ukazuje da maternalna antitela nemaju na ovo znaćajnog uticaja [90]. Danas se pored inaktivisanih vakcina u cilju vakcinacije svinja koriste i subjedinaćne vakcine [34], odnosno DNK vakcine [70, 61]. Efikasnost korišćenja komercijalnih dostupnih vakcina protiv infekcije izazvane virusom PCV2 je potvrćena serološkim ispitivanjem imunizovanih ųivotinja [42, 37]. Imunopofilaksa infekcije svinja izazvane parvovirusom svinja se mora izvoditi planski kako bi se kod ųivotinja sprećili poremećaji u reprodukciji. Vakcinacija je efikasan naćin prevencije pobaćaja i gubitka fetusa kod nazimi. Analizama je utvrćeno da je najbolje i ekonomski najisplativije da se vakcinišu sve krmaće u zapatu namenjene za reprodukciju [62]. Mećutim, ipak treba naglasiti da se parvovirusna infekcija moųe javiti i u vakcinisanim zapaćtima svinja. Ispitivanja prisustva specifićnih antitela u uzorcima krvnog serum svinja protiv parvovirusa svinja vršena su u više zemalja u svetu kao što su Maćarska, Velika Britanija i Italija [90]. Ova ispitivanja su pokazala da su antitela bila utvrćena u uzorcima krvnog seruma kod 70% do 100% ispitanih zapaća svinja.

Ispitivanja u Finskoj pokazala su da kod nekih zapata svinja je prisutan visok titar specifičnih antitela protiv parvovirusa svinja što je sprečavalo pojavu infekcije navedenim virusom.

F.G. Antonis i sar., (2006.) [92] ispitivali su uticaj novih rekombinantnih vakcina na prevenciju parvovirusne infekcije svinja. Nove rekombinantne vakcine su pripremljene na specifičan način korišćenjem vektorskog sistema sa bakulavirusom i sadrže virusu slične partikule (PPV-VLPs). Takođe, u prisustvu adjuvanasa zaštitini efekat ovih rekombinantnih subjediničnih vakcina je odličan. Prednosti rekombinantnih vakcina su mnogobrojni. Pre svega patogen se isključuje potpuno iz proizvodnje vakcine, što eliminiše rizike kao što su rekurencija virulencije ili nepotpuna inaktivacija sojeva virusa. U ovim rekombinantnim vakcinama partikule nalik virusu imaju strukturu autentične virusne čestice i veoma su efikasne u stimulaciji ćelijskog i humoralnog imunološkog odgovora [93].

3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije je bio identifikacija i molekularna karakterizacija cirkovirusa tipa 2 i parvovirusa kod svinja ekstenzivno gajenih na teritoriji Republike Srpske, BiH. Da bi se ostvario postavljeni cilj, postavljeni su sledeći zadaci:

1. Prikupljanje uzoraka (slezina, limfni čvorovi) poreklom od nevakcinisanih svinja različitih starosnih kategorija iz ekstenzivnog uzgoja, sa ili bez kliničkih simptomima oboljenja.
2. Ispitivanje prisustva genoma cirkovirusa tip 2 svinja i parvovirusa svinja u prikupljenim uzorcima primenom lančane reakcije polimeraze (PCR).
3. Utvrđivanje eventualnog prisustva mešane infekcije svinja izazvane cirkovirusom tip 2 svinja i parvovirusom svinja.
4. Izolacija svinjskog cirkovirusa tipa 2 iz uzoraka u kojima je prethodno utvrđeno prisustvo nukleinskih kiselina virusa posle inokulacije uzoraka u kulture ćelija i potvrda prisustva virusa primenom metode lančane reakcije polimeraze.
5. Izolacija parvovirusa svinja iz uzoraka u kojima je prethodno utvrđeno prisustvo nukleinskih kiselina virusa posle inokulacije uzoraka u kulture ćelija metodom inhibicije hemaglutinacije (HI test) i primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR).
6. Sekvenciranje genoma identifikovanih sojeva virusa PCV2 i PPV u cilju određivanja redosleda nukleotida dela ORFV1 regiona genoma cirkovirusa 2 svinja, odnosno redosleda nukleotida dela VP2 gena parvovirusa svinja primenom metode po Sanger-u.
7. Filogenetskom analizom izvršiće se upoređivanje sekvenci identifikovanih i eventualno izolovanih sojeva cirkovirusa 2 svinja i parvovirusa svinja ustanovljenih u uzorcima svinja poreklom sa teritorije Republike Srpske sa nukleotidnim sekvencama referentnih sojeva

virusa i virusa izolovanih kod svinja u drugim delovima sveta koje se nalaze u bazi nukleotidnih sekvenci u cilju utvrđivanja sličnosti i razlika između njih.

4. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA

4.1. MATERIJAL

4.1.1. Uzorci tkiva

Ukupno je izvršeno prikupljanje osamdeset zbirnih uzoraka (slezine, limfnih čvorova i pluća) poreklom od nevakcinisanih svinja različitih starosnih kategorija sa ili bez kliničkih simptoma bolesti gajenih u ekstenzivnom načinu gajenja iz različitih regiona Republike Srpske i to regije oko Banja Luke, zatim Dobojsko-Bjeljinske, Sarajevsko-Zvorničke i Trebinjsko-Srbinske. 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 PCV2 i PPV

Referentni soj 1010-Stoon virusa PCV2 (dobijen ljubaznošću NIV Novi Sad, Srbija) je služio kao pozitivna kontrola kod izvođenja lančane reakcije polimeraze (PCR), dok je soj Teen parvovirusa svinja (American Bioresearch, SAD) služio kao pozitivna kontrola kod izvođenja metode PCR i izolacije virusa u kulturi ćelija.

4.1.3. Ćelijske linije

Za dokazivanje prisustva prethodno identifikovanih sojeva virusa PCV2 metodom PCR i izolaciju svinjskog parvovirusa iz uzoraka tkiva u kojima je prethodno dokazano prisustvo nukleinske kiseline virusa metodom PCR, korišćene su dve ćelijske linije PK-15 i SK-6 (IZSBS, Breša, Italija).

4.1.4. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Ekstrakcija nukleinskih kiselina svinjskog cirkovirusa tipa 2 i parvovirusa 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 PCV2 i PPV izvršeno je korišćenjem odgovarajućih prajmera za deo ORF1

regiona genoma svinjskog cirkovirusa tipa 2 (forward 5-CAGCAACATGCCAGCAAGAAGAAT-3 i reverse 5-TCG ATCACACAGTCTCAGTAG-3, Metabion International, Nemačka) i prajmera za deo VP2 gena parvovirusa svinja (forward 5-CACAGAAGCAACAGCAATTAGG-3 i reverse 5-CTAGCTCTTGTGAAGATGTGG-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;
- Agaroz (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);
- pufer za punjenje - 5x loading buffer koji je sadržavao 2,5 g saharoze i 1 ml 2,5% rastvora Bromophenol Blue u 10ml destilovane vode.

4.1.6. PCV2 i PPV direktno sekvenciranje

Za određivanje nukleotidnih sekvenci ORF1 regiona genoma virusa PCV2 i VP2 gena genoma PPV korišćen je metod završetka lanca po Sangeru.

Za izvođenje metode, korišćen je kit QIA quick Purification Kit (proizvođača Qiagen, USA) 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

PCR metodu. 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

Prikupljeni uzorci organa svinja pripremani su za izvođenje metoda lančane reakcije polimeraze i izolacije virusa u kulturi ćelija na taj način što su svi 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 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, odnosno testova hemaglutinacije (HA test) i inhibicije hemaglutinacije (HI test) za identifikaciju izolovanih sojeva parvovirusa svinja.

4.2.2. Ekstrakcija virusne DNK

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

1. Uzorci limfnih čvorova i slezine 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 (vorteksiranja), inkubisani na temperaturi 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 sipano po 500µl Wash Buffer II rastvora.
12. Sve tube sa uzorcima su zatim 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 -20°C i čuvane do početka ispitivanja.

4.2.3. Postupak pravljenja reakcione smeše za izvođenje lančane reakcije polimeraze – PCR

Posle ekstrakcije molekula DNK iz ispitivanih uzoraka, pripremljena je reakciona smeša za izvođenje lančane reakcije polimeraze. Prethodno je izvršeno rastvaranje prajmera za deo ORF1 regiona genoma virusa PCV2 i deo VP2 gena virusa PPV. Sastav reakcionih smeše za izvođenje metoda lančane reakcije polimeraze 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)

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.

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.

4.2.5. Horizontalna gel elektroforeza

Za analizu dobijenih PCR produkata korišćena je horizontalna elektroforeza u agaroznom gelu. Primenom ove metode, umnoženi ciljni fragmenti molekula DNK virusa PCV2 i PPV 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 (1µl/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 8µl svakog uzorka pomešano sa po 2µl 5x pufera za punjenje. Uz uzorke pripreman je i DNK Standard i to tako što je 5µl standarda pomešano sa 2µl5x pufera za punjenje. Uzorci i DNK standard su zatim ubacivani u gel (tzv.

punjenje gela), koji je prethodno postavljen u kadnicu 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 ORF1 regiona genoma virusa PCV2 i dela VP2 gena PPV. Veličina dobijenih fragmenata molekula DNK je upoređivana sa DNK standardom (smeša DNK fragmenata poznatih veličina) radi očitavanja rezultata reakcije. Veličina DNK produkata za virus PCV2 od 703bp i za virus PPV od 203bp smatrani su pozitivnim nalazom.

4.2.6. Postupak sa ćelijskim linijama

Ćelijske linije PK-15 i SK-6 su održavane standardnom 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 100I.J./ml penicilina, 100µg/ml streptomicina 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 tkiva i organa svinja, u kojima je metodom PCR otkriveno prisustvo nukleinskih kiselina virusa PCV2 i PPV, 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 100µl 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 500µl 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).

Otkrivanje prisustva virusa PCV2 u inokulisanim ćelijskim linijama je vršeno primenom metode PCR, po prethodno opisanoj proceduri izvođenja metode, dok je identifikacija sojeva svinjskog parvovirusa eventualno prisutnih u inokulisanim ćelijskim linijama 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.

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

Prikupljeni uzorci organa svinja pripremani su za izvođenje metoda lančane reakcije polimeraze i izolacije virusa u kulturi ćelija na taj način što su svi 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 centrifugovane tokom 10 minuta na 5000o/min, posle čega se dobijeni talog koristio za izvođenje metode PCR, a supernatant sa izvođenje metode izolacije virusa u kulturi ćelija.

Dobijeni rastvori supernatanta poreklom od ispitivanih uzoraka svinja su pojedinačno inokulisani u ćelijske linije PK-15 i SK-6. Inokulisane ćelijske linije su zatim inkubisane na temperaturi od 37°C i svakodnevno opservirane na prisustvo parvovirusa svinja. Posle četiri uzastopne pasaže svih ispitivanih uzoraka pojedinačno, kulture ćelija u kojima se ispoljila pojava citopatogenog efekata su tri puta zamrzavane i odmrzavane radi pripreme uzoraka za izvođenje testova hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije u cilju identifikacije.

Test hemaglutinacije je izvođen sa pripremljenim uzorcima po standardnoj proceduri. 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 25 μ l PBS-a, posle čega je u prve bazenčiće mikroploče pojedinačno dodato po 25 μ l specifičnog imunog seruma protiv parvovirusa svinja, koji su prvo izmešani sa rastvaračem, a zatim se u količini od 25 μ l preneti kroz naredna udubljenja mikroploče sa PBS-om čime su dobijena razređenja seruma od početnog 1:2 do 1:512. U sva udubljenje su zatim dodati uzorci od po 25 μ l 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 50 μ l 0,5% suspenzije eritrocita zamorca. Posle 45 minuta, inkubisanja uzoraka na sobnoj temperaturi, očitavani su rezultat

4.2.9. Metoda PCV2 i PPV direktnog sekvenciranja

Primenom metode direktnog sekvenciranja vršeno je određivanje redosleda nukleotida ORF1 regiona cirkovirusa tipa 2 i dela VP2 gena svinjskog parvovirusa.

Pre izvođenja metode direktnog sekvenciranja urađeno 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 centrifugirana 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.

Za izvođenje cycle sequencing PCR reakcije, PCR mešavina je po jednom uzorku sadržavala sledeće: 2 µl Dye Mix, 2 µl Dye buffer, 1,2µl prajmera F forward, vode 1,8µl i 3µl 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 µl 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 700o/min u trajanju od 2 minuta i potom osušene na sobnoj temperaturi.

Nakon prečišćivanja, u uzorke je dodavano po 10µl 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 PCV2 i PPV 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 PCV2 i PPV 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) PCV sekvence

- PCV1 (AY193712.1), PCV2 izolat WB-H-3 (AY874165.1), PCV2 izolat GER2 (AF201306.1), PCV2 izolat NIVS-3 SRB (HQ378159.1), PCV2 izolat NIVS-5 SRB (HQ378160.1), PCV2 izolat NIVS-6 SRB (HQ378161.1), PCV2 izolat Aust3959 (EU886637.1), PCV2 izolat LZ (DQ363860.1), PCV2 izolat WB-H-5 (AY874167.1), PCV2 izolat DK1987PMWS (EU148504.1), PCV2 izolat NIVS-C SRB (HQ378158.1), PCV2 izolat jvnan (KP313254.1), PCV2 izolat DE222-13 (KP698398.1), PCV22 izolat DE006-14 (KP698402.1), i PCV22 izolat 28031 Mantova (KP231140.1).

B) PPV sekvence

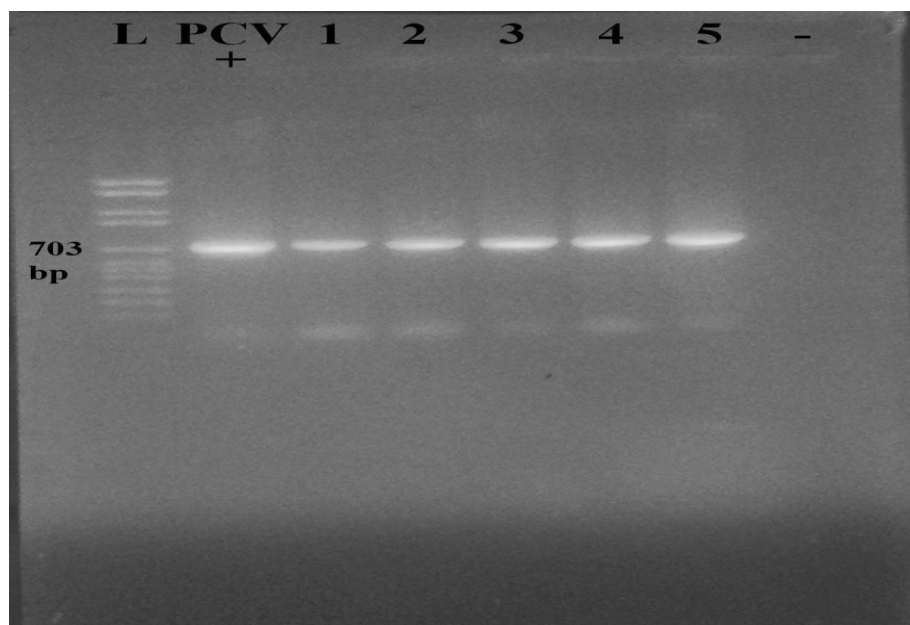
- PPV NADL-2 (NC001718.1), PPV izolat VRI-1 (AY390557), PPV izolat Kresse PPU44978 (U44978.1), PPV izolat LZ (HM627653.1), PPV izolat 77 (KP245936.1) i PPV izolat Challenge (KF049426.1).

5. REZULTATI ISPITIVANJA

5.1. Lančana reakcija polimeraze – PCR

5.1.1. Svinjski cirkovirus tipa 2 (PCV2)

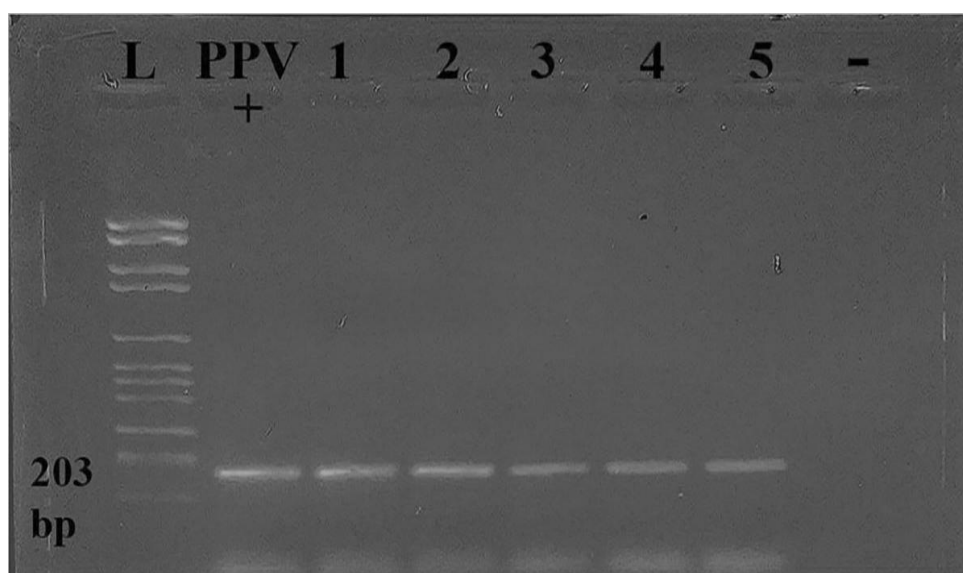
Osamdeset zbirnih uzoraka organa (slezina, limfni čvorovi, pluća) poreklom od nevakcinisanih svinja gajenih u ekstenzivnom načinu uzgoja iz više različitih regiona Republike Srpske je ispitano primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR) na prisustvo svinjskog cirkovirusa tipa 2. Uzorci su prikupljeni posle žrtvovanja svinja i to od životinja koje su bile klinički zdrave kao i od onih kod kojih su utvrđeni klinički simptomi oboljenja respiratornog i reproduktivnog sistema. Utvrđivanje prisustva DNK fragmenata veličine od 703bp smatrano je pozitivnim nalazom. Primenom prethodno navedene metode ukupno šest od osamdeset zbirnih uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo svinjskog cirkovirusa tipa 2, odnosno 7,5% od ukupnog broja ispitanih uzoraka svinja. Pojedinačnim ispitivanjem šest zbirnih uzoraka poreklom od svinja metodom PCR, utvrđeno je prisustvo virusne nukleinske kiseline kod četiri uzorka limfnih čvorova svinja i dva uzorka slezine (Slika 8.).



Slika 8. DNK fragmenti referentnog soja 1010-Stoon virusa PCV2 i identifikovanih sojeva pomenutog virusa (L – DNK standard)

5.1.2. Parvovirus svinja (PPV)

Prikupljeni uzorci poreklom od navakcinisanih svinja različitih starosnih kategorija koji su prethodno bili ispitani na prisustvo svinjskog cirkovirusa tipa 2 su pojedinačno ispitani na prisustvo svinjskog parvovirusa primenom metode PCR. Utvrđivanje prisustva DNK fragmenata veličine od 203bp smatrano je pozitivnim nalazom. Kod pet, odnosno 6,25% zbirnih uzoraka od ukupno osamdeset ispitanih, utvrđeno je prisustvo nukleinske kiseline prethodno navedenog virusa. Pojedinačnim ispitivanje pet zbirnih uzoraka organa (slezina, limfni čvorovi, pluća) primenom metode PCR, utvrđeno je prisustvo nukleinske kiseline parvovirusa svinja u pet uzoraka limfnih čvorova poreklom od pet različitih životinja (Slika 9.).



Slika 9. DNK fragmenti referentnog soja Teen parvovirusa svinja i identifikovanih sojeva navedenog virusa (L – DNK standard)

5.1.3. Mešovita infekcija

Primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR), mešana infekcija izazvana svinjskim cirkovirusom tipa 2 i parvovirusom svinja ustanovljena je kod tri uzorka limfnih čvorova poreklom od tri različite životinje, odnosno kod 3,75% od ukupnog broja životinja od kojih su prikupljeni uzorci za ispitivanja.

5.1.4. Izolacija virusa PCV2 i PPV u ćelijskim linijama

PCV2

Svi uzorci svinja, u kojima je prethodno metodom lančane reakcije polimearaze utvrđeno prisustvo virusa PCV2, su pojedinačno inokulisani u ćelijske linije PK-15 i SK-6. Ovde treba napomenuti da virus PCV2 u ćelijskim linijama ne daje vidljiv citopatogeni efekat, tako da se u laboratorijskim uslovima danas uglavnom dokazuje primenom nekih molekularnih i imunohistohemijskih metoda. Posle 72h od inokulacije, vršeno je ispitivanje uzoraka inokuliranih ćelija na prisustvo nukleinske kiseline virusa PCV2 primenom metode PCR. Ni u jednom uzorku ćelija nije utvrđeno prisustvo navedenog virusa.

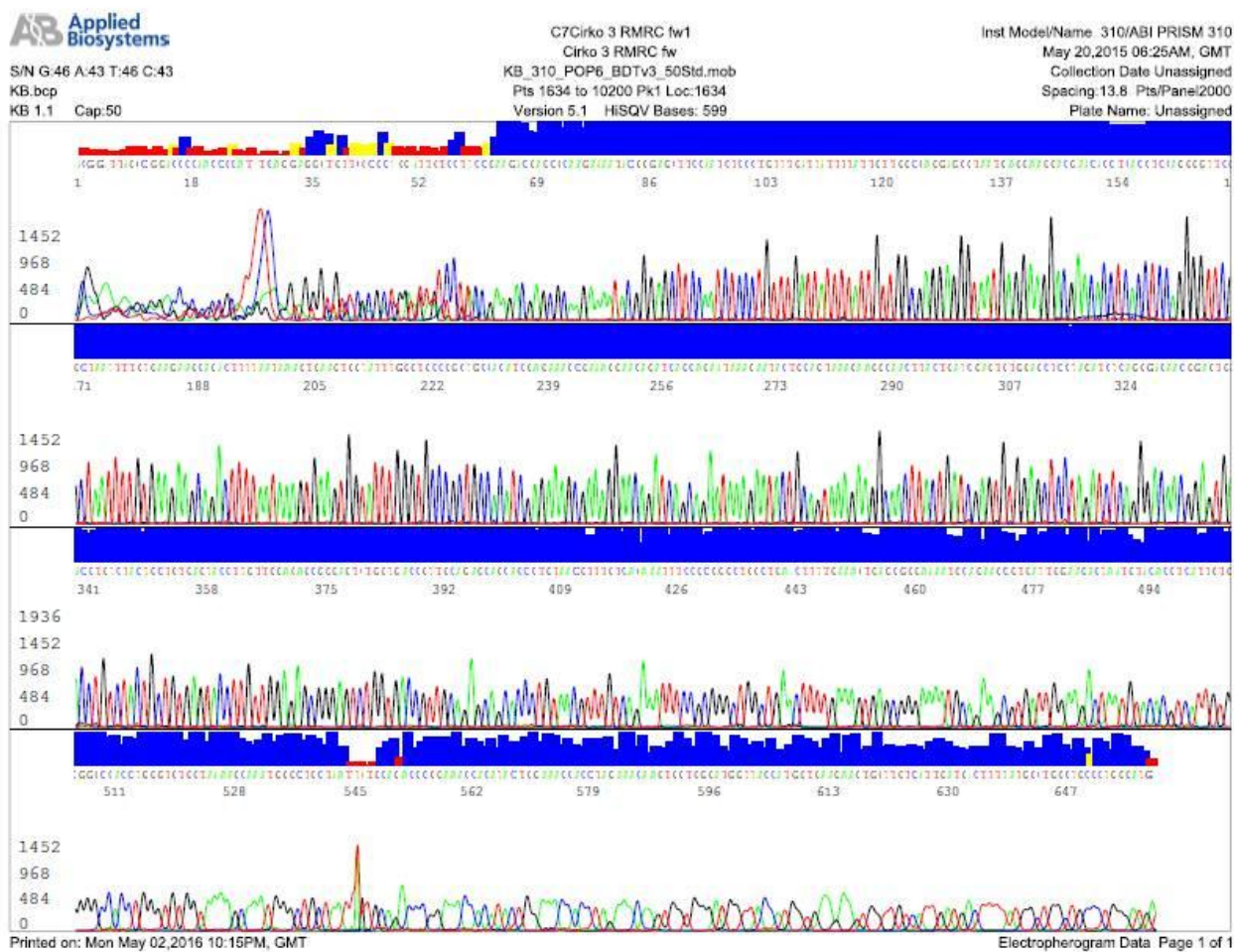
PPV

Svi uzorci svinja su pojedinačno inokulisani u ćelijske linije PK-15 i SK-6 i ispitani na prisustvo svinjskog parvovirusa. Imajući u vidu biološke karakteristike navedenog virusa, odnosno literaturne podatke prema kojima se predlažu višeskratne pasaže virusa u ćelijskim linijama, svi ispitivani uzorci su pojedinačno četiri puta uzastopno inokulisani u navedene ćelijske linije. Poznato je da svinjski parvovirus u kulturama ćelija daje vidljiv citopatogeni efekat (CPE). Posle četvrte pasaže uzoraka utvrđena je pojava citopatogenog efekata u pojedinim inokuliranim ćelijskim linijama. Identifikacija eventualno izolovanih sojeva svinjskog parvovirusa izvršena je primenom testova hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije. Primenom pomenutih testova, ni u jednom ispitivanom uzorku nije izvršena identifikacija parvovirusa svinja. Primenom metode PCR po prethodno opisanom protokolu nije izvršena identifikacija nukleinske kiseline virusa PPV u uzorcima inokuliranih ćelijskih linija.

5.1.5. Nukleotidne sekvence i filogenetska analiza

5.1.5.1. PCV2

Primenom metode direktnog sekvenciranja metodom po Sanger-u, kod svih šest identifikovanih sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2 izvršeno je određivanje redosleda nukleotida dela ORF1 regiona genoma virusa. Rezultati sekvenciranja dobijeni su u vidu elektroferograma (slika 10.).



Slika 10. Izgled elektroferograma PCV2 izolata na osnovu analize ORF1 gena

U tabeli 1a. su kao primer prikazane dobijene nukleotidne sekvence dva virusa PCV2 poreklom od svinja sa teritorije Republike Srpske.

Tabela br. 1a – nukleotidne sekvence dva virusa PCV2 poreklom od svinja sa teritorije Republike Srpske

ID	Porcine circovirus-2
PCV 2	GGAAGAAGCGGACCCCAACCATATAAAAGGTGGGTGTTACGCTGAATAATCCTTCCGAAGACGAGCGCAAG AAAATACGGGAGCTCCAATCTCCCTATTTGATTATTTATTGTTGGCGAGGAAGTAATGAGGAGGGCCGAAC ACCCCACCTACAGGGGTTTCGCAAATTTGTGAAGAAGCAAACCTTTAATAAAAGTGAAGTGGTATTTGGTGCCC GCTGCCACATCGAGAAAGCGAAAGGAACAGATCAGCAGAATAAAGAATATTGCAGTAAAGAAGGCAACTTAC TGATAGAATGTGGAGCTCCTAGATCTCAAGGACAACGGAGTGACCTCTACTGCTGTGAGTACCTTGTGGAG AGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCTGTAACGTTTGTGAGAAATTTCCGCGGGCTGGCTGAAC TTTTGAAAGTGAGCGGGAAAATGCAGAAGCGTGATTGGAAGACGAATGTACACGTCATTGTGGGGCCACCTG GGTGTGGCAAAGCAAATGGGCTGCTAATTTGCAGACCCGAAACCACATACTGAAACCACCTAGAAACAA GTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTTTTATGGCTGGCTGCCGTGGGATGAT CACTGAGACTGTGTGATCGA
PCV 2	AAAGGTGGGTGTTACGCTGAATAATCCTTCCGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGAGCTCCAATCTCCCT ATTTGATTATTTATTGTTGGCGAGGAAGTAATGAGGAGGGCCGAACACCCCaCCTACAGGGGTTTCGCAAATT TTGTGAAGAAGCAAACCTTTAATAAAAGTGAAGTGGTATTTGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAAAGCGAAAGG AACAGATCAGCAgAATAAAGAATATTGCAGTAAAGAAGGCAACTTACTGATAGAATGTGGAGCTCCTAgATCTC AAGGACAACGGAGTGACCTCTACTGCTGTGAGTACCTTGTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCagA GCAGCACCTGTAACGTTTGTGAGAAATTTCCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAGTGAGCGGGAAAATGCAG AAGCGTGATTGGAAGACGAATGTACACGTCATTGTGGGGCCACCTGGGTGTGGCAAAGCAAATGGGCTGCT AATTTTGCAGACCCGAAACCACATACTGAAACCACCTAGAAACAAGTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAAG AAGTGGTTGTTATTGATGACTTTTATGGCTGGCTGCCGTGGGATGATCTACTGAGAC

Upotrebom BLAST programa (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*), konsenzus sekvencama je upoređena sa sekvencama ORF1 regiona PCV2 genoma, dostupnim u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Identifikacija (slika 11. i slika 12.) je izvršena poređenjem sa poznatim sekvencama na osnovu više od 95% sličnosti.

BLAST®

Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/BLAST/blastn suite/](#) Formatting Results - SNCDMWUX01R

[Formatting options](#)

[Download](#)

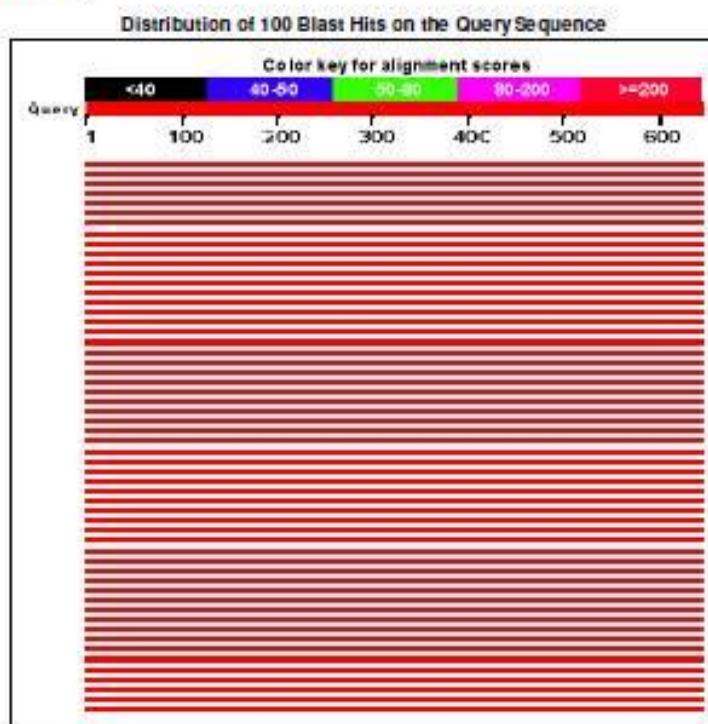
[Blast report description](#)

Nucleotide Sequence (642 letters)

RID [SNCDMWUX01R](#) (Expires on 06-25 21:33 pm)

Query ID	id Query_149295	Database Name	nr
Description	None	Description	Nucleotide collection (nr)
Molecule type	nucleic acid	Program	BLASTN 2.2.31+
Query Length	642		

Graphic Summary



Slika 11. Analiza konsenzus sekvence PCV2 izolata primenom BLAST programa

Descriptions

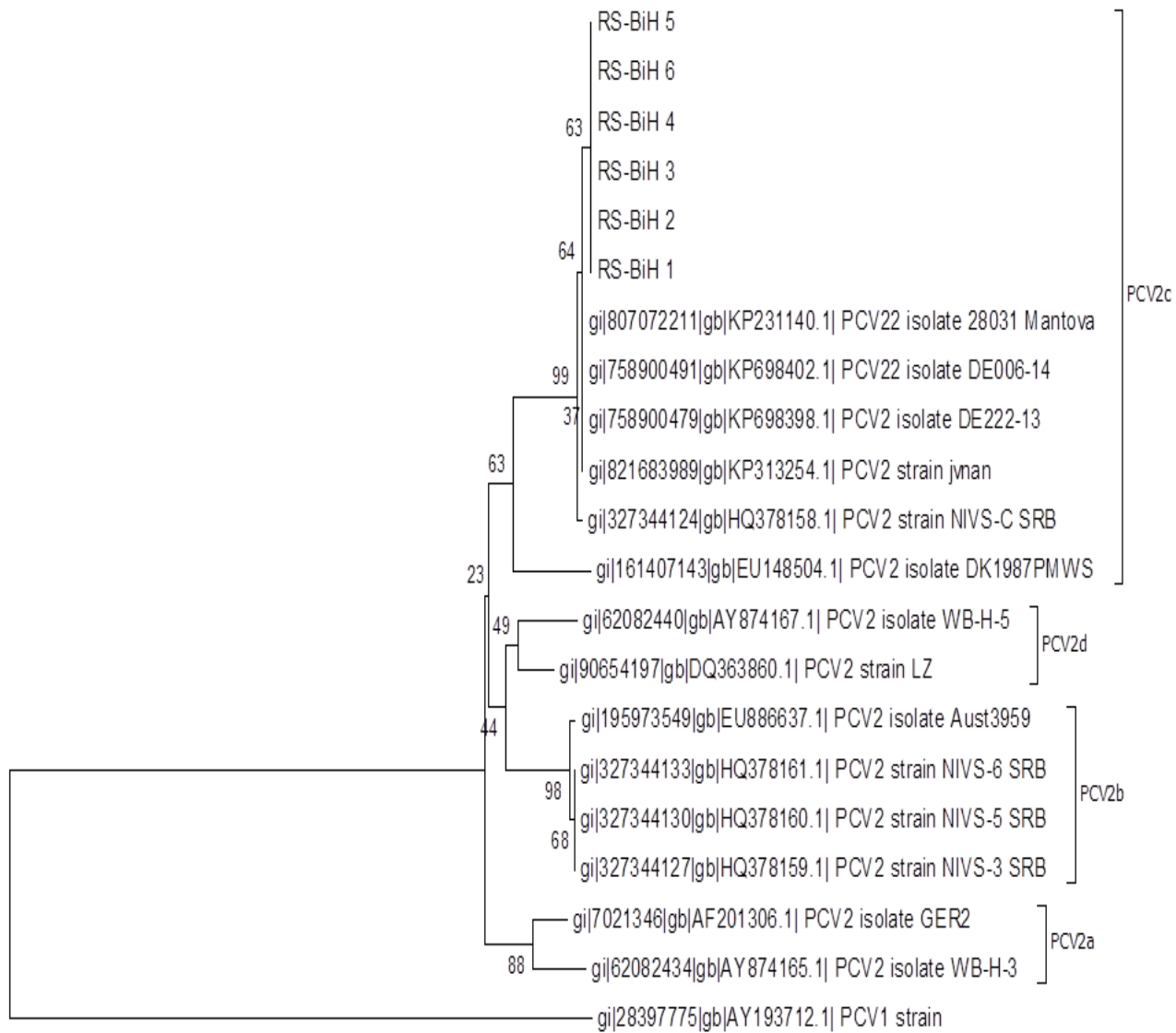
Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Porcine circovirus-2 strain jvnan, complete genome	1181	1181	100%	0.0	99%	KP313254.1
Porcine circovirus-2 isolate 28031_Mantova_32_13/12/2013, complete genome	1181	1181	100%	0.0	99%	KP231140.1
Porcine circovirus-2 isolate DE006-14, complete genome	1181	1181	100%	0.0	99%	KP698402.1
Porcine circovirus-2 isolate DE222-13, complete genome	1181	1181	100%	0.0	99%	KP698398.1
Porcine circovirus 2 isolate PCV-1-3, complete genome	1181	1181	100%	0.0	99%	KC515029.1
Porcine circovirus 2 isolate PCV-G, complete genome	1181	1181	100%	0.0	99%	KC515025.1
Porcine circovirus 2 isolate PCV-D, complete genome	1181	1181	100%	0.0	99%	KC515022.1
Porcine circovirus 2 isolate PCV-38, complete genome	1181	1181	100%	0.0	99%	KC515020.1
Porcine circovirus 2 isolate PCV-6, complete genome	1181	1181	100%	0.0	99%	KC515019.1

Slika 12. Analiza konsenzus sekvence PCV2 izolata primenom BLAST programa

Međusobnim upoređivanjem nukleotidnih sekvenci nukleotidnih sekvenci dela ORF1 regiona svih šest identifikovanih sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2 poreklom od svinja sa teritorije Republike Srpske, utvrđeno je da su iste ispoljavale izuzetno visok stepen sličnosti (99%).

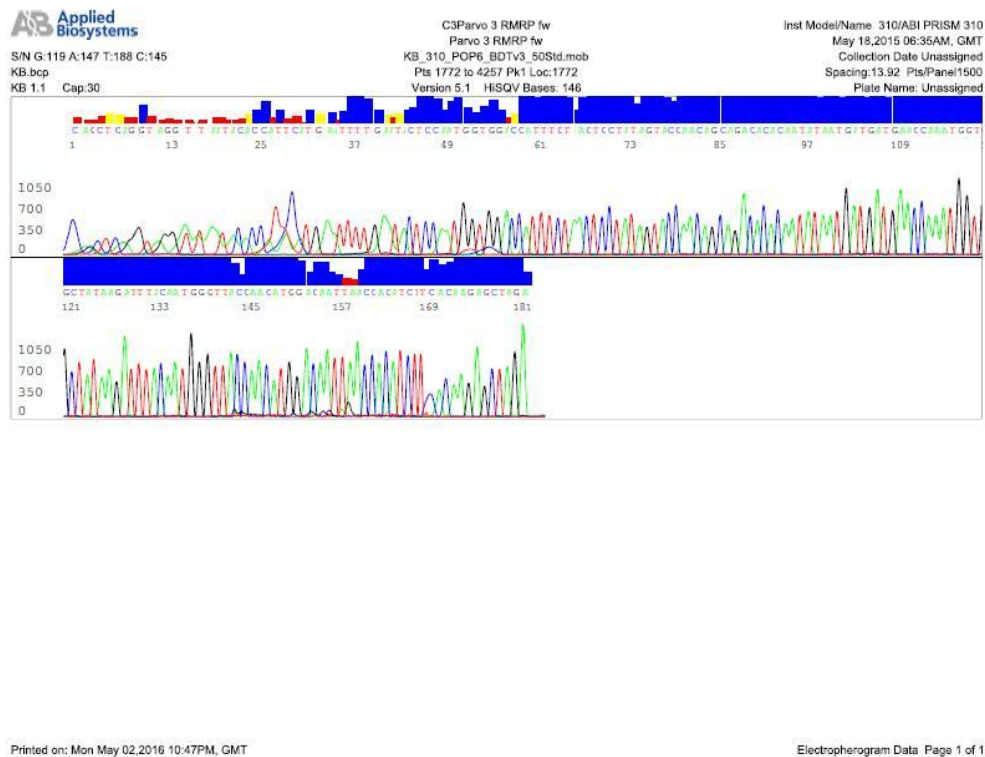
Dobijeni rezultati izvođenja metode direktnog sekvenciranja po Sanger-u su potvrdili visok stepen sličnosti između nukleotidnih sekvenci šest virusa identifikovanih kod svinja na teritoriji Republike Srpske sa nukleotidnom sekvencom soja Mantova virusa PCV2 izolovanog kod svinja u Italiji, zatim sa sekvencama sojeva DE006-14 i DE222-13 izolovanih kod svinja u Nemačkoj, kao i sa sekvencom soja Jvnan koji je izolovan kod svinja u Kini. Nukleotidne sekvence šest identifikovanih virusa PCV2 su imale niži stepen sličnosti sa nukleotidnim sekvencama sojeva NIVS-C identifikovanog kod svinja u Sbjici i DK1987PMWS, izolovanog kod svinja u Danskoj. Filogenetskom analizom, u koju su bili uključeni svi prethodno navedeni sojevi virusa, utvrđeno je da šest virusa PCV2 identifikovanih kod svinja u Republici Srpskoj, pripadaju genotipu PCV2c navedenog virusa (Slika 13.).



Slika 13. Filogenetsko stablo sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2

5.1.5.2. PPV

Primenom metode direktnog sekvenciranja po Sanger-u, izvršeno je određivanje redosleda nukleotida dela gena koji kodira sintezu VP2 proteina svinjskog parvovirusa svih pet identifikovani sojeva virusa. Rezultati sekvenciranja dobijeni su u vidu elektroferograma (slika 14.).



Slika 14. Izgled elektroferograma PPV izolata na osnovu analize VP2 gena

U tabeli 1b. su kao primer prikazane dobijene nukleotidne sekvence dva PPV virusa utvrđenih kod svinja sa teritorije Republike Srpske.

Tabela br. 1b – Nukleotidne sekvence dva svinjska parvovirusa identifikovana kod svinja na teritoriji Republike Srpske

ID	Porcine parvovirus
PPV	TTTTGaATACTCCAATGGTGGACCATTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCAGACACACAATATAATGATGATG AACCAAATGGTGCTATAAGATTTACAATGGGTTACCAACATGGACAATTAACCACATCTTcaCAAGAGCTAGA A
PPV	ACCATTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCAGACACACAATATAATGATGATGAACCAAATGGTGCTATAAGA TTTACAATGGGTTACCAACATGGACAATTAACCACATCTTCACAAGAGC

Upotrebom BLAST programa (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*), konsenzus sekvenca je upoređena sa sekvencama VP2 regiona PPV genoma, dostupnim u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Identifikacija (slika 15. i slika 16.) je izvršena poređenjem sa poznatim sekvencama na osnovu više od 95% sličnosti.

BLAST ®

Basic Local Alignment Search Tool

NCBI [BLAST](#) [Help](#) [Feedback](#) [Formatting Results](#) - [NLM/NCBI](#)

[Advanced Search](#)
[Help](#)
[What's new/updates](#)

Nucleotide Sequence (100 letters)

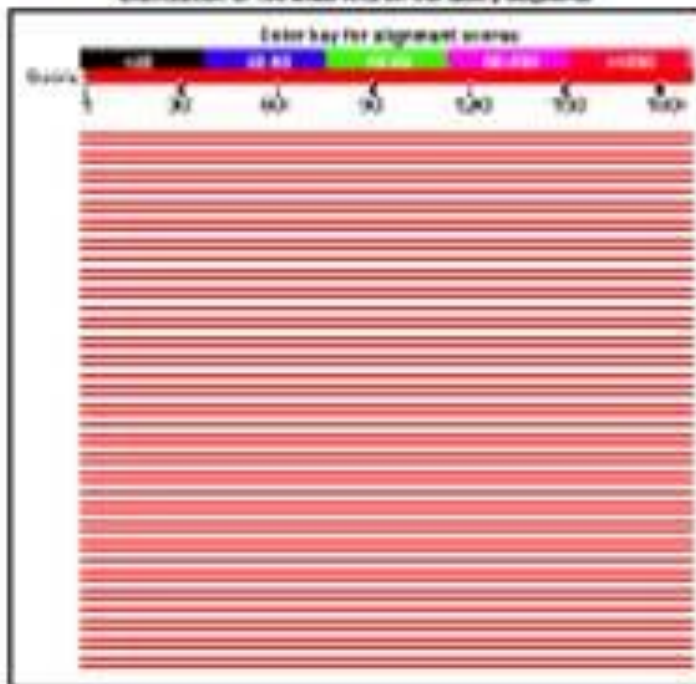
#001 [Submitted \(Phylo\) on 08-02-17 00:00 pm](#)

Query ID: 100Query_0001
Description: None
Molecule Type: nucleic acid
Query Length: 100

Database Name: 1
Description: Nucleotide collection (nr)
Program: BLASTN 2.2.30+

Graphic Summary

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence



Slika 15. Analiza konsenzus sekvence PPV izolata primenom BLAST programa

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (188 letters) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

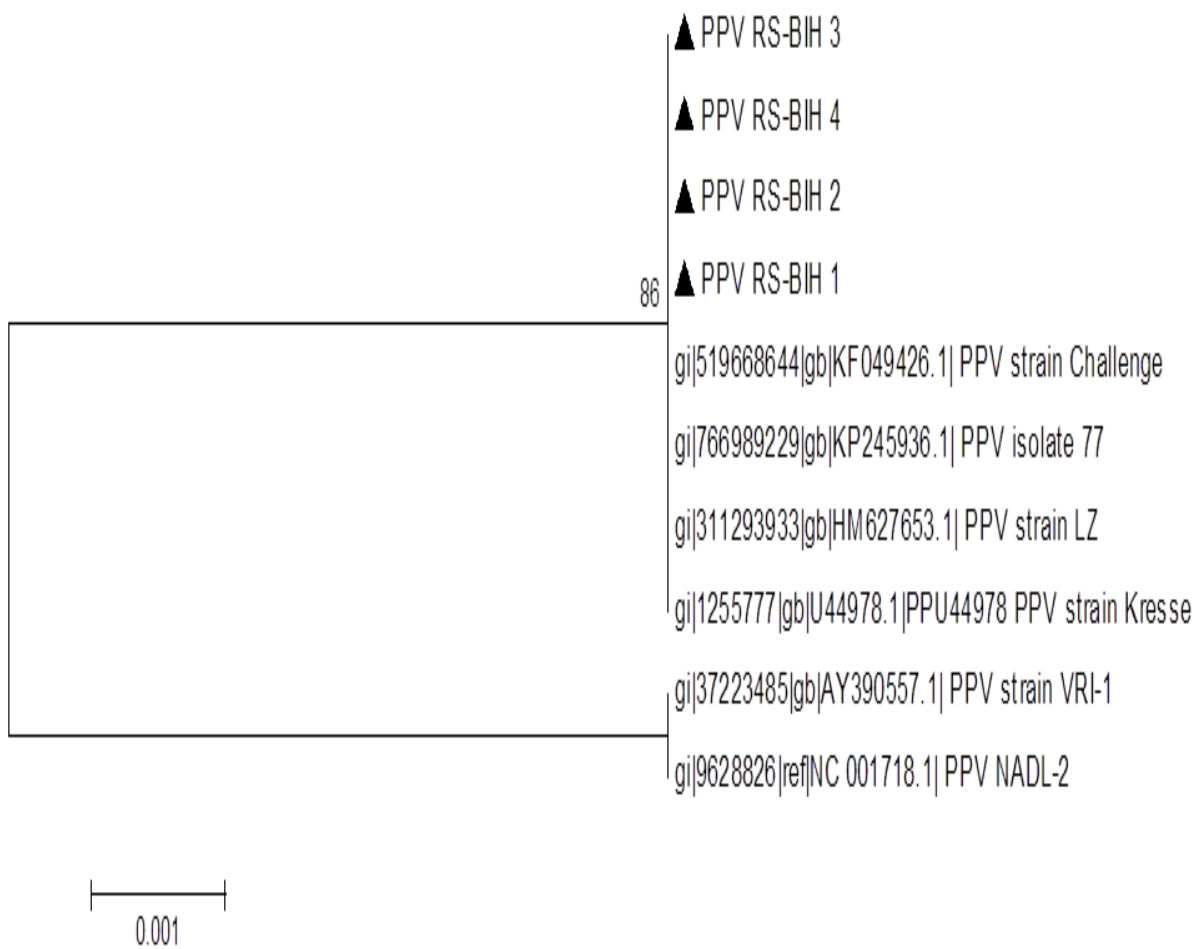
Descriptions
Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Porcine parvovirus isolate 77 major capsid protein (ORF2) gene, complete cds	348	348	100%	2e-92	100%	KP245936.1
Porcine parvovirus strain Challenge capsid protein gene, complete cds	348	348	100%	2e-92	100%	KF049426.1
Porcine parvovirus strain Challenge capsid protein gene, complete cds	348	348	100%	2e-92	100%	KF049425.1
Porcine parvovirus strain NADL2 capsid protein gene, complete cds	348	348	100%	2e-92	100%	KF049424.1
Porcine parvovirus isolate 80T viral protein 1 and viral protein 2 genes, complete cds	348	348	100%	2e-92	100%	KC296746.1
Porcine parvovirus isolate 37T viral protein 1 and viral protein 2 genes, complete cds	348	348	100%	2e-92	100%	KC296744.1

Slika 16. Analiza konsenzus sekvence PCV2 izolata primenom BLAST programa

Nukleotidne sekvence pet identifikovanih svinjskih parvovirusa su između sebe ispoljavale visok stepen sličnosti (100%), odnosno bile su identične. Njihovim upoređivanjem sa nukleotidnim sekvencama referentnih sojeva i sojeva parvovirusa svinja izolovanim u drugim zemljama, a objavljenim u genskoj bazi podataka, utvrđeno je da su iste imale visok stepen sličnosti sa sekvencom soja Challenge, izolovanog kod svinja na teritoriji Velike Britanije, zatim soja Kresse izolovanog kod svinja u SAD, odnosno sa nukleotidnim sekvencama sojeva 77 i LZ parvovirusa svinja izolovanih u Kini

Filogenetska analiza pet identifikovanih parvovirusa svinja poreklom iz Republike Srpske, u koju su bili uključeni prethodno navedeni sojevi virusa izolovani u drugim delovima sveta, pokazala je da svi navedeni sojevi virusa pripadaju istoj grani na stablu, odnosno da čine jednu monofiletsku grupu. Za soj NADL virusa PPV koji je izolovan kod svinja u SAD i soj VR-1 poreklom od svinja iz Južne Koreje, filogenetskom analizom je ustanovljeno da pripadaju posebnoj grani stabla, odnosno posebnoj monofiletskoj grupi (Slika 17.).



Slika 17. Filogenetsko stablo sojeva parvovirusa svinja

6. DISKUSIJA

Predmet ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije je bila identifikacija i molekularna karakterizacija sojeva svinjskog cirkovirusa 2 i parvovirusa svinja identifikovanih kod svinja različitih starosnih kategorija na teritoriji Republike Srpske. U cilju ispunjavanja postavljenog cilja ove doktorske disertacije bilo je izvršeno prikupljanje uzoraka poreklom od nevakcinisanih svinja u ekstenzivnom načinu gajenja iz više regiona Republike Srpske i njihovo ispitivanje primenom nekih klasičnih i molekularnih metoda virusološke dijagnostike. Ogawa i sar., (2009.) [61] su primenom multiplex PCR metode izvršili ispitivanje 33 zbirna uzorka organa i tkiva svinja sa kliničkim simptomima multisistemskog sindroma kržljivosti prasadi posle zalučnja, odnosno 26 uzorka organa fetusa. Navedeni uzorci su ispitivani na prisustvo većeg broja DNK i RNK virusa, između ostalih virusa PCV2 i svinjskog parvovirusa. Dobijeni rezultati ispitivanja primenom prethodno pomenute metode su dokazali prisustvo nukleinske kiselina virusa PCV2 kod 32 uzorka svinja, odnosno 96.% od ukupnog broja ispitanih uzoraka. Prisustvo svinjskog parvovirusa je ustanovljeno kod 9 uzoraka, odnosno 27.3% od ukupnog broja ispitanih uzoraka. Kod 9 uzoraka svinja ustanovljena je pojava mešovite infekcije izazvane sa prethodno navedenim virusima. Savić i sar., (2015.) [94] su izvršili ispitivanje prisustva virusa PCV2 i još nekih virusa (PRRS) u uzorcima svinja poreklom iz različitih krajeva u Republici Srbiji primenom molekularnih metoda zasnovanih na lančanoj reakciji polimeraze. Rezultati ispitivanja su pokazali da je od ukupno 235 ispitanih uzoraka svinja poreklom sa 10 farmi, kod 59 uzoraka utvrđena pojava mešane infekcije svinja izazvane virusima PCV2 i PRRS. Rezultati naših ispitivanja dobijeni primenom lančane reakcije polimeraze su potvrdili prisustvo virusa PCV2 u 6 uzoraka poreklom od svinja, odnosno kod 7,5% ispitanih uzoraka. Prisustvo svinjskog parvovirusa je, prethodno navedenom metodom, ustanovljeno kod 5 uzoraka svinja, odnosno 6,25% od ukupnog broja ispitanih uzoraka. Ovde treba napomenuti da svinje u čijim uzorcima je utvrđeno prisustvo prethodno navedenih virusa nisu ispoljavale kliničke simptome infekcije. Dobijeni rezultati ispitivanja su bili u korelaciji sa rezultatima stranih autora kojima je potvrđeno prisustvo svinjskog cirkovirusa tipa 2 i parvovirusa svinja u slučaju subkliničkih infekcija svinja [3, 67]. Imajući u vidu dobijene rezultate ispitivanja može se zaključiti da se lančana reakcija polimeraze pokazala kao brza i precizna metoda u identifikaciji prisustva nukleinskih kiselina virusa PCV2 i PPV u uzorcima poreklom od svinja. Jiang i sar., (2010.) [81] su koristili metodu

multiplex PCR za otkrivanje prisustva virusa PCV2, virusa svinjske kuge, svinjskog parvovirusa i virusa reproduktivnog i respiratornog sindroma u uzorcima svinja. Ukupno je ispitano 76 uzoraka limfnih čvorova, tonzila, slezine, pluća poreklom od prasadi sa kliničkim simptomima respiratorne infekcije i promena na reproduktivnim organima. Pored navednih uzoraka, ispitano je još i 27 uzoraka abortiranih fetusa. Prisustvo virusa PCV2 je ustanovljeno kod 9,2% uzoraka, dok je prisustvo svinjskog parvovirusa utvrđeno u 3,9% od ukupno ispitanih uzoraka. Prisustvo mešane infekcije izazvane virusima PCV2 i PPV je ustanovljeno kod 2,6% ispitanih uzoraka svinja. Xu i sar., (2013.) [36] su primenom metoda RT-PCR i PCR utvrđivali prisustvo virusa PCV2, virusa Aujeckijeve bolesti, svinjskog parvovirusa, virusa svinjske kuge i virusa PRRS. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da su navedene metode visoko specifične u orktivanju prisustva prethodno navedenih virusa u uzorcima svinja. Soares i sar., (1999.) [82] su koristili metodu PCR sa prajmerima za visoko konzervirani nestrukturani gen NS-1 svinjskog parvovirusa. Ukupno je ispitano 24 uzorka svinja. Pored metode PCR, uzorci su ispitani primenom metoda izolacije virusa u kulturi ćelije i testa inhibicije hemaglutinacije, odnosno nested-PCR. Devet uzoraka svinja od ukupno 24 ispitana je bilo pozitivno na prisustvo svinjskog parvovirusa posle izolacije virusa u ćelijskoj liniji, dok je 18 uzoraka bilo pozitivno posle ispitivanja primenom metoda PCR i nested PCR. Pet uzoraka koji su bili negativni prilikom ispitivanja metodom PCR, bili su pozitivni posle ispitivanja primenom metode nested PCR. U našim ispitivanjima, primenom metode PCR je utvrđeno prisustvo virusa PCV2 i PPV u ukupno 11 uzoraka. Svi prikupljeni uzorci su ispitani na prisustvo navedenih virusa i primenom metode izolacije virusa u ćelijskim linijama PK-15 i SK-6. Identifikacija svinjskog cirkovirusa tipa 2 nije izvršena u uzorcima pomenutih ćelijskih linija primenom metode PCR. Nijedan soj parvovirusa svinja nije izolovan i identifikovan primenom testova hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije posle inokulacije uzoraka u ćelijske linije PK-15 i SK-6. Huang i sar., (2004.) [20] su koristili multiplex PCR metodu za brzu identifikaciju virusa Aujeckijeve bolesti, svinjskog parvovirusa i svinjskog cirkovirusa tipa 2. Ukupno je ispitano 58 uzoraka poreklom od svinja. Prisustvo svinjskog cirkovirusa tipa 2 je utvrđeno kod 51,7% ispitanih uzoraka (30 od 58), dok je mešovita infekcije izazvana virusima PCV2 i PPV ustanovljena kod 5,1% (3 od 58) od ukupnog broja ispitanih uzoraka. Mešovita infekcija izazvana svinjskim parvovirusom i cirkovirusom svinja tipa 2, odnosno virusom Aujeckijeve bolesti je ustanovljena kod pet uzoraka fetusa svinja. Henriques i sar., (2011.) [20] su izvršili molekularnu karakterizaciju i filogenetsku analizu 22 soja virusa

PCV2 identifikovanih kod svinja poreklom iz Portugala. Ispitivan je deo genoma virusa koji kodira sintezu ORF1 proteina. Nukleotidne sekvence svih 22 soja virusa PCV2 su između sebe imale visok stepen sličnosti koji se kretao od 96 do 100%. Filogenetska analiza identifikovanih sojeva virusa PCV2 je pokazala da je šest sojeva pripadalo genotipu PCV2a virusa, dok su preostali sojevi virusa pripadali genotipu PCV2b. Ramos i sar., (2013.) [25] su izvršili molekularnu karakterizaciju sojeva virusa PCV2 identifikovanih kod svinja na teritoriji Urugvaja. Na osnovu molekularne analize *cap* gena je ustanovljeno da postoji visok stepen sličnosti između nukleotidnih sekvenci navedenih sojeva virusa PCV2 identifikovanih u Urugvaju, odnosno visok stepen sličnosti između urugvajskih sojeva virusa i brazilskih sojeva virusa PCV2. Ispitane nukleotidne sekvence urugvajskih sojeva virusa PCV2 su imale visok stepen sličnosti sa sekvencama argentinskih sojeva virusa koja je iznosila od 99,1 do 99,5%. Argentinski sojevi virusa PCV2 su istovremeno pokazivali visok stepen sličnosti sa sojevima svinjskog cirkovirusa tipa 2 poreklom iz Francuske, Kube, Kanade i SAD. Filogenetska analiza urugvajskih sojeva virusa je pokazala da pripadaju genotipu 2a virusa PCV2. Larochelle i sar., (2002.) [10] su izvršili molekularnu analizu 34 identifikovana soja virusa PCV2. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da sojevi svinjskog cirkovirusa tipa 2 poreklom iz Kanade slični sa sojevima navedenog virusa poreklom iz SAD, Evrope i Azije. Primenom metode sekvenciranja genoma virusa po Sanger-u, izvršeno je određivanje redosleda nukleotida dela ORF1 regiona genoma virusa PCV2 svih šest identifikovanih virusa kod svinja poreklom sa teritorije Republike Srpske. Nukleotidne sekvence šest identifikovanih virusa PCV2 između sebe su pokazivale izuzetno visok stepen sličnosti (99%). Upoređivanjem nukleotidnih sekvenci šest virusa PCV2 identifikovanih kod svinja u Republici Srpskoj sa nukleotidnim sekvencama sojeva virusa koje su objavljene u banci gena, utvrđen je njihov visok stepen sličnosti sa nukleotidnom sekvencom soja Mantova virusa PCV2 koji je izolovan od svinja u Italiji, zatim sa nukleotidnim sekvencama sojeva DE006-14 i DE222-13, izolovanih kod svinja u Nemačkoj, kao i sa sekvencom soja Jvnan koji je izolovan kod svinja u Kini. Nukleotidna sekvenca šest sojeva virusa PCV2 identifikovanih kod svinja u Republici Srpskoj je imala niži stepen sličnosti sa sekvencama sojeva NIVS-C virusa PCV2 identifikovanim kod svinja u Srbiji i DK1987PMWS izolovanim kod svinja u Danskoj. Filogenetskom analizom, u koju su bili uključeni svi prethodno navedeni sojevi virusa, utvrđeno je da šest virusa PCV2 identifikovanih kod svinja u Republici Srpskoj, pripadaju genotipu PCV2c navedenog virusa.

Xu i sar., (2013.) [36] su upoređivali nukleotidne sekvence VP2 gena soja NE/09 virusa PPV i drugih sojeva navedenog virusa poreklom iz Kine. Dobijeni rezultati su pokazali visok stepen sličnosti između soja NE/09 parvovirusa svinja i drugih sojeva virusa PPV identifikovanih na teritoriji Kine. Primenom metode sekvenciranja genoma virusa po Sanger-u, izvršeno je određivanje redosleda nukleotida dela gena koji kodira sintezu VP2 proteina svinjskog parvovirusa svih pet sojeva virusa identifikovanih kod svinja u Republici Srpskoj. Nukleotidne sekvence pet identifikovanih sojeva virusa PPV između sebe su pokazivale izuzetno visok stepen sličnosti (100%). Upoređivanjem nukleotidnih sekvenci pet virusa PPV identifikovanih kod svinja u Republici Srpskoj sa nukleotidnim sekvencama sojeva virusa koje su objavljene u genskoj bazi podataka, utvrđeno je da su iste imale visok stepen sličnosti sa nukleotidnim sekvencama soja Challenge izolovanog kod svinja na teritoriji Velike Britanije, zatim soja Kresse izolovanog kod svinja u SAD, odnosno sa nukleotidnim sekvencama sojeva 77 i LZ izolovanih kod svinja u Kini. Filogenetska analiza pet identifikovanih parvovirusa svinja poreklom iz Republike Srpske, u koju su bili uključeni prethodno navedeni sojevi virusa izolovani u drugim delovima sveta, pokazala je da svi navedeni sojevi virusa pripadaju istoj grani na stablu, odnosno da čine jednu monofiletsku grupu. Za soj NADL virusa PPV koji je izolovan kod svinja u SAD i soj VR-1 poreklom od svinja iz Južne Koreje, filogenetskom analizom je ustanovljeno da pripadaju posebnoj grani stabla, odnosno posebnoj monofiletskoj grupi.

Ispitivanja koja su bila predmet ove doktorske disertacije imala su za cilj identifikaciju i molekularnu karakterizaciju cirkovirusa tipa 2 svinja i parvovirusa svinja kod životinja poreklom sa teritorije Republike Srpske, BiH. Ovde treba napomenuti da programom obavezne vakcinacije svinja u Republici Srpskoj nije obuhvaćeno i sprovođenje vakcinacije životinja protiv infekcija izazvanih navedenim virusima. Pored ovoga, izuzetno je važno naglasiti da danas ne postoje relevantni podaci o prisustvu svinjskog cirkovirusa tipa 2 i parvovirusa svinja na teritoriji Republike Srpske kao ni podaci o molekularnim karakteristikama genoma navedenih virusa prisutnih kod životinja na ovoj teritoriji. Imajući u vidu napred navedeno, dobijeni rezultati ispitivanja prikazani u okviru ove doktorske disertacije, pružaju podatke o prisustvu i molekularnoj karakterizaciji sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2 i parvovirusa svinja identifikovanih kod životinja na teritoriji Republike Srpske. Delovi nukleotidnih sekvenci identifikovanih sojeva virusa utvrđeni primenom molekularnih metoda, upoređivani su sa analognim nukleotidnim sekvencama sojeva cirkovirusa 2 svinja i parvovirusa svinja izolovanih

široj svetu u cilju utvrđivanja sličnosti i razlika između njih. Na ovaj način ostvaren je uvid u stepen podudarnosti nukleotidnih sekvenci virusa identifikovanih kod svinja u Republici Srpskoj i sojeva virusa iz drugih delova sveta. Pored ovoga, dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost korišćenja molekularnih metoda zasnovanih na lančanoj reakciji polimeraze u cilju brze i pouzdane identifikacije prethodno navedenih virusa u ispitivanim uzorcima, posebno u slučajevima supkliničkih infekcija životinja.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja koji su se odnosili na identifikaciju i molekularnu karakterizaciju sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2 i parvovirusa svinja identifikovanih kod životinja na teritoriji Republike Srpske, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Primenom lančane reakcije polimeraze, prisustvo svinjskog cirkovirusa tipa 2 (PCV2) i parvovirusa svinja (PPV) je otkriveno kod 6 i 5 od ukupno 80 zbirnih uzoraka, odnosno kod 7,5% i 6,25% od ukupnog broja ispitanih uzoraka.
2. Mešovita infekcija svinja izazvana virusima PCV2 i PPV utvrđena je kod tri životinje.
3. Nijedan soj svinjskog cirkovirusa tipa 2 i svinjskog parvovirusa nije izolovan i identifikovan posle pojedinačne inokulacije prikupljenih uzoraka svinja u kulture ćelija PK-15 i SK-6.
4. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost korišćenja molekularnih metoda zasnovanih na lančanoj reakciji polimeraze u cilju otkrivanja prisustva navedenih virusa kod supklinički inficiranih životinja.
5. Nukleotidne sekvence šest identifikovanih virusa PCV2 imale su visok stepen sličnosti (99%) sa nukleotidnim sekvencama sojeva navedenog virusa čije je prisustvo utvrđeno kod svinja poreklom iz Italije, Nemačke i Kine.
6. Filogenetska analiza uz primenu Neighbor-joining, Maximum likelihood i Maximum parsimony metoda je pokazala usklađenost rezultata granjanja stabala i da svih šest virusa PCV2 identifikovani kod svinja na teritoriji Republike Srpske pripadaju genotipu „c“ navedenog virusa.
7. Nukleotidne sekvence pet svinjskih parvovirusa identifikovanih kod svinja u Republici Srpskoj imale su visok stepen sličnosti (100%) sa sekvencama sojeva navedenog virusa utvrđenih kod svinja poreklom iz Velike Britanije, SAD i Kine.
8. Filogenetskom analizom je utvrđeno da parvovirusi svinja poreklom iz Republike Srpske i sojevi navedenog virusa poreklom iz Velike Britanije, SAD i Kine pripadaju istoj monofiletskoj grupi.

8. SPISAK LITERATURE

1. Harding, J. C., Clark, E. G. (1997). Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod*, 5(5), 201-203.
2. Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., Lopez-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Segales, J. (2008). A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Veterinary microbiology*, 128(1), 23-35.
3. Segalés, J., Allan, G. M., & Domingo, M. (2005). Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews*, 6(02), 119-142.
4. Rose, N., Opriessnig, T., Grasland, B., & Jestin, A. (2012). Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus research*, 164(1), 78-89.
5. Segalés, J., Rosell, C., & Domingo, M. (2004). Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Veterinary microbiology*, 98(2), 137-149.
6. Allan, G.M., Phenix, K, Todd, D., McNulty, M.S. (1994). Some Biological and Physico-Chemical properties of Porcine Circovirus . *Journal of Veterinary Medicine*, 41 (1-10), 17-26
7. Li, W., Wang, X., Ma, T., Feng, Z., Li, Y., & Jiang, P. (2010). Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains isolated between 2001 and 2009: genotype PCV2b predominate in postweaning multisystemic wasting syndrome occurrences in eastern China. *Virus genes*, 40 (2), 244-251
8. Segalés, J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus research*, 164 (1), 10-19
9. Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., FitzPatrick, E. S., Fanning, S., & Hartigan, P. (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease*. John Wiley & Sons.
10. Larochelle, R., Bielanski, A., Müller, P., & Magar, R. (2000). PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *Journal of clinical microbiology*, 38 (12), 4629-4632.

11. Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H., & Kwang, J. (2006). The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *Journal of Virology*, *80* (10), 5065-5073.
12. Truong, C., Mahe, D., Blanchard, P., Le Dimna, M., Madec, F., Jestin, A., & Albina, E. (2001). Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Archives of virology*, *146* (6), 1197-1211.
13. Misinzo, G., Delputte, P. L., Meerts, P., Lefebvre, D. J., & Nauwynck, H. J. (2006). Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *Journal of virology*, *80* (7), 3487-3494.
14. Cheung, A. K., Lager, K. M., Kohutyuk, O. I., Vincent, A. L., Henry, S. C., Baker, R. B., Dunham, A. G. (2007). Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Archives of virology*, *152* (5), 1035-1044.
15. Wang, F., Guo, X., Ge, X., Wang, Z., Chen, Y., Cha, Z., & Yang, H. (2009). Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus research*, *145*(1), 151-156.
16. Hesse, R., Kerrigan, M., & Rowland, R. R. (2008). Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus research*, *132* (1), 201-207.
17. Cadar, D., Cságola, A., Lőrincz, M., Tombácz, K., Spînu, M., & Tuboly, T. (2012). Detection of natural inter-and intra-genotype recombination events revealed by cap gene analysis and decreasing prevalence of PCV2 in wild boars. *Infection, Genetics and Evolution*, *12*(2), 420-427.
18. Cai, L., Ni, J., Xia, Y., Zi, Z., Ning, K., Qiu, P., Yu, X. (2012). Identification of an emerging recombinant cluster in porcine circovirus type 2. *Virus research*, *165* (1), 95-102.
19. Allan, G. M., & Ellis, J. A. (2000). Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *12* (1), 3-14.
20. Huang, Y., Shao, M., Xu, X., Zhang, X., Du, Q., Zhao, X., Tong, D. (2013). Evidence for different patterns of natural inter-genotype recombination between two PCV2 parental strains in the field. *Virus research*, *175* (1), 78-86.

21. Zhai, S. L., Chen, S. N., Wei, Z. Z., Zhang, J. W., Huang, L., Lin, T., Long, J. X. (2011). Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from China. *Virology journal*, 8 (1), 1.
22. Horlen, K. P., Dritz, S. S., Nietfeld, J. C., Henry, S. C., Hesse, R. A., Oberst, R., ... & Rowland, R. R. (2008). A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232 (6), 906-912.
23. Meerts, P., Misinzo, G., Lefebvre, D., Nielsen, J., Bøtner, A., Kristensen, C. S., & Nauwynck, H. J. (2006). Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC veterinary research*, 2 (1), 6.
24. Finsterbusch, T., Steinfeldt, T., Doberstein, K., Rödner, C., Mankertz, A. (2009). Interaction of the replication proteins and the capsid protein of porcine circovirus type 1 and 2 with host proteins. *Virology*, 386 (1), 122-131.
25. Ramos, N., Mirazo, S., Castro, G., & Arbiza, J. (2013). Molecular analysis of Porcine Circovirus Type 2 strains from Uruguay: Evidence for natural occurring recombination. *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 23-31.
26. Chae, C. (2012). Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application. *The Veterinary Journal*, 194(2), 151-157.
27. Wei, C., Zhang, M., Chen, Y., Xie, J., Huang, Z., Zhu, W., Zhang, G. (2013). 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..
28. Vlasakova, M., Jackova, A., & Vilcek, S. (2011). Genetic typing of porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from Slovakia. *Research in veterinary science*, 90 (1), 168-173.
29. Larochelle, R., Magar, R., & D'Allaire, S. (2002). Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus research*, 90 (1), 101-112.
30. An, D. J., Roh, I. S., Song, D. S., Park, C. K., & Park, B. K. (2007). Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus research*, 129 (2), 115-122.

31. Ciacci-Zanella, J. R., Simon, N. L., Pinto, L. S., Viancelli, A., Fernandes, L. T., Hayashi, M., Esteves, P. A. (2009). Detection of porcine Circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population. *Research in veterinary science*, 87 (1), 157-160.
32. Siegl, G. (1984). Biology and pathogenicity of autonomous parvoviruses. In *The parvoviruses* (pp. 297-362). Springer US.
33. Bergeron, J., Hebert, B., & Tijssen, P. (1996). Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *Journal of virology*, 70 (4), 2508-2515.
34. Brunborg, I. M., Jonassen, C. M., Moldal, T., Bratberg, B., Lium, B., Koenen, F., Schönheit, J. (2007). Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 19 (4), 368-375.
35. Ren, X., Tao, Y., Cui, J., Suo, S., Cong, Y., & Tijssen, P. (2013). Phylogeny and evolution of porcine parvovirus. *Virus research*, 178 (2), 392-397.
36. Xu, Y. G., Cui, L. C., Wang, H. W., Huo, G. C., Li, S. L. (2013). Characterization of the capsid protein VP2 gene of a virulent strain NE/09 of porcine parvovirus isolated in China. *Research in veterinary science*, 94 (2), 219-224.
37. Opriessnig, T., Xiao, C. T., Gerber, P. F., & Halbur, P. G. (2014). Identification of recently described porcine parvoviruses in archived North American samples from 1996 and association with porcine circovirus associated disease. *Veterinary microbiology*, 173 (1), 9-16.
38. Campos, F. S., Kluge, M., Franco, A. C., Giongo, A., Valdez, F. P., Saddi, T. M., Roehe, P. M. (2016). Complete genome sequence of porcine parvovirus 2 recovered from swine sera. *Genome announcements*, 4 (1), e01627-15.
39. Franzo, G., Tucciarone, C. M., Dotto, G., Gigli, A., Ceglie, L., Drigo, M. (2015). 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..

40. Segalés, J., Kekarainen, T., & Cortey, M. (2013). The natural history of porcine circovirus type 2: from an inoffensive virus to a devastating swine disease?. *Veterinary microbiology*, 165 (1), 13-20.
41. Viancelli, A., Garcia, L. A. T., Kunz, A., Steinmetz, R., Esteves, P. A., Barardi, C. R. M. (2012). Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples collected from swine manure treatment systems. *Research in veterinary science*, 93 (1), 538-543.
42. Opriessnig, T., McKeown, N. E., Zhou, E. M., Meng, X. J., & Halbur, P. G. (2006). Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *Journal of General Virology*, 87 (10), 2923-2932.
43. Bolin, S. R., Stoffregen, W. C., Nayar, G. P., & Hamel, A. L. (2001). Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13 (3), 185-194.
44. Harms, P. A., Sorden, S. D., Halbur, P. G., Bolin, S. R., Lager, K. M., Morozov, I., Paul, P. S. (2001). Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Pathology Online*, 38 (5), 528-539.
45. Ladekjaer-Mikkelsen, A.-S., Nielsen, J., Storgaard, T., Botner, A., Allan, G., McNeilly, F., 2001. Transplacental infections with PCV- 2 associated with reproductive failure in a gilt. *Veterinary Record* 148, 759–760
46. Kim, J., Chung, H. K., & Chae, C. (2003). Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary Journal*, 166 (3), 251-256.
47. O'Connor, B., Gauvreau, H., West, K., Bogdan, J., Ayroud, M., Clark, E. G., Ellis, J. A. (2001). Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *The Canadian Veterinary Journal*, 42 (7), 551.
48. West, K. H., Bystrom, J. M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G. M. Konoby, C. (1999). Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11 (6), 530-532.

49. Kim, J., CHUNG, H. K., JUNG, T., CHO, W. S., CHOI, C., & CHAE, C. (2002). Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64 (1), 57-62.
50. McKillen, J., Hjertner, B., Millar, A., McNeilly, F., Belák, S., Adair, B., & Allan, G. (2007). Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses. *Journal of virological methods*, 140 (1), 155-165.
51. Rodríguez-Arriolja, G. M., Segalés, J., Calsamiglia, M., Resendes, A. R., Balasch, M., Plana-Durán, J. & Domingo, M. (2002). Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *American journal of veterinary research*, 63 (3), 354-357.
52. McIntosh, K. A., Harding, J. C., Parker, S., Ellis, J. A., & Appleyard, G. D. (2006). Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 18 (4), 380-384.
53. Jacobsen, B., Krueger, L., Seeliger, F., Bruegmann, M., Segalés, J., Baumgaertner, W. (2009). Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Veterinary microbiology*, 138 (1), 27-33.
54. Jantafong, T., Boonsoongnern, A., Poolperm, P., Urairong, K., Lekcharoensuk, C., & Lekcharoensuk, P. (2011). Genetic characterization of porcine circovirus type 2 in piglets from PMWS-affected and-negative farms in Thailand. *Virology journal*, 8 (1), 1.
55. Guo, L. J., Lu, Y. H., Wei, Y. W., Huang, L. P., & Liu, C. M. (2010). Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virology journal*, 7 (1), 1.
56. Dupont, K., Nielsen, E. O., Baekbo, P., & Larsen, L. E. (2008). Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Veterinary microbiology*, 128 (1), 56-64.
57. Segalés, J., Piella, J., Marco, E., Mateu-de-Antonio, E. M., Espuna, E., & Domingo, M. (1998). Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *The Veterinary Record*, 142 (18), 483-486.

58. Ellis, J. A., Bratanich, A., Clark, E. G., Allan, G., Meehan, B., Haines, D. M., Hassard, L. (2000). Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12 (1), 21-27.
59. Sorden, S. D. (2000). Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health and production*, 8 (3), 133-136.
60. McNeilly, F., Kennedy, S., Moffett, D., Meehan, B. M., Foster, J. C., Clarke, E. G., Allan, G. M. (1999). A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of virological methods*, 80 (2), 123-128.
61. Ogawa, H., Taira, O., Hirai, T., Takeuchi, H., Nagao, A., Ishikawa, Y., Ueda, S. (2009). 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 (1), 210-214.
62. Parke, C. R., & Burgess, G. W. (1993). An economic assessment of porcine parvovirus vaccination. *Australian veterinary journal*, 70(5), 177-180.
63. Gillespie, J, Opriessnig, T., Meng, X.J. Pelzer, K, Buechner-Maxwell, V, (2009). Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus – associated disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23 (6), 1151-1163.
64. Sinha, A., Shen, H. G., Schalk, S., Beach, N. M., Huang, Y. W., Meng, X. J., Opriessnig, T. (2011). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) influences infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) subtypes PCV2a and PCV2b by prolonging PCV2 viremia and shedding. *Veterinary microbiology*, 152(3), 235-246.
65. Chae, C. (2005). A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *The Veterinary Journal*, 169 (3), 326-336.
66. Pallares, F. J., et al. "Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population." *Research in veterinary science* 87.1 (2009): 157-160

67. Mengeling, W. L., & Cutlip, R. C. (1975). Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of five-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *American journal of veterinary research*, 36 (8), 1173-1177.
68. Bachmann, P. A., Sheffy, B. E., & Vauhan, J. T. (1975). Experimental in utero infection of fetal pigs with a porcine parvovirus. *Infection and immunity*, 12 (3), 455-460.
69. Nielsen, J., Rønsholt, L., & Sørensen, K. J. (1991). Experimental in utero infection of pig foetuses with porcine parvovirus (PPV). *Veterinary microbiology*, 28(1), 1-11.
70. Madson, D. M., Ramamoorthy, S., Kuster, C., Pal, N., Meng, X. J., Halbur, P. G., Opriessnig, T. (2009). Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected boars. *Veterinary research*, 40 (1), 1.
71. Shen, H. G., Zhou, J. Y., Huang, Z. Y., Guo, J. Q., Xing, G., He, J. L., Gong, L. Y. (2008). Protective immunity against porcine circovirus 2 by vaccination with ORF2-based DNA and subunit vaccines in mice. *Journal of general virology*, 89 (8), 1857-1865.
72. Kamstrup, S., Barfoed, A. M., Frimann, T. H., Ladekjær-Mikkelsen, A. S., Bøtner, A. (2004). Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine*, 22 (11), 1358-1361.
73. Kresse, J. I., Taylor, W. D., Stewart, W. W., & Eernisse, K. A. (1985). Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. *Veterinary microbiology*, 10 (6), 525-531.
74. Morrison, R. B., & Joo, H. S. (1984). Acute reproductive losses due to porcine parvovirus infection in a swine herd: Herd observations and economic analysis of the losses. *Preventive Veterinary Medicine*, 2 (5), 699-706.
75. Sharma, R., & Saikumar, G. (2013). PMWS-like Lesions in Preweaned Crossbred Piglets Naturally Infected with Porcine Circovirus 2 in India.
76. Seeliger FA, Bru'gmann ML, Kru'ger L, Greiser-Wilke I, Verspohl J, Segale's J, et al. Porcine circovirus type 2- associated cerebellar vasculitis in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected pigs. *Vet Pathol* 2007;44:621-34.
77. Bolt, D. M., Häni, H., Müller, E., & Waldvogel, A. S. (1997). Non-suppurative myocarditis in piglets associated with porcine parvovirus infection. *Journal of comparative pathology*, 117 (2), 107-118.

78. Zheng, L. L., Wang, Y. B., Li, M. F., Chen, H. Y., Guo, X. P., Geng, J. W., ... & Cui, B. A. (2013). Simultaneous detection of porcine parvovirus and porcine circovirus type 2 by duplex real-time PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. *Journal of virological methods*, 187 (1), 15-19.
79. Maldonado, J., Segalés, J., Martínez-Puig, D., Calsamiglia, M., Riera, P., Domingo, M., & Artigas, C. (2005). Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. *The Veterinary Journal*, 169 (3), 454-456.
80. Caprioli, A., McNeilly, F., McNair, I., Lagan-Tregaskis, P., Ellis, J., Krakowka, S., ... & Allan, G. (2006). PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal swabs from experimentally infected pigs. *Research in veterinary science*, 81 (2), 287-292.
81. Jiang, Y., Shang, H., Xu, H., Zhu, L., Chen, W., Zhao, L., & Fang, L. (2010). 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 (2), 172-175.
82. Soares, R. M., Durigon, E. L., Bersano, J. G., Richtzenhain, L. J. (1999). 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 (1), 191-198.
83. Molitor, T. W., Oraveerakul, K., Zhang, Q. Q., Choi, C. S., Ludemann, L. R. (1991). Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus. *Journal of virological methods*, 32 (2-3), 201-211.
84. Wilhelm, S., Zimmermann, P., Selbitz, H. J., & Truyen, U. (2006). Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *Journal of virological methods*, 134 (1), 257-260.
85. Chen, H. Y., Li, X. K., Cui, B. A., Wei, Z. Y., Li, X. S., Wang, Y. B., ... & Wang, Z. Y. (2009). A TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for the detection of porcine parvovirus. *Journal of virological methods*, 156 (1), 84-88.

86. Westenbrink, F., Veldhuis, M. A., & Brinkhof, J. M. A. (1989). An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to porcine parvovirus. *Journal of virological methods*, 23 (2), 169-178.
87. Pejsak, Z., Podgórska, K., Truszczyński, M., Karbowski, P., & Stadejek, T. (2010). Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 33 (6), 1-5.
88. Lyoo, K., Joo, H., Caldwell, B., Kim, H., Davies, P. R., & Torrison, J. (2011). Comparative efficacy of three commercial PCV2 vaccines in conventionally reared pigs. *The Veterinary Journal*, 189 (1), 58-62.
89. Fort, M., Fernandes, L.T., Nofrarias, M., Díaz, I., Sibila, M., Pujols, J., Mateu, E., Segalés, J., 2009. Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 129, 101–107.
90. Cline, G., Wilt, V., Diaz, E., Edler, R., 2008. Efficacy of immunising pigs against porcine circovirus type 2 at three or six weeks of age. *Vet. Rec.* 163, 737–740.
91. Foni, E., Gualandi, G. L. (1989). A serological survey of swine parvovirus infection in Italy. *Microbiologica*, 12 (3), 241-245.
92. Antonis, A. F., Brusckhe, C. J., Rueda, P., Maranga, L., Casal, J. I., Vela, C. Langeveld, J. P. (2006). A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine*, 24 (26), 5481-5490.
93. Noad, R., & Roy, P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends in microbiology*, 11 (9), 438-444.
94. Savić B, Radanović O, Jovičić D, Nešić K, Ivanović S, Stevančević O, Cvetojević Đ, Kasagić D: Survey of infectious agents associated with porcine respiratory disease complex (PRDC) in Serbian swine herds using polymerase chain reaction (PCR) detection. *Acta veterinaria* 2015, 65:79-88.

Biografija

Kandidat Bojan M. Lukač, diplomirani veterinar rođen je 10.11.1984. godine u Zadru, Republika Hrvatska. Osnovnu školu završio je u Obrovcu, Republika Hrvatska i Prijedoru, Republika Srpska, BiH. Srednju poljoprivrednu školu – smer veterinarski tehničar završio je u Prijedoru 2003. godine. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu kandidat dipl. vet. Bojan Lukač je upisao 2003. godine. Kao student druge, treće, četvrte, pete i šeste godine i najbolji diplomirani student pohvaljivan je od strane Naučno-nastavnog veća Fakulteta za uspeh postignut tokom studija. Septembra 2009. godine prvi je diplomirao iz generacije sa prosečnom ocenom 9,34. U periodu od 2005.god. do 2009. god. na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu obavljao je dužnost studenta prodekana. Tokom studija bio je stipendista Ministarstva prosvjete i kulture Republike Srpske, Veterinarskog instituta dr Vaso Butozan i opštine Prijedor. Doktorske studije na Fakultetu veterinarske medicine kandidat je upisao školske 2009/2010. godine. Sve ispite predviđene planom i programom studija položio je sa prosečnom ocenom 9,38. Kandidat dipl. vet. Bojan Lukač je od 2010 zaposlen u veterinarskoj ambulanti MIM COOP u Banja Luci. Tokom 2014. godine kandidat je boravio na usavršavanju u veterinarskoj klinici – Clinica Veterinaria Anubis u Milanu, Italija, dok je 2015. godine učestvovao na simpozijumu veterinarskih dermatologa male prakse u Monpeljeu, Francuska. Kandidat dipl.vet. Bojan Lukač do sada je objavio više naučnih i stručnih radova, poseduje aktivno znanje engleskog jezika i rad na računaru. Član je Veterinarske komore Republike Srpske.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а БОЈАН ЛУКАЧ

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ИДЕНТИФИКАЦИЈА И МОЛЕКУЛАРНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ЦИРКОВИРУСА 2 И

ПАРВОВИРУСА КОД СВИЊА СА ТЕРИТОРИЈЕ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ, БИХ

- 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, 21.04.2016

Бојан Лукач

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора БОЈАН (МИЛОВАН) ЛУКАЧ

Број уписа _____

Студијски програм ДОКТОРСКЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ

Наслов рада ИДЕНТИФИКАЦИЈА И МОЛЕКУЛАРНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА
ЦИРКОВИРУСА 2 И ПАРВОВИРУСА КОД СВИЊА СА ТЕРИТОРИЈЕ РЕПУБЛИКЕ
СРПСКЕ, БИХ

Ментор ПРОФ. ДР ЈАКОВ НИШАВИЋ

Потписани БОЈАН ЛУКАЧ

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, 21.04.2016

Бојан Лукач

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

ИДЕНТИФИКАЦИЈА И МОЛЕКУЛАРНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ЦИРКОВИРУСА 2 И
ПАРВОВИРУСА КОД СВИЊА СА ТЕРИТОРИЈЕ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ, БИХ

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, 21.04.2016

Бојан Луков