

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**DOLOČITEV CELOTNEGA GENOMA VIRUSA
PRAŠIČJE EPIDEMIČNE DIAREJE Z UPORABO
TEHNOLOGIJE ION TORRENT SEKVENCIRANJA**

**COMPLETE GENOME SEQUENCING OF THE
PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS USING THE
ION TORRENT SEQUENCING TECHNOLOGY**

Manica Ipavec

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

636.4.09:578.2:578.834:575.8:57.088.7(043.2)

**DOLOČITEV CELOTNEGA GENOMA VIRUSA
PRAŠIČJE EPIDEMIČNE DIAREJE Z UPORABO
TEHNOLOGIJE ION TORRENT SEKVENCIRANJA**

**COMPLETE GENOME SEQUENCING OF THE
PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS USING THE
ION TORRENT SEQUENCING TECHNOLOGY**

Manica Ipavec

Delo je pripravljeno v skladu s pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom, pod mentorstvom izr. prof. dr. Ivana Toplaka, dr. vet. med., na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete

Ljubljana, 2016

POVZETEK

Decembra 2014 je veterinar na farmi pitancev zaznal klinične primere drisk pri prašičih. V januarju 2015 smo na isti farmi z metodo RT-PCR v realnem času prvič ugotovili prisotnost bolezni prašičje epidemične diareje (PED) v Sloveniji z dokazom nukleinske kisline virusa PED. Za določanje nukleotidnega zaporedja smo uporabili tehnologijo naslednje generacije sekvenciranja (NGS) Ion Torrent. Določitev nukleotidnega zaporedja celotnega genoma virusa PED smo uspešno izvedli iz pozitivnega vzorca blata, odvzetega v septembru 2015 pri prašičih z drisko iz prve okužene reje pri nas. Osamitev nukleinskih kislin smo izvedli s komercialnim kompletom QIAamp[®] viral RNA in v nadaljevanju s standardnim TRIzol[®] protokolom. Za pripravo knjižnice smo uporabili Ion Total RNA Kit 2.0, emulzijski PCR in obogatitev knjižnice pa smo izvedli z Ion PGM[™] template OT2 200 komercialnim kompletom. Celoten genom virusa PED SLO/JH-11/2015 (KU297956) ima 28.028 nukleotidov in je uvrščen med S INDEL seve virusov PED. Genetska primerjava celotnega genoma s sevi v genski banki je pokazala, da je slovenskemu sevu virusa PED najbolj soroden sev FR/001/2014 iz Francije, od katerega se razlikuje v 44 nukleotidih, sev GER/L00719/2014 iz Nemčije, od katerega se razlikuje v 49 nukleotidih, od seva BEL/15V010/2015 iz Belgije se razlikuje v 93 nukleotidih in od ameriškega seva S INDEL OH851 v 185 nukleotidih. Sev SLO/JH-11/2015 je po naših podatkih četrti evropski sev virusa PED, kateremu je bilo določeno nukleotidno zaporedje celotnega genoma, in prvi virus s področja veterinarske medicine v Sloveniji, ki smo mu določili celoten genom.

Ključne besede: prašič, bolezni – virologija; virus prašičje epidemične diareje – genetika – klasifikacija; genom virusni; molekulska zaporedje, podatki; analiza sekvenc – metode; verižna reakcija s polimerazo v realnem času; filogeneza; Slovenija.

SUMMARY

In December 2014, clinical cases of diarrhea in pigs were recognised by a veterinarian at a pig-fattening farm. In January 2015, the presence of the porcine epidemic diarrhea (PED) virus has been confirmed for the first time in Slovenia by real-time RT-PCR method. Ion-Torrent next-generation sequencing (NGS) technology has been used for the determination of the nucleotide sequence of the complete genome of PED virus. In September 2015, the PED positive fecal sample, obtained from pigs with diarrhea, was selected for NGS from the first infected pig holding in Slovenia. The isolation of nucleic acids has been performed using the QIAamp[®] viral RNA kit and subsequently using the standard TRIzol[®] protocol. Ion Total RNA Kit 2.0 has been used for the preparation of the library, while Ion PGM[™] template OT2 200 commercial kit has been used for emulsion PCR and the enrichment of the library. The size of the complete genome of PED virus SLO/JH-11/2015 (KU297956) is 28.028 nucleotides and belongs into the group of S INDEL strains of PEDV. The phylogenetic comparison of the complete genome with the strains from the GenBank has shown that the most closely related to the Slovene PED virus is strain FR/011/2014 from France with 44-nt changes, followed by strain GER/L00719/2014 from Germany with 49-nt changes, strain BEL/15V010/2015 from Belgium with 93-nt changes, and the American strain S INDEL OH851 with 185-nt changes. According to our data, strain SLO/JH-11/2015 is the fourth European strain of PED virus with known nucleotide sequence of the complete genome and the first virus from the field of veterinary medicine in Slovenia to have its complete genome sequenced.

Keywords: swine diseases – virology; coronavirus infections – virology; porcine epidemic diarrhea virus – genetics – classification; genome viral; sequence analysis – methods; real-time polymerase chain reaction; phylogeny; Slovenia.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	OPREDELITEV PROBLEMA.....	2
1.2	CILJI RAZISKOVANJA	2
1.3	DELOVNE HIPOTEZE.....	3
2	PREGLED LITERATURE	4
2.1	PREGLED ZGODOVINSKIH PODATKOV O POJAVLJANJU KORONAVIRUSOV	4
2.1.1	Epidemija SARS in močno povečano zanimanje za družino <i>Coronaviridae</i>	7
2.1.2	Predlagan model evolucije koronavirusov	8
2.2	PREGLED ZGODOVINSKIH PODATKOV O POJAVLJANJU VIRUSA PED	9
2.2.1	Ugotovitev povzročitelja PED	9
2.2.2	Pojavljanje virusa PED po svetu.....	9
2.2.2.1	Pojavljanje okužb z virusom PED v Evropi.....	10
2.2.2.2	Pojavljanje okužb z virusom PED v Aziji.....	10
2.2.2.3	Pojavljanje okužb z virusom PED v ZDA.....	10
2.3	KLASIFIKACIJA VIRUSOV PED.....	11
2.4	GENOM VIRUSA PED.....	11
2.5	EPIZOOTIOLOGIJA VIRUSOV PED.....	14
2.6	PATOGENEZA, PATOMORFOLOGIJA IN KLINIČNI ZNAKI.....	19
2.6.1	Patogeneza	19
2.6.2	Patomorfologija	20
2.6.3	Klinični znaki.....	20
2.7	PRVI DOKAZ VIRUSA PED V SLOVENIJI	22
2.8	DOKAZOVANJE VIRUSA PED.....	22
2.8.1	Dokazovanje virusa PED z metodo RT-PCR.....	22
2.8.2	Dokazovanje virusa PED z metodo RT-qPCR.....	22
2.8.3	Sekvenciranje po Sangerju.....	23
2.8.4	Sekvenciranje naslednje generacije.....	24
2.8.4.1	Roche/454 Life Sciences	24
2.8.4.2	SOLiD	25
2.8.4.3	Illumina	25
2.8.4.4	Ion Torrent	26

3	MATERIALI IN METODE	29
3.1	MATERIALI	29
3.1.1	Vzorčenje blata prašičev na PED pozitivni farmi	29
3.2	METODE	29
3.2.1	Delo v Laboratoriju za molekularno virologijo	29
3.2.2	Priprava suspenzije vzorca iz blata	30
3.2.3	Osamitev nukleinskih kislin RNA s komercialnim kompletom QIAamp® Viral RNA Mini Kit	30
3.2.4	Dokaz prisotnosti nukleinskih kislin virusa PED v vzorcih z metodo RT-qPCR	30
3.2.5	Ponovna osamitev nukleinskih kislin virusa PED iz pozitivnih vzorcev za potrebe sekvenciranja celotnega genoma	31
3.2.5.1	Ponovna priprava suspenzije iz vzorcev blata	31
3.2.5.2	Osamitev virusne nukleinske kisline s komercialnim kompletom QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen, Nemčija)	31
3.2.5.3	Osamitev virusne nukleinske kisline z reagentom TRIzol® (Life technologies, ZDA)	32
3.2.5.4	Kvantifikacija virusne RNA z metodo RT-qPCR	32
3.2.6	Priprava vzorcev za NGS	32
3.2.6.1	Merjenje količine osamljene RNA v vzorcih	32
3.2.6.2	Fragmentacija	33
3.2.6.3	Vezava adapterjev	33
3.2.6.4	Reverzna transkripcija	33
3.2.6.5	Pomnoževanje cDNA in priprava knjižnice z barkodami	33
3.2.6.6	Ocena uspešnosti priprave knjižnice	34
3.2.6.7	Združevanje vzorcev, vezava matrične cDNA na Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles sferice, obogatitev in pomnoževanje vzorca s sistemom Ion OneTouch™2	34
3.2.7	Sekvenciranje celotnega genoma virusa PED s tehnologijo Ion Torrent	36
3.2.7.1	Nastavitev nove izvedbe na Torrent Server in priprava Ion PGM™ aparature za uporabo	37
3.2.7.2	Polnjenje čipa Ion 314™ Chip v2 in zagon postopka sekvenciranja	37
3.2.8	Analiza rezultatov sekvenciranja	38
3.2.8.1	Delo s programom IGV	38
3.2.8.2	Delo s programom EditSeq in algoritmom BLAST	38
3.2.8.3	Delo s programom MegAlign	39
4	REZULTATI	40
4.1	PRVI DOKAZ VIRUSA PED V VZORCIH BLATA PRAŠIČEV	40
4.2	DOKAZ VIRUSA PED PO ZAPOREDNI OSAMITVI S KOMERCIALNIM KOMPLETOM QIAamp® IN REAGENTOM TRIzol®	41
4.3	PREVERJANJE USPEŠNOSTI POSTOPKA PRIPRAVE VZORCEV ZA SEKVENCIRANJE S TEHNOLOGIJO ION TORRENT	42
4.4	NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE GENOMA VIRUSA PED SEVA SLO/JH-11/2015 IN FILOGENETSKA PRIMERJAVA	43
4.4.1	Filogenetska primerjava celotnih genomov virusa PED	46
4.4.2	Določitev bralnih okvirjev	50

4.4.2.1	Bralni okvir ORF1ab.....	50
4.4.2.2	Bralni okvir proteina receptorja (S).....	50
4.4.2.3	Bralni okvir ORF3.....	55
4.4.2.4	Bralni okvir proteina ovojnice.....	55
4.4.2.5	Bralni okvir membranskega proteina	55
4.4.2.6	Bralni okvir proteina nukleokapside	56
5	RAZPRAVA	57
6	SKLEPI.....	64
7	ZAHVALE	65
8	LITERATURA.....	66
9	PRILOGE.....	76

KAZALO TABEL

Tabela 1: Koronavirusne okužbe pri različnih vrstah gostiteljev ter njihova mesta razmnoževanja	6
Tabela 2: Rezultati metode RT-qPCR za dokaz virusa PED pri 6 pozitivnih vzorcih.....	40
Tabela 3: Prikaz odstotka podobnosti in različnosti med izbranimi sevi virusov PED.....	48
Tabela 4: Prikaz delecij in insercije v bralnem okvirju proteina receptorja.....	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematičen prikaz zgradbe genoma virusa PED.....	12
Slika 2: Shematičen prikaz zgradbe viriona PED.....	13
Slika 3: Shematičen prikaz strukture gena, ki kodira protein receptorja, umeščen v celoten genom virusa PED.....	14
Slika 4: Filogenetska primerjava celotnih genomov virusov PED.....	17
Slika 5: Filogenetska primerjava gena za protein receptorja virusa PED.....	18
Slika 6: Shematski prikaz reakcijske mikrojamice pri Ion Torrent čipu.....	27
Slika 7: Prikaz reakcijskih mikrojamic na Ion 314 TM čipu.....	28
Slika 8: Ion OneTouch TM 2 sistem.....	35
Slika 9: Sekvenator Ion PGM TM System.....	36
Slika 10: Ion 314 TM Chip v2 ter Ion 316 TM Chip v2 čipi.....	37
Slika 11: Grafični prikaz rezultatov metode RT-qPCR za dokaz virusa PED.....	41
Slika 12: Rezultati meritve uspešnosti priprave knjižnice za sekvenciranje.....	42
Slika 13: Prikaz osnovnih parametrov sekvenciranja.....	44
Slika 14: Prikaz razmerja in dolžin sekvenc fragmentov za vzorec PED JH-11.....	44
Slika 15: Prikaz krajšega odseka genoma SLO/JH-11/2015 s prilegajočimi zaporedji v programu IGV.....	45

Slika 16: Prikaz pokritosti celotnega genoma SLO/JH-11/2015 v programu IGV	45
Slika 17a: Shematski prikaz strukture genoma seva SLO/JH-11/2015	46
Slika 17b: Začetne in končne pozicije posameznih bralnih okvirjev	46
Slika 18: Primerjava celotnih genomov 49 sevov virusov PED.....	49
Slika 19: Prikaz delecij na treh mestih v delu genoma, ki kodira protein receptorja, v primerjavi s 16 drugimi sevi virusa PED	52
Slika 20: Prikaz delecije in insercije v delu genoma, ki kodira protein receptorja, v primerjavi s 16 drugimi sevi virusa PED	52
Slika 21: Filogenetska primerjava 4152 nukleotidov, ki kodirajo protein receptorja	54

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

AK: aminokislina

BoCoV: goveji koronavirus; angl. bovine coronavirus

CCoV: pasji koronavirus; angl. canine coronavirus

cDNA: komplementarna deoksiribonukleinska kislina

CoV: koronavirus

dATP: deoksiadenozin trifosfat

dCTP: deoksicitidin trifosfat

ddATP: dideoksiadenozin trifosfat

ddCTP: dideoksicitidin trifosfat

ddGTP: dideoksigvanozin trifosfat

ddTTP: dideoksitimidin trifosfat

dGTP: deoksigvanozin trifosfat

DNA: deoksiribonukleinska kislina

dTTP: deoksitimidin trifosfat

E: protein ovojnice; angl. envelope protein

EVD: epidemična virusna diareja; angl. epidemic virus diarrhea

FCoV: mačji koronavirus; angl. feline coronavirus

FIPV: virus kužnega peritonitisa mačk, angl. feline infectious peritonitis virus

GA: angl. genome analyzer

HCoV: humani koronavirus; angl. human coronavirus

IBV: virus kužnega bronhitisa; angl. infectious bronchitis virus

IGV: angl. Integrative Genomics Viewer

ISP: angl. Ion Sphere™ Particles

M: membranski protein

MERS: srednjevzhodni respiratorni sindrom; angl. Middle East respiratory syndrome

MHV: virus mišjega hepatitisa; angl. mouse hepatitis virus

mp: pomožni membranski protein; angl. accessory membrane protein

N: protein nukleokapside

NGS: sekvenciranje naslednje generacije; angl. next generation sequencing

ORF: odprti bralni okvir; angl. open reading frame

PCR: verižna reakcija s polimerazo; angl. polymerase chain reaction

PED: prašičja epidemična diareja; angl. porcine epidemic diarrhea

PEDV: virus prašičje epidemične diareje; angl. porcine epidemic diarrhea virus

PGM: angl. personal genome machine

PRCV: prašičji respiratorni koronavirus; angl. porcine respiratory coronavirus

qPCR: verižna reakcija s polimerazo v realnem času; angl. real-time polymerase chain reaction

RaCoV: zajčji koronavirus; angl. rabbit coronavirus

RCoV: podganji koronavirus; angl. rat coronavirus

RNA: ribonukleinska kislina

RT-PCR: reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo; angl. reverse transcription and polymerase chain reaction

RT-qPCR: reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo v realnem času; angl. real-time reverse transcription and polymerase chain reaction

S: protein receptorja; angl. spike protein

SARS: sindrom akutne respiratorne stiske; angl. severe acute respiratory syndrome

TCoV: puranji koronavirus; angl. turkey coronavirus

TGE: virusno vnetje želodca in črevesja; angl. transmissible gastroenteritis

TGEV: virus virusnega vnetja želodca in črevesja; angl. transmissible gastroenteritis virus

UTR: nekodirajoča regija; angl. untranslated region

1 UVOD

Temelje za hitro določanje zaporedja nukleotidov (sekvenciranje) v nukleinskih kislinah je leta 1977 postavil Friderick Sanger z odkritjem postopka z uporabo kemijsko modificiranih nukleotidov, ki ob njihovi vgradnji zaustavijo sintezo verige (Sanger in sod., 1977). S tem se je začel hiter razvoj področja biotehnologije, znanstveniki pa so vse bolj spoznavali pomen in vrednost genetike ter genomike. Projekt Človeški genom, ki se je začel v osemdesetih letih prejšnjega stoletja, je bil mednarodni in interdisciplinarni projekt, katerega cilj je bil določiti celotno nukleotidno zaporedje humanega genoma. Tako se je pojavila potreba po novih, hitrejših in učinkovitejših metodah visoko zmogljivostnega sekvenciranja, kar je imelo za posledico razvoj mnogih novih tehnologij, ki se danes že uporabljajo v laboratorijih po celem svetu. To je privedlo do hitrega razvoja številnih različic verižne reakcije s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction), sekvenatorjev na principu kapilarne elektroforeze ter avtomatizacije in izboljšav mnogih, že poznanih molekularnih tehnologij.

Prva tehnologija sekvenciranja nove generacije (NGS) je na tržišče prišla leta 2005, s strani podjetja 454 Life Sciences, ki je zasnovalo prvi sekvenator nove generacije GS 20. Sekvenatorji so aparature, ki uporabljajo tehnologije, katere omogočajo določanje sekvenc celotnih genomov v enem samem ciklu, ki lahko traja le nekaj ur do nekaj dni. To je dosežek, za katerega bi v preteklosti, s sekvenciranjem po Sangerju, lahko potrebovali mesece ali leta. Razvoj tehnologij je prinesel več različnih metod določanja nukleotidnega zaporedja, kot sta 454 sistem, ki temelji na pomnoževanju z emulzijskim PCR in pirosekvenciranju, ali SOLiD tehnologija, ki se poslužuje emulzijskega PCR in sekvenciranja s sintezo. Sekvenciranje s sintezo uporabljajo tudi platforme podjetja Illumina. Vsem omenjenim tehnologijam je skupno to, da za zaznavo vezave nukleotida v nastajajočo verigo uporabljajo optične sisteme za merjenje iluminence ali fluorescence. Tehnologija sekvenciranja naslednje generacije (NGS, angl. next generation sequencing) Ion Torrent, ki smo jo uporabili za izvedbo naše raziskave, pa temelji na uporabi polprevodnika, ki z merjenjem spremembe pH, do katere pride ob vgraditvi nukleotida v nastajajočo verigo, pretvori kemično informacijo sproščenega H⁺ iona v digitalno obliko. Takšen način sekvenciranja ne zahteva uporabe kemično označenih nukleotidov in posebne optične tehnologije, kar bistveno zniža ceno reagentov in

posamezne aparature. Tehnologija Ion Torrent je zato zaradi svoje nižje cene, učinkovitosti in preprostosti uporabe postala dostopna tudi manjšim laboratorijem.

V naši raziskavi smo uporabili aparaturo Ion Personal Genome Machine™ (PGM) System (LifeTechnologies, Thermo Fischer Scientific, ZDA), ki jo je Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani pridobila v letu 2014. Poleg določitve celotnega genoma virusa prašičje epidemične diareje (PED) smo se v tej raziskavi tudi boljše spoznali s celotnim procesom sekvenciranja s tehnologijo NGS in njenimi kritičnimi točkami.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

V Sloveniji do leta 2015 nismo imeli potrjenega primera izbruha PED. Kljub temu, da je virus poznan že od leta 1971, do nedavnega ni povzročal velikih ekonomskih škod, zato epidemiološko stanje v Evropi ni dobro poznano. V Aziji je virus PED stalno prisoten in je zato iz tega dela sveta več objavljenih podatkov. Povečano zanimanje za okužbe z virusom PED se je pojavilo po prvih potrjenih izbruhih v ZDA leta 2013, kjer je epidemija virusa PED povzročila velike izgube v prašičereji. V zadnjih dveh letih so po svetu ugotavljali pojav številnih različic virusa, v začetku leta 2015 pa je bil virus PED potrjen tudi na dveh prašičjih rejah v Sloveniji (Toplak in sod., 2015). Z določitvijo celotnega genoma bi pripomogli k poznavanju epidemiološkega stanja v Evropi, natančneje genetsko karakterizirali naš sev in ga primerjali z ostalimi poznanimi sevi iz genske banke podatkov (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Povzročitelj PED bi postal prvi virus, kateremu bi v veterinarski medicini v Sloveniji določili celotno nukleotidno zaporedje.

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

Cilj raziskovanja je določiti celoten genom virusa PED, ki se je pred kratkim prvič pojavil v Sloveniji. To bomo izvedli s pomočjo tehnologije Ion Torrent na aparaturi Ion PGM™ System (LifeTechnologies, Thermo Fischer Scientific, ZDA). Dobljeno zaporedje bomo s pomočjo programov Integrative Genomics Viewer (IGV, Broad Institute, ZDA) ter DNASTAR Lasergene 10 Core Suite (DNASTAR, ZDA), analizirali, določili posameznebralne okvirje in ga primerjali z drugimi sekvencami virusa PED iz baze podatkov GenBank. S filogenetsko analizo bomo pokazali genetske povezave in določili razlike med posameznimi

sevi. Z umestitvijo našega seva med ostale znane seve bomo pripomogli k boljšemu razumevanju epizootiologije virusa PED, tako v evropskem prostoru kot v svetovnem merilu. Tekom dela bomo zasnovali osnovni protokol za kasnejšo rutinsko uporabo Ion PGMTM System sekvenatorja.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Sev virusa PED, ki je bil potrjen v Sloveniji, spada med S INDEL seve.
- Sev virusa PED, ki se pojavlja v Sloveniji je genetsko soroden ostalim sevom, ki so prisotni v Evropi po letu 2013.
- Osamitev virusne RNA iz blata s komercialnim kompletom QIAamp[®]Viral RNA Mini kita in komercialnim reagentom TRIzol[®] je primera metoda za pridobitev virusne nukleinske kisline za metodo NGS.
- S tehnologijo sekvenciranja Ion Torrent je mogoče hitro in zanesljivo določiti nukleotidno zaporedje celotnega virusnega genoma brez uporabe specifičnih oligonukleotidnih začetnikov.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 PREGLED ZGODOVINSKIH PODATKOV O POJAVLJANJU KORONAVIRUSOV

Začetki raziskovanja virusov, ki jih danes uvrščamo v družino *Coronaviridae* (koronavirusi), segajo v leto 1931, ko so v Severni Dakoti prvič opisali novo obolenje dihal pri piščancih. Bolezen so poimenovali kužni bronhitis (Schalk in Hawn, 1931). Šest let kasneje so iz piščančjih embrijev, inokuliranih na horioalantoisno membrano, uspeli osamiti povzročitelja, virus kužnega bronhitisa perutnine (IBV) (Beaudette in Hudson, 1937). Prvi celoten genom virusa IBV so v letu 1986 določili s postopkom sekvenciranja po Sangerju (Boursnell in sod., 1987).

V 1940-ih letih so opisali večje število obolenj, ki jih povzročajo koronavirusi pri sesalcih, kot sta virus kužnega vnetja želodca in črevesja (TGEV) (Doyle in Hutchings, 1946) in virus mišjega hepatitisa (MHV) (Cheever in sod., 1949). Leta 1966 so odkrili prva humana koronavirusa HCoV 229E (Tyrell in Bynoe, 1966) in HCoV OC43 (Hamre in Procknow, 1966), ki sta povzročala blažja prehladna obolenja in okužbe dihal.

Ta odkritja so vzpodbudila zanimanje za koronavirusne okužbe in pojasnila nekatere antigenske lastnosti ter filogenetske poveze med njimi (McIntosh in sod., 1969; Bradburne, 1970; Pensaert in sod., 1981). V omenjenih študijah so ugotavljali precejšnjo razliko med IBV in ostalimi preiskovanimi koronavirusi. Pensaert in sod. (1981) v svoji raziskavi niso uspeli potrditi uvrstitve koronavirusu-podobnega seva CV777 med koronaviruse na podlagi antigenskih lastnosti. Med koronaviruse so sev CV777 takrat uvrstili na podlagi elektronske mikroskopije (Pensaert in Debouck, 1978), danes pa vemo, da je bil to prvi poznan sev virusa PED.

Leta 1984 so v Belgiji odkrili novo, respiratorno različico koronavirusa TGE, katero so poimenovali prašičji respiratorni koronavirus (PRCV). Ta se za razliko od TGEV namnožuje predvsem v epitelijskih celicah respiratornega sistema ter alveolarnih makrofagih, okužba pa je običajno nezaznavna. Prašiči, okuženi z PRCV proizvajajo zaščitna protitelesa proti virusu

TGE, zato je protitelesa obeh okužb nemogoče razlikovati s serumnevtralizacijskim testom. PRCV je endemično prisoten tako v Evropi kot v Ameriki (Wesley in sod., 1991).

Danes vemo, da so koronavirusne okužbe prisotne pri številnih vrstah sesalcev, kot so netopirji, prašiči, kiti in ljudje, poleg sesalcev pa so koronavirusi pogosti tudi pri pticah (Tabela 1). Koronavirusi so pretežno vrstno specifični, kljub temu pa so znani primeri prenosa med vrstami. Koronavirusi kažejo afiniteto predvsem do epitelnih celic dihal, prebavil in makrofagov (Lee, 2015).

Tabela 1: Koronavirusne okužbe pri različnih vrstah gostiteljev ter njihova mesta razmnoževanja (povzeto po Saif, 2004).

Table 1: Coronavirus infections in different host species and their replication sites (adopted from Saif, 2004).

Koronavirus:	Gostitelj:	Mesto razmnoževanja/bolezen:
TGEV (virusno vnetje želodca in črevesja)	prašič	Prebavila, dihala (zgornja)
PRCV (prašičji respiratorni koronavirus)	prašič	Dihala, viremija
PEDV (prašičja epidemična diareja)	prašič	Prebavila
FIPV (virus kužnega peritonitisa mačk)	mačka	Dihala (zgornja), prebavila, sistemska okužba
FCoV (mačji koronavirusni enteritis)	mačka	Prebavila (tanko črevo)
CCoV (pasji koronavirus)	pes	Prebavila (tanko črevo)
RaCoV (zajčji koronavirus)	zajec	Sistemska okužba
MHV (virus mišjega hepatitisa)	miš	Prebavila, jetra, centralni živčni sistem
RCoV (podganji koronavirus)	podgana	Dihala, oči, slinske žleze
	prašič	Dihala, osrednji živčni sistem
BoCoV (goveji koronavirus)	govedo	Dihala, prebavila
IBV (virus kužnega bronhitisa)	kokoš	Dihala (zgornja), prebavila, jajcevod, ledvice
TCoV (koronavirusni enteritis puranov)	puran	Prebavila (tanko črevo)
Civet cat CoV (koronavirus cibetovk)	cibetovka, rakunski	Dihala in prebavila
	pes	
SARS (sindrom akutne respiratorne stiske)	človek	Dihala (pljuča), prebavila, viremija
MERS (srednjevzhodni respiratorni sindrom)	človek	Dihala in prebavila
HCoV-229E (humani koronavirus 229E)	človek	Dihala (zgornja)
HCoV-OC43 (humani koronavirus OC43)	človek	Dihala (zgornja)

2.1.1 Epidemija SARS in močno povečano zanimanje za družino

Coronaviridae

Do leta 2003 smo poznali 19 koronavirusov, v genski banki (GenBank) pa so bile dostopne sekvence celotnih genomov le desetih koronavirusov (Woo in sod., 2007; Woo in sod., 2009a). Čeprav so ugotovljeni koronavirusi pri živalih povzročali precej huda obolenja, je do izbruha epidemije SARSa (angl.: severe acute respiratory syndrome) v letih 2002-2003 veljalo, da koronavirusi pri ljudeh povzročajo le blaga obolenja zgornjega in spodnjega dihalnega trakta. V letu 2002 je so na Kitajskem prvič ugotovili nov humani koronavirus, ki je povzročal hude, atipične pljučnice z visoko smrtnostjo, imenovanega sindrom akutnega oteženega dihanja - SARS (Drosten in sod., 2003; Ksiazek in sod., 2003). Kmalu po začetku epidemije SARS so povzročitelja osamili, sekvencirali celoten genom in ga karakterizirali (Qin in sod., 2003). Ugotovili so, da ima SARS zoonotski potencial in bi naj na ljudi prešel preko cibetovk in netopirjev iz rodu *Rhinolophus*. Zmožnost hitrega širjenja virusa preko aerosola in zaradi številnih stikov obolelih z zdravimi ljudmi je imelo za posledico, da je SARS na Kitajskem dosegel epidemične razsežnosti (Cheng in sod., 2007). SARS se je razširil tudi na Tajvan, v Vietnam in Singapur, izven področja Azije so o posameznih primerih poročali tudi iz Toronta v Kanadi (Hung LS, 2003). V letih po pojavu omenjene epidemije je prišlo do povečanega zanimanja za koronavirus, povečalo se je tudi število sekvenc celotnih genomov v podatkovni zbirki GenBank.

Povečanju števila znanih koronavirusov in njihovih celotnih genomov je sledilo tudi več primerjalnih filogenetskih raziskav. Leta 2007 so Woo in sodelavci opravili obsežno študijo koronavirusov pri netopirjih na Kitajskem. Ugotovili so prisotnost petih različnih koronavirusov, od teh dva do tedaj še nepoznana, bat CoV HKU9 in HKU10. Sekvencirali so štiri celotne genome ter jih primerjali z že znanimi genomi koronavirusov. Rezultati so kazali na to, da bi bilo potrebno uvesti dve dodatni podskupini v 2. skupino koronavirusov. Predlagali so, da je bolj smiselno klasificirati koronavirusne skupine 1, s podskupinama 1a in 1b, skupine 2, s podskupinami 2a, 2b, 2c in 2d, ter skupino 3, v sedem samostojnih skupin (Woo in sod., 2007). Dve leti kasneje so Woo in sodelavci opravili podobno študijo tudi pri pticah. Zaznanih ptičjih koronavirusov ni bilo veliko, zaradi podobnih lastnosti ptic in netopirjev pa so sklepali, da je velika verjetnost, da so pri pticah prisotni še drugi, do tedaj

nepoznani koronavirusi. Opravili so epidemiološko študijo pri poginjenih divjih pticah in odkrili tri nove koronavirusne: BuCoV HKU11, ThCoV HKU12 in MuCoV HKU13. Uspeli so sekvencirati celotne genome omenjenih virusov in glede na rezultate primerjav z že znanimi koronavirusi, predlagali novo podskupino 3c (Woo in sod., 2009a).

Junija, leta 2012 so v Savdski Arabiji pri človeku, ki je zbolel z akutno pljučnico in ledvično odpovedjo osamili nov koronavirus in ga poimenovali HCoV-EMC. Klinična slika, ki jo je virus povzročal je bila zelo podobna SARSu. Z določitvijo celotnega genoma virusa so ugotovili, da je nov virus najbližje dvema koronavirusoma, ki so ju osamili pri netopirjih: HKU4 in HKU5 in spada med betakoronaviruse (Zaki AM in sod., 2012). Podoben primer okužbe so leta 2012 ugotovili pri pacientu iz Katarja in z genetsko primerjavo osamljenih virusov ugotovili, da gre za istega povzročitelja. Virus so preimenovali v MERS koronavirus (angl. Middle East respiratory syndrome). Z retrogradno študijo so virus MERS potrdili, kot povzročitelja izbruha težkih obolenj dihal pri ljudeh že Aprila 2012 v Jordaniji. O sporadičnih primerih so poročali tudi v Združenih Arabskih Emiratih, Grčiji, Maleziji, Filipinih, Angliji, Franciji, Tuniziji, Egiptu, ZDA, Italiji in na Nizozemskem. Do julija 2014 so potrdili že preko 800 primerov MERS. Novejše raziskave so pokazale, da je MERS koronavirus na človeka prešel iz okuženih kamel (Al Tawfiq in Memish, 2014).

2.1.2 Predlagan model evolucije koronavirusov

Glede na opravljene primerjalne filogenetske študije je predlagan model evolucije kjer naj bi bili netopirji rezervoar za alfa- in betakoronaviruse, ptice pa rezervoar virusov, ki so uvrščeni med gama- in deltakoronaviruse. To teorijo podpira dejstvo, da poznamo bogato raznolikost netopirskih koronavirusov v rodovih alfa- in betakoronavirusov, ne pa pri gama- in deltakoronavirusih. Istočasno je znana velika raznolikost ptičjih koronavirusov v rodu gama- in deltakoronavirusov, ne pa pri alfa- in betakoronavirusih. Ali so se koronavirusi najprej pojavili pri pticah in nato preskočili na netopirje, ali obratno, še ni pojasnjeno. Znano pa je, da so koronavirusi relativno pogosto preskakovali znotraj vrst netopirjev ter znotraj vrst ptic. Preskok na druge vrste sesalcev se je pogosteje zgodil pri netopirjih, kot pri pticah (Woo in sod., 2012).

2.2 PREGLED ZGODOVINSKIH PODATKOV O POJAVLJANJU VIRUSA PED

Pojav bolezni, ki jo povzroča virus PED, so prvič zabeležili leta 1971 v Veliki Britaniji, vendar takrat samega povzročitelja še niso poznali (Oldham, 1972). Bolezen so v prvih letih opisali kot nov sindrom prašičje epidemične diareje (Wood, 1977).

2.2.1 Ugotovitev povzročitelja PED

V zgodnjih 70. letih prejšnjega stoletja so bolezen zaznali tudi v Belgiji. Povzročitelja so prvič opisali pri eksperimentalno okuženih pujskih, katerim so oralno aplicirali zmleta črevesja naravno okuženih prašičev z izraženimi kliničnimi znaki. Z elektronskim mikroskopom so v črevesni vsebini in na črevesni sluznici prašičev odkrili virione, za katere so predvidevali, da spadajo med koronavirus (Chasey in Cartwright, 1978). V Belgiji so koronavirusom podobne delce prav tako ugotovili pri obolelih prašičih iz štirih preiskovanih rej. Koronavirus so poimenovali z imenom CV777 in ugotovili, da se razlikuje od do takrat vseh znanih prašičjih koronavirusov. Opravljena je bila tudi raziskava, s katero so potrdili, da v krvnih serumih prašičev pred letom 1971, ni bilo prisotnih specifičnih protiteles proti virusu PED. To odkritje je potrdilo, da gre za novo ugotovljeni virus v evropski populaciji prašičev (Pensaert in Debouck, 1978).

2.2.2 Pojavljanje virusa PED po svetu

Do nedavnega PED ni bila zelo poznana bolezen v svetu ali pa so ji zaradi relativno majhnih ekonomskih škod posvečali manj pozornosti. Izjema so Azijske države, v katerih je PED od vsega začetka povzročal precejšnje ekonomske škode in relativno visoko smrtnost pri sesnih pujskih. V hudi epidemiji, ki so jo prvič zaznali leta 2013 v ZDA, je PED povzročil smrt več kot 8 milijonov sesnih pujskov. Takrat se je zanimanje za bolezen PED bistveno povečalo. Poročajo tudi o epidemiji v Južni Koreji, Tajvanu in na Japonskem (Lee, 2015). PED je danes prepoznana kot ena izmed nevarnejših prašičjih virusnih bolezni, ki predstavlja veliko ekonomsko grožnjo prašičereji po svetu.

2.2.2.1 Pojavljanje okužb z virusom PED v Evropi

Odkritju virusa PED v Veliki Britaniji in Belgiji so sledili manjši izbruhi in potrditev prisotnosti virusa še v nekaterih drugih evropskih državah. V naslednjih dveh desetletjih so o prašičji epidemični diareji poročali na Češkem, Madžarskem, Nizozemskem, v Italiji, Nemčiji, Franciji, Španiji, Bolgariji in Švici (Song in Park, 2012). V devetdesetih letih je prišlo do občutnega zmanjšanja števila izbruhov v Evropi, poročali so samo še o posameznih primerih (Carvajal in sod., 2015). V letih 2005 in 2006 je prišlo v severni Italiji do epidemije PED, v kateri so obolevali prašiči vseh starosti v 63 rejah prašičev (Martelli in sod., 2008). To je bila edina zabeležena epidemija PED takšnega obsega v Evropi v zadnjih 10 letih. Po letu 2013 so o posameznih izbruhih poročali v Nemčiji (Staedler in sod., 2015), Italiji (Alborali in sod., 2014), Belgiji (Theuns in sod., 2015), Franciji (Grasland in sod., 2015), Ukrajini (Dastejerdi in sod., 2015) in na Nizozemskem (Van der Wolf in sod., 2015).

2.2.2.2 Pojavljanje okužb z virusom PED v Aziji

Prvi izbruh PED so na Japonskem zabeležili leta 1982. Z laboratorijskimi preiskavami tkivnih vzorcev tankega črevesa obolelih prašičev so izključili prisotnost virusa TGE, elektronskomikroskopska preiskava pa je dokazala prisotnost koronavirusom-podobnih virusnih delcev (Takahashi in sod., 1983). Istega leta so prisotnost virusa PED potrdili tudi na Kitajskem (Xuan in sod., 1984). V devetdesetih letih je prišlo do razširitve PED v Korejo (Kweon in sod., 1993), na Filipine ter na Tajsko (Srinuntapunt in sod., 1995). O izbruhih v Vietnamu in Tajvanu so poročali približno deset let kasneje. V Azijskih državah ostaja PED do danes aktualna bolezen, ki redno povzroča izbruhe z relativno visoko smrtnostjo pujskov, ter je vzrok za velike ekonomske škode. V zadnjem času je PED v Aziji pridobil endemične razsežnosti (Carvajal in sod., 2015).

2.2.2.3 Pojavljanje okužb z virusom PED v ZDA

Prvi pojav prašičje epidemične diareje v ZDA so ugotovili leta 2013, v zvezni državi Iowa (Stevenson in sod., 2013). Genom seva virusa PED, ki so ga osamili je najbolj podoben sevu, ki je v letih 2011 in 2012 povzročal izbruhe na Kitajskem (Stevenson in sod., 2013). Tekom leta 2013 se je virus PED izjemno hitro razširil v številne zvezne države in dosegel epidemične razsežnosti. O izbruhih so poročali kar v 25 zveznih državah, pa tudi izven ZDA, v Mehiki, Peruju, Dominikanski Republiki in Kanadi. V letu 2014 so prisotnost virusa potrdili

tudi v Kolumbiji in Ekvadorju (EFSA, 2014). Virus PED je v ZDA povzročil ogromne ekonomske škode, saj je populacija domačih prašičev že v prvem letu epidemije padla za skoraj 10% (Jung in Saif, 2015).

2.3 KLASIFIKACIJA VIRUSOV PED

Virus PED uvrščamo v družino *Coronaviridae*, ki skupaj z družinami *Arteriviridae*, *Mesoniviridae* in *Roniviridae* predstavljajo red *Nidovirales*, kateremu je skupna strategija pomnoževanja in organizacija genoma. Družina *Coronaviridae* se nadalje deli na dve poddružini; *Coronavirinae* in *Torovirinae*. Predvideva se, da so se vsi predstavniki reda *Nidovirales* razvili iz skupnega prednika. Koronaviruse danes razvrščamo v štiri rodove in sicer alfa-koronaviruse, beta-koronaviruse, gama-koronaviruse in nedavno odkrit rod deltakoronavirusov (Jung in Saif, 2015, MacLachlan in Dubovi, 2011; Virus taxonomy, 2015). Virus PED uvrščamo med alfa-koronaviruse skupaj z virusom TGE, PRCV, virusom FIP, pasjim koronavirusom in drugimi. (Virus taxonomy, 2015).

Virioni koronavirusov so pleomorfne ali sferične oblike, velikosti 80-220 nm, velikost virusa PED pa je približno 130 nm. Za koronaviruse je značilna virusna ovojnica s številnimi peplomerami, ki so pri virusu PED v obliki kija in velikosti 18-23 nm. Notranja struktura je ikozaedrične oblike, znotraj katere je helikalna nukleokapsida. Genom predstavlja enojnovijačna, pozitivno polarna molekula RNA velikosti 25-31 kb, ki kodira tri do štiri strukturne proteine. Pomnoževanje virusa poteka v citoplazmi gostiteljeve celice, novi virioni nastajajo na membrani endoplazmatskega retikuluma in se sproščajo s procesom eksocitoze (MacLachlan in Dubovi, 2011; Straw in sod., 2006).

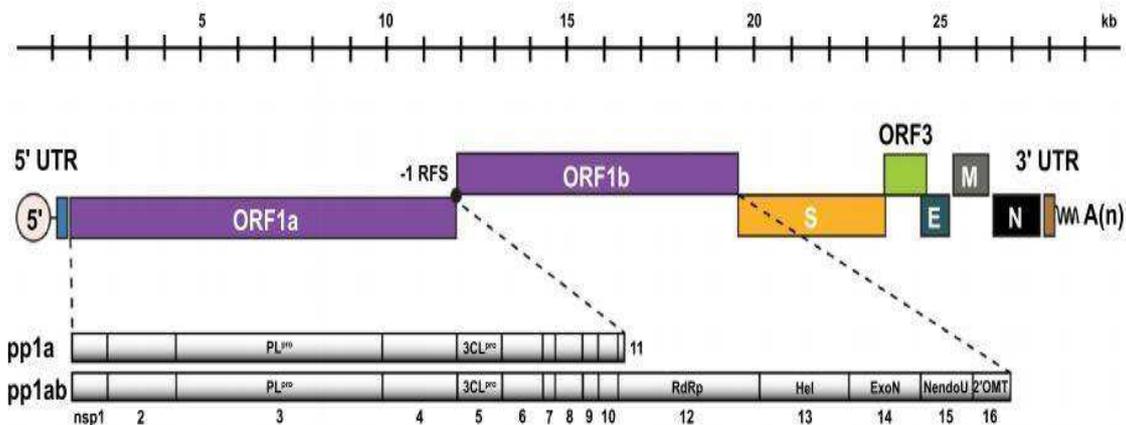
2.4 GENOM VIRUSA PED

Genom virusa PED je zgrajen iz enojnovijačne, pozitivno polarne molekule RNA. Dolžina se giblje okoli 28.000 nukleotidov (nt). Genom je organiziran podobno kot genomi ostalih koronavirusov, kodira pa štiri strukturne proteine ter štiri nestrukturne proteine. (Jung in Saif, 2015).

Na 5' koncu genoma virusa PED najdemo nekodirajočo regijo (angl. untranslated region, UTR) in 7 odprtih bralnih okvirjev (angl. open reading frame, ORF): ORF1a, ORF1b in ORF2-6.

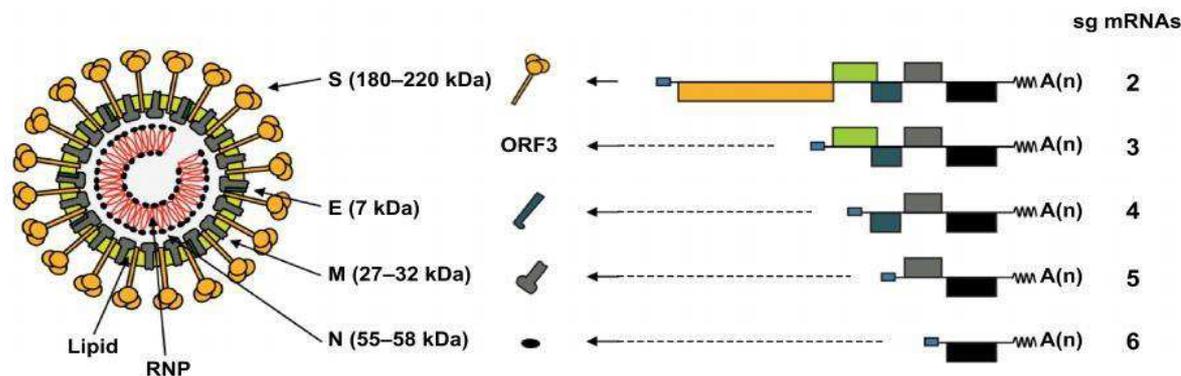
ORF1a in 1b obsegata približno dve tretjini celotnega genoma in kodirata virusne nestrukturne proteine. ORF1a kodira poliprotein replikazo. ORF1b se izrazi z -1 ribosomalnim zamikom bralnega okvirja in kodira od RNA odvisno RNA polimerazo, eksonukleazo, endoribonukleazo in metiltransferazo. Ribosomalni zamik povzroči nastanek poliproteina, ki se z interno proteazo razcepi na 16 končnih produktov: nsp (nestrukturni protein) 1-16 (Lee, 2015; Song in sod., 2015).

Odprti bralni okvirji v nadaljevanju kodirajo 4 strukturne proteine: glikozilirani protein receptorja (angl. spike), ki je navadno označen s črko S in je velikosti 150-220 kDa, nukleoprotein (N) v velikosti 58 kDa, membranski protein (M) v velikosti 20-30 kDa, protein ovojnice (E) v velikosti 7 kDa in pomožni gen ORF3 (Slika 1 in Slika 2) (Lee, 2015).



Slika 1: Shematičen prikaz zgradbe genoma virusa PED. Oznaka pp1a pomeni poliprotein 1a, oznaka pp1ab pa poliprotein 1ab (Lee, 2015).

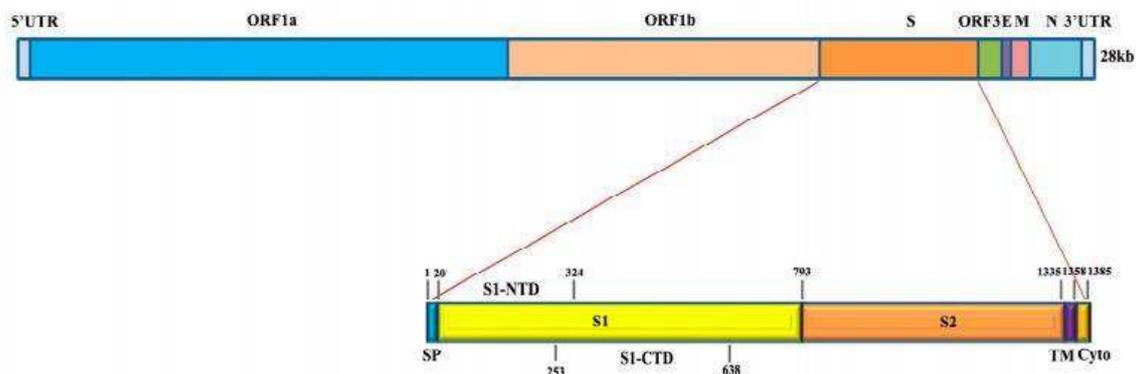
Figure 1: Schematic presentation of PED viral genome structure. Pp1a stands for poliprotein 1a, pp1ab stands for poliprotein 1ab (Lee, 2015).



Slika 2: Shematičen prikaz zgradbe viriona PED (Lee, 2015).

Figure 2: Schematic presentation of PED virion structure (Lee, 2015).

Strukturni protein receptorja (S) je 1.383 aminokislin dolg glikoprotein ovojnice virusa tipa 1 in je sestavljen iz dveh podenot: S1 in S2 (Slika 3). Njegova vloga je pripenjanje viriona na gostiteljevo celico in omogoča vstop viriona v celico, poleg tega pa v naravnem gostitelju sproži nastanek nevtralizacijskih protiteles. Sodeluje tudi pri adaptaciji rasti na celičnih kulturah v *in vitro* pogojih ter atenuaciji virusa v *in vivo* pogojih. Zaradi raznolikosti je protein receptorja primeren za določanje sorodnosti med sevi virusa PED, razvoj diagnostičnih metod in cepiv. Zaradi pojavljanja velike genetske raznolikosti in sprememb aminokislinskega zaporedja proteina S, se od prvega pojava virusa PED pa do danes seve največkrat genotipizira glede na to regijo virusnega genoma. Ta naj bi vplivala tudi na patogenost posameznih sevov, kar se kaže predvsem v različno močno izraženih kliničnih znakih pri klasičnih sevih virusa PED in novih, S INDEL sevih, za katere so značilne delecije in insercije v genu za protein receptorja. Spremembe v proteinu receptorja se s pridom uporablja pri epizootioloških raziskavah (Lee, 2015; Song in sod., 2015).



Slika 3: Shematičen prikaz strukture gena, ki kodira protein receptorja, umeščen v celoten genom virusa PED (Deng in sod., 2016).

Figure 3: Schematic presentation of spike protein gene structure in comparison with complete genome structure of PED virus (Deng et al., 2016).

Membranski protein (M) predstavlja največji delež virusne ovojnice, potreben je za sestavo novih virionov ter sproža nastanek nevtralizacijskih protiteles v gostitelju. Pri gostitelju naj bi sprožal tudi produkcijo interferona alfa (Lee, 2015; Song in sod., 2015).

Protein ovojnice (E) ima ključno vlogo pri sestavljanju virusne ovojnice in sestavi novih virionov ter pri sprožanju stresnega odziva celice gostitelja. Pri izstopu virionov iz celice vpliva na delovanje ionskih kanalčkov. Pri atenuiranih sevih virusa PED in sevu DR13 so poročali o deleciji v genu, ki kodira protein E, vendar posledice omenjene spremembe še niso popolnoma pojasnjene (Lee, 2015; Song in sod., 2015).

Protein nukleokapside (N) je fosfoprotein, ki v obliki vijačnice obdaja virusni genom. Sodeluje pri pomnoževanju PEDV in patogenezi PED, saj onemogoča delovanje interferona in s tem predstavlja del strategije izogibanja imunskemu sistemu gostitelja. Uporaben je pri diagnostiki okužb z virusom PED (Lee, 2015; Song in sod., 2015).

Gen ORF3 naj bi kodiral protein za tvorbo ionskega kanalčka, kar naj bi vplivalo na pomnoževanje in virulenco virusa PED (Lee, 2015).

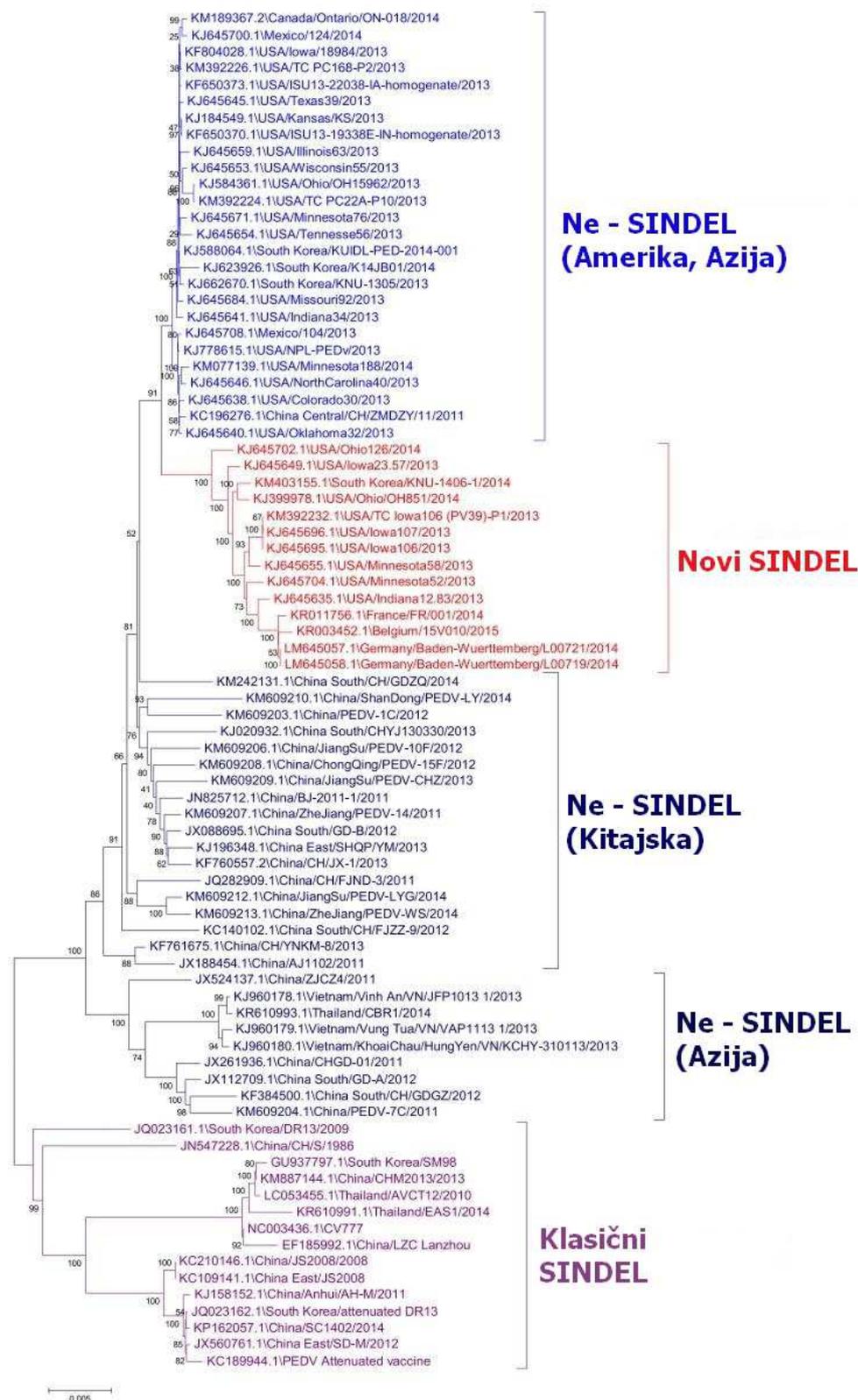
2.5 EPIZOOTIOLOGIJA VIRUSOV PED

Ob prvem pojavu PED v Evropi, leta 1971, so ugotavljali značilno močno vodeno diarejo, vendar so bili, v primerjavi s TGE, sesni pujski bistveno manj prizadeti, smrtnost je bila nižja.

Bolezen so najprej poimenovali epidemična virusna diareja (EVD). Ko je pet let kasneje prišlo do ponovnih izbruhov, se je bolezen kazala s hujšimi kliničnimi znaki, prizadete so bile vse kategorije prašičev, vključno s sesnimi pujski. Da bi ločili med obema oblikama bolezni so EVD razdelili na dva podtipa. EVD tipa 1 je predstavljal prvo klinično obliko iz leta 1971, EVD tipa 2 pa novo obliko. Kasneje je bila bolezen enotno preimenovana v prašičjo epidemično diarejo. Prvi sev CV777, kateremu so določili celoten genom, spada med klasične seve virusa PED. V Evropi so se do nedavnega pojavljali manj patogeni sevi z blažjo klinično obliko, medtem ko je v Aziji virus PED od svojega prvega pojava povzročal precejšnje ekonomske škode zaradi hujše oblike bolezni, ki se je kazala z visoko smrtnostjo sesnih pujskov. Sev, ki se je v letu 2013 pojavil v ZDA, se je izjemno hitro razširil v Severni Ameriki in pridobil značilnosti epidemije. Zanj je bila značilna skoraj 100 % smrtnost sesnih pujskov. Raziskave so pokazale veliko podobnost s kitajskim sevom iz leta 2011-2012, China/2012/AH2012. V januarju 2014 so v ZDA poročali o številnih primerih, pri katerih so bili klinični znaki značilni za PED, a brez visoke smrtnosti pri sesnih pujskih. Po osamitvi virusa in sekvenciranju celotnega genoma so potrdili, da gre za okužbo z virusom PED. Osamljen sev OH815 je bil v 99% nukleotidnega zaporedja podoben prvotnim ameriškim sevom, večja razlika pa se je pokazala v prvih 1170 nukleotidih v genu za protein receptorja (S). Osamljen sev OH815 je bil najbližje kitajskemu sevu CH/HBQX/10. Številne izbruhe so zabeležili z novo, manj patogeno varianto PED, kasneje so to skupino sevov poimenovali S INDEL skupina. Danes v ZDA krožijo visoko virulentni sevi virusa PED in redkeje dokazani S INDEL sevi. V epidemični obliki se je PED po letu 2013 pojavil tudi v Južni Koreji, Tajvanu in na Japonskem. Sevi, ki so se pojavili na Japonskem, so bili sorodni sevom iz ZDA in Kitajske (Lee, 2015; Wang in sod., 2014). Od leta 2014 dalje poročajo o izbruhih PED tudi v evropskih državah kot so Nemčija, Francija, Belgija in druge. Analiza genomov potrjuje, da spadajo osamljeni sevi v skupino S INDEL sevov (Slika 4 in Slika 5) (Stadler in sod., 2015; Grasland in sod., 2015; Theuns in sod., 2015).

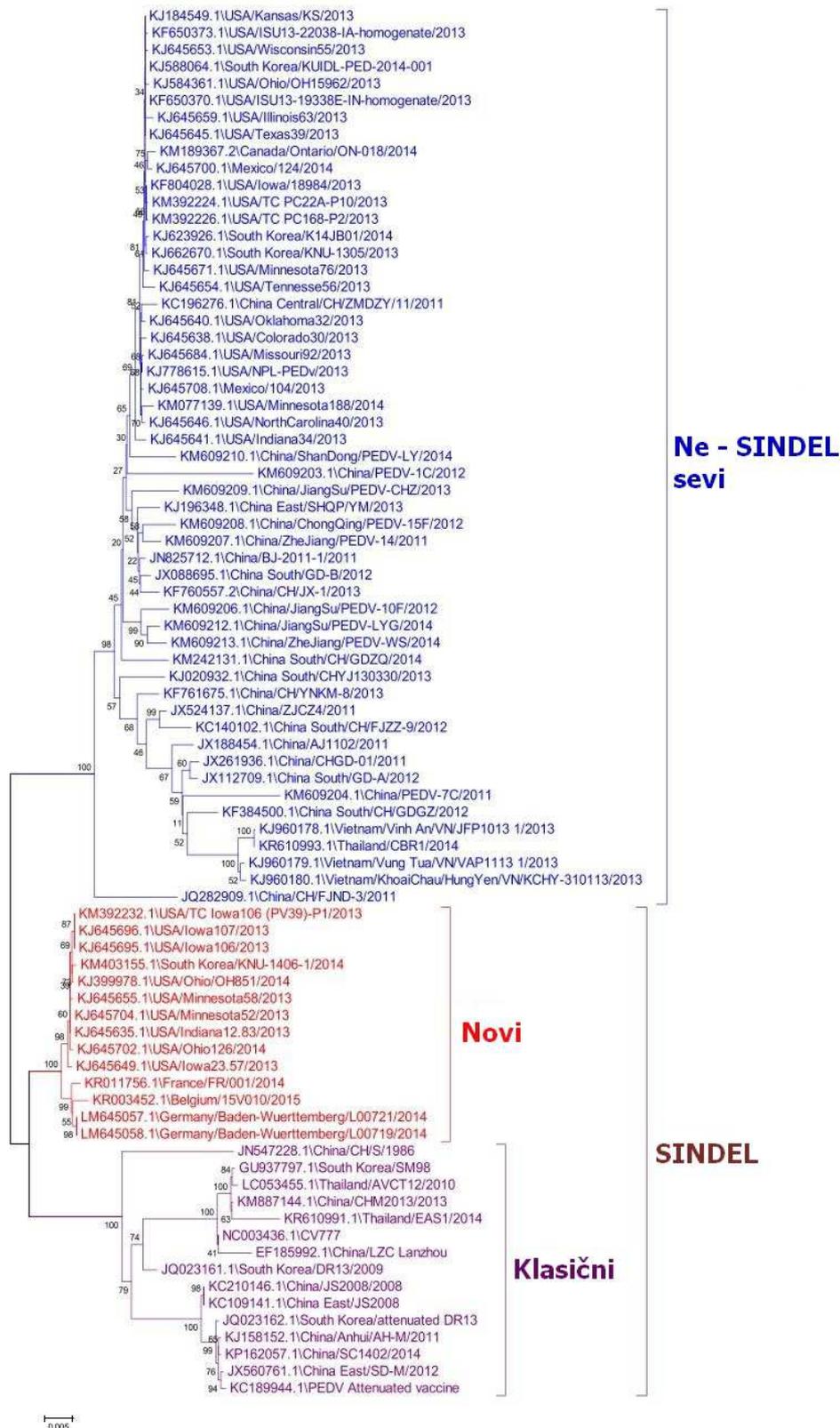
Kljub temu, da poznamo samo en serotip virusa PED, pa filogenetske primerjave kažejo na to, da lahko seve razdelimo v dve skupini. V skupino G1 uvrščamo klasične seve, v skupino G2 pa novejšje seve, ki povzročajo izbruhe, kateri dosežejo epidemične ali pandemične razsežnosti. Vsako izmed skupin lahko nadalje razdelimo na dve podskupini: 1a in 1b ter 2a in 2b. V G1a uvrščamo sev CV777, vakcinalne in druge seve, prilagojene na celične kulture. V G1b pa uvrščamo novejšje seve, o katerih so poročali v ZDA, Južni Koreji, na Kitajskem in

nedavno v Evropi. Skupino G2a predstavljajo sevi, ki so povzročali epidemične izbruhe v Aziji, G2b pa tisti, ki so povzročali izbruhe v Aziji in Ameriki ter dosegli razsežnosti pandemije. Slednji naj bi bili rezultat točkovnih mutacij sevov iz skupine G1a. Delecije v genu za protein receptorja so skupna značilnost skupin G1b in G2, domneva pa se, da so sevi v skupini G1b nastali z rekombinacijo sevov iz skupin G1a in G2, ki se je najverjetneje zgodila na področju Kitajske. Termin S INDEL sevi se uporablja tako za seve iz podskupine G1b kot za seve iz skupine G2 (Lee, 2015).



Slika 4: Filogenetska primerjava celotnih genomov virusov PED (povzeto po Carvajal in sod., 2015).

Figure 4: Phylogenetic comparison of the complete genomes of PED viruses (adopted from Carvajal et al., 2015).



Slika 5: Filogenetska primerjava gena za protein receptorja virusov PED (povzeto po Carvajal in sod., 2015).

Figure 5: Phylogenetic comparison of the spike protein gene of the PED viruses (adopted from Carvajal in sod., 2015).

Najpogostejši način prenosa virusa PED je fekalno-oralna pot. Prenos lahko poteka z direktnim kontaktom ali indirektno, preko kontaminirane krme, opreme ali transportnih sredstev, možen je tudi aerogeni prenos. Predvideva se, da se virus lahko prenese tudi s prašičjim mlekom, kar omogoča prenos virusa na potomce. Na farmo se virus PED najpogosteje vnese preko kontaminiranega blata ali izbruhanih izločkov, s transportnimi sredstvi, ljudmi ali s klinično oziroma subklinično okuženimi novimi prašiči. Možen način vnosa je tudi stik z divjimi živalmi. V reji se virus lahko ohranja zaradi slabih higienskih razmer ali pa perzistira pri odstavljenih in pitancih, kjer povzroča blažje klinične znake obolenja in zelo nizko smrtnost. Prašiči z nezaznavno okužbo so lahko rezervoar virusa. V endemično okuženih rejah, v katerih iz različnih razlogov upade maternalna imunost pri sesnih pujskih, lahko prihaja do ponavljajočih izbruhov z visoko smrtnostjo sesnih pujskov (Li in sod., 2012; Jung in Saif, 2015; Lee, 2015).

2.6 PATOGENEZA, PATOMORFOLOGIJA IN KLINIČNI ZNAKI

2.6.1 Patogeneza

Klinični znaki se navadno pokažejo 1-8 dni po okužbi, odvisno od doze virusa, kategorije prašičev ter seva virusa (Jung in Saif, 2015). Pri sesnih pujskih je obolevnost 100 %, smrtnost se giblje med 80 in 100%, pri odstavljenih in pitancih pa pade na 1-3%. Pri odraslih živalih smrtnosti običajno ni. Klasični sevi virusa PED povzročajo hujšo klinično sliko, medtem ko je smrtnost pri sesnih pujskih okuženih z S INDEL sevi nižja (Carvajal in sod., 2015).

Celični receptor za virus PED je transmembranski protein aminopeptidaza N. V velikih količinah jo izražajo vili enterocitov prašičjega tankega črevesa, zato pride na tem mestu do vstopa virusa in pomnoževanja. (Li in sod., 2007). Posledica okužbe črevesnih celic z virusom je akutna nekroza, kar hitro privede do atrofije vilov v tankem črevesu, zmanjša pa se tudi količina proizvedenega mucina. Obramba tankega črevesja pred mikroorganizmi je hudo prizadeta. V dobi inkubacije je lahko že 30-50% enterocitov tankega črevesa pozitivnih na prisotnost antigena virusa PED, 24-60 ur po pojavu kliničnih znakov je pogosto prizadet večji delež absorpcijskega epitelija. Tudi po 72 urah je še vedno opaziti velik delež prizadetih enterocitov, kar nakazuje na to, da se okužijo tudi regenerirajoče celice (Jung in Saif, 2015). Ni še pojasnjeno, kje vse prihaja do pomnoževanja virusa v celicah drugih organov, dokazno

pa je bilo pomnoževanje virusa v pljučnih makrofagih v *in vitro* in *in vivo* pogojih (Park in Shin, 2014).

Patogeneza okužbe z virusom PED je pri starejših prašičih slabše raziskana, vendar je bila prisotnost virusa v epitelijskih celicah vilov tankega in debelega črevesa potrjena tako po eksperimentalni kot po naravni okužbi. V redkih primerih se pri plemenskih prašičih in pitancih pojavi nenadna smrt z akutno nekrozo hrbtne mišice, vendar točna povezava z virusom PED še ni poznana (Straw in sod., 2006).

Razlog, zakaj virus PED povzroča tako hude klinične znake pri sesnih pujskih in blago obliko bolezni pri starejših živalih, še ni popolnoma pojasnjen. Obstaja teorija, da igra pri tem veliko vlogo počasnejša regeneracija enterocitov pri neonatalnih pujskih kot pri odstavljenih in starejših živalih (Lee, 2015).

2.6.2 Patomorfologija

Patomorfološke spremembe so dokazali pri poskusno in pri naravno okuženih prašičih. Najbolj prizadeto je tanko črevo, ki je napolnjeno z rumeno tekočo vsebino (Straw in sod., 2006). Pri sesnih pujskih je značilen dilatiran želodec napolnjen s popolnoma neprebavljenim mlekom (Lee, 2015).

Dan po okužbi ali inokulaciji histološko opazimo močan difuzen atrofični enteritis, viden kot mikroskopske lezije na sluznici tankega črevesa, kar časovno sovpada s pojavom diareje. Prizadeti so predvsem vili enterocitov tankega črevesa, vidna je vakuolarizacija celic in luščenje črevesnega epitelijskega. Vili se v nadaljevanju hitro krajšajo, zmanjšana je tudi encimska aktivnost enterocitov. V enterocitih debelega črevesa ni bilo opaženih histopatoloških sprememb (Straw in sod., 2006; Lee, 2015).

2.6.3 Klinični znaki

Inkubacijska doba virusa PED traja 1-8 dni, odvisna je od načina okužbe, najpogosteje pa se klinični znaki pojavijo že drugi dan po okužbi (Lee, 2015). Okužba se kaže predvsem z močno vodeno diarejo, ki je najznačilnejši in pogosto edini opazen klinični znak. Klinična slika je lahko zelo podobna okužbi z virusom TGE, obolevnost je do 100%. Bolezen se

znotraj črede širi zelo hitro in v roku enega tedna vse živali v čredi kažejo klinične znake. V starosti do enega tedna večina pujskov pogine po treh do štirih dneh diareje, vzrok smrti je predvsem dehidracija. Smrtnost je pri sesnih pujskih visoka, največkrat okoli 50 %, vendar lahko pri pujskih v prvem tednu starosti doseže tudi 100 %, kar prizadane sestavo črede in je glavni vzrok za tako velike ekonomske izgube. Pri prašičih, starejših od enega tedna, klinični znaki običajno nehajo po enem tednu (Straw in sod., 2006). Znotraj črede bolezen vztraja 3-4 tedne, lahko pa tudi več mesecev (Toplak in sod., 2016). Prašiči začnejo izločati virus z blatom po 48 urah, izločanje pa lahko traja do 4 tedne (Lee, 2015).

Poleg vodene diareje pri prašičih opazimo tudi anoreksijo in apatijo, prisotni so lahko tudi znaki abdominalne bolečine, predvsem pri pitancih. Do 3 % pitancev s takšnimi kliničnimi znaki lahko naenkrat pogine, običajno še pred pojavom diareje. Pri patomorfološkem pregledu trupel je navadno odkrita nekroza hrbtnih mišic. Najvišjo stopnjo smrtnosti beležimo pri sesnih pujskih pri pitancih pa lahko večjo smrtnost pričakujemo na farmah, kjer vzrejajo na stres občutljivejše pasme (Straw in sod., 2006). Pri pitancih se pojavlja tudi slabši prirast, pri svinjah pa predvsem apatija in anoreksija. Če pride pri svinjah do izgube legla zaradi okužbe, so posledica pogoste težave z reproduktivnimi organi, kot so agalaksija in zapoznel estrus (Lee, 2015).

V zadnjih letih so vse bolj opazne razlike v klinični sliki pri različnih izbruhih virusa PED, katere se predpisuje predvsem različnim sevom virusa PED, ki krožijo po svetu. V začetku leta 2014 so v ZDA pri prašičih z diarejo odkrili tudi prisotnost deltakoronavirusov, ki so sorodni azijskim sevom. V Aziji niso poročali o kliničnih oblikah diareje povzročene s strani prašičjih deltakoronavirusov (Wang in sod., 2014). Po letu 2010 so se visoko virulentni sevi virusa PED pojavljali v ZDA in v Aziji. V ZDA naj bi krožila predvsem dva tipa PED; visoko virulentni sev, ki je podoben Azijskim sevom ter S INDEL varianta, kateri predpisujejo blažje klinične znake in nižjo smrtnost. Tudi sevi, ki so povzročili izbruhe v Evropi po letu 2014 (v Nemčiji, Franciji in Belgiji), spadajo med S INDEL seve. Pojavljali so se običajno na farmah pitancev, kjer so povzročili manjši dvig smrtnosti (Carvajal in sod., 2015).

Na klinično sliko naj bi, poleg različne virulence PEDV sevov, vplivali še mnogi drugi parametri, kot so organizacija reje, imunski status posamezne živali in celotne črede ter

higienske razmere. K poslabšanju kliničnih znakov prispevajo tudi sočasne okužbe z drugimi virusi (Carvajal in sod., 2015).

2.7 PRVI DOKAZ VIRUSA PED V SLOVENIJI

V Sloveniji so veterinarji postavili sum PED v decembru 2014. V dveh rejah prašičev pitancev je prišlo do pojava kliničnih znakov, med katerimi je bila najočitnejša akutna vodena diareja. Virus PED so diagnosticirali leta 2015 s pomočjo PCR v realnem času (Toplak in sod., 2015).

2.8 DOKAZOVANJE VIRUSA PED

2.8.1 Dokazovanje virusa PED z metodo RT-PCR

PCR je danes pogosto uporabljena, specifična diagnostična metoda, ki je bila prvič opisana že leta 1986 (Mullis in sod., 1986). RT-PCR (angl. reverse transcription and polymerase chain reaction) je modificirana oblika PCR pri kateri se najprej izvede reverzno transkripcijo z encimom reverzna transkriptaza, ki pretvori RNA v komplementarno DNA (cDNA) (Rahman in sod., 2013).

2.8.2 Dokazovanje virusa PED z metodo RT-qPCR

PCR v realnem času (qPCR: angl. real-time PCR) je metoda, ki so jo leta 1986 prvič opisali Heid in sodelavci ter omogoča kvantifikacijo tarče v vzorcu. Zaradi RNA zgradbe virusnega genoma se pri dokazovanju virusa PED uporablja qPCR z reverzno transkriptazo. (Heid in sod., 1986; Espy in sod., 2006; Rahman in sod., 2013).

Heid in sodelavci (1986) so prvi opisali metodo, pri kateri je merjenje količine produkta PCR potekalo po principu fluorescenčne TaqMan metodologije. Gre za to, da se za izvedbo PCR uporablja TaqMan hibridizacijsko sondo, ki je označena z dvema fluorescenčnima barviloma (npr. fluorokrom FAM in dušilec TAMRA). Ko je hibridizacijska sonda intaktna, barvilo TAMRA absorbira fluorescenco, ki jo oddaja FAM. Med podaljševanjem verige z DNA polimerazo pa se sonda cepi, TAMRA fluorescenčnega sevanja ne absorbira več, kar povzroči, da fluorescenca ni več dušena. Sevanje FAM s časom in številom ciklov narašča

sorazmerno s količino nastajajočega produkta v vzorcu (Heid in sod., 1986). Danes poznamo večje število različnih vrst sond in barvil, ki se uporabljajo pri qPCR (VanGuilder in sod., 2008).

2.8.3 Sekvenciranje po Sangerju

Watson in Crick sta leta 1953 objavila članek, v katerem sta kot strukturo DNA molekule predlagala model dvojne vijačnice, sestavljene iz štirih nukleotidov: adenzina, citidina, timidina in gvanozina (Watson in Crick, 1953). To odkritje je v veliki meri prispevalo k razvoju molekularne biologije in genetike, kot ju poznamo danes. V sedemdesetih letih sta Wally Gilbert in Friderik Sanger istočasno razvila različni tehniki za določanje nukleotidnega zaporedja v DNA molekuli. Kot bolj uporabna se je izkazala Sangerjeva metoda, ki je bila prvič opisana leta 1977 in deluje po principu kemijsko spremenjenih nukleotidov za zaustavljanje sinteze novih verig. Številna odkritja s področja sekvenciranja so kasneje omogočila izvedbo projekta Človeški genom (HUGO, angl. Human Genome). Rezultat projekta pa ni bil le določitev zaporedja genoma in boljše poznavanje genov, temveč tudi razvoj številnih novih metod in tehnologij. Avtomatiziran postopek sekvenciranja je ena od omenjenih metod, ki so bistveno prispevale k napredku sekvenciranja in so danes nepogrešljive v mikrobioloških laboratorijih po vsem svetu (Sanger in sod., 1977, Watson in Berry, 2003).

Metoda sekvenciranja po Sangerju je bila v praksi precej zamudna in je zahtevala veliko dela. Ker so bili modificirani nukleotidi najprej označeni z enakim radioaktivnim izotopom, je bilo potrebno reakcijo izvajati v štirih ločenih epruvetah in v posebej določenih prostorih zaradi uporabe radioaktivnih elementov. Zato so leta 1987 Prober in sodelavci predstavili novo metodo označevanja dideoksinukleotidov s pomočjo štirih različnih fluorescenčnih barvil, kar je omogočilo izvajanje sekvenciranja v eni sami reakcijski epruvetki in s tem občutno skrajšalo postopek in pocenilo preiskavo (Prober in sod., 1987). Izboljšavo postopka sekvenciranja je predstavljala tudi uporaba kapilarne elektroforeze, ki je bila prvič opisana v poznih osemdesetih letih, celoten postopek pa je mogoče tudi avtomatizirati (Dovichin in Zhang, 2000).

2.8.4 Sekvenciranje naslednje generacije

Doba sekvenciranja naslednje generacije (angl. next generation sequencing, NGS) se je začela v letu 2005, ko je podjetje 454 Life Sciences razvilo in poslalo na tržišče prvi komercialno dostopen sekvenator GS 20. Danes je na voljo več različnih platform za NGS, ki so s svojim prihodom korenito spremenile raziskave in klinično diagnostiko na področju genomike (Voelkerding in sod., 2009).

Priprava vzorcev za NGS poteka pri vseh platformah po podobnem postopku. Po osamitvi nukleinskih kislin je najprej potrebna priprava knjižnice za sekvenciranje. S procesom fragmentacije se genomsko DNA/RNA razreže na krajše fragmente, na katere se s pomočjo encima DNA ligaze kovalentno veže adapterje. Če je genetski material v obliki RNA je pred vezavo adapterjev potrebna reverzna transkripcija, ki RNA molekule prepíše v cDNA fragmente. Sekvence adapterjev so specifične za posamezno platformo in omogočajo pomnoževanje fragmentov z encimom DNA polimerazo. Način pomnoževanja knjižnice se med posameznimi platformami razlikuje, namen pa je pomnožiti nukleinske kisline na dovolj veliko število kopij posameznega fragmenta, da postane signal podaljševanja verige pri sekvenciranju merljiv (Mardis, 2013).

Skupna lastnost tehnologij NGS je vzporedno sekvenciranje klonsko pomnoženih ali samostojnih DNA molekul, ki so prostorsko ločene. Sekvenciranje poteka v velikem številu zaporednih ciklov, med katerimi prihaja do sinteze prilegajoče se nukleotidne verige. Ker vzporedno poteka veliko število reakcij, se ustvari v posameznem ciklu več sto megabajtov (Mb) do gigabajtov (Gb) podatkov, ki nosijo informacijo o nukleotidnih zaporedjih (Voelkerding in sod., 2009). Vezavo posameznega od štirih nukleotidov večina metod zaznava z merjenjem iluminiscence ali fluorescence, izjema pa je tehnologija Ion Torrent, ki meri spremembe pH. Ta tehnologija je cenejša in preprostejša, saj platforme za merjenje ne potrebujejo optičnih elementov (Liu in sod., 2012).

2.8.4.1 Roche/454 Life Sciences

Prvi sistem za NGS, ki je bil komercialno uspešen, je bil sistem 454 podjetja 454 Life Sciences. Njihova aparatura GS 20, je bila tržišču predstavljena leta 2005. Temelji na tehnologiji pirosekvenciranja (Voelkerding in sod., 2009). Izvor pirosekvenciranja sega v leto

1993, ko so Nyren in sodelavci opisali metodo sekvenciranja, ki temelji na zaznavanju svetlobnega sevanja pirofosfatov, ki se sproščajo ob vgradnji gradnikov dNTP v nukleotidno verigo (Nyren in sod., 1993).

V začetku je bil tak postopek sposoben odčitavanja zaporedja od 100 do 150 nukleotidov, v enem ciklu je bilo lahko obdelanih 2 Mb informacij. Leta 2007 je bilo podjetje 454 Life Sciences prevzeto s strani Roche Applied Science. Leto kasneje je bila tržišču predstavljena izboljšana, nova verzija 454 sistema (Liu in sod., 2012).

Prednosti 454 sistema so velika hitrost dela (10 ur za dokončanje postopka sekvenciranja) ter dolžina posameznih sekvenc, ki jih je sposoben pravilno prebrati (nekaj sto nukleotidov). To olajša tudi »*de novo*« sekvenciranje celotnih genomov. Možno je avtomatizirati velik delež priprave knjižnice, kar zmanjša potrebno število izvajalcev v postopku. Težave pri tem sistemu predstavlja predvsem visoka cena postopka, hkrati pa se število napak v zaporedju povečuje, ko gre za določanje zaporedja enakih nukleotidov, ki je daljše od 6 bp (Liu in sod., 2012). Daljši kot so homopolimeri, večja je verjetnost za nastanek napake. To je tudi vzrok, da je največ napak pri sestavi nukleotinega zaporedja v obliki insercij-delecij, ne pa substitucij (Shendure in Ji, 2008). Po letu 2012 je 454 sekvenciranje manj v uporabi in so ga nadomestile druge tehnologije.

2.8.4.2 SOLiD

SOLiD (Sequencing by Oligo Ligation Detection) tehnologija je bila prvič predstavljena leta 2007 in je temeljila na dvo-baznemu spajanju z ligacijskim sekvenciranjem (Liu in sod., 2012). Tudi SOLiD je po letu 2012 manj v uporabi in so ga nadomestile druge tehnologije.

2.8.4.3 Illumina

Solexa je bila ustanovljena leta 1998. Po neuspešnem razvoju ideje za sekvenciranje posamezne DNA molekule, pritrjene na mikrosfero, so se preusmerili k sekvenciranju s klonsko pomnoženimi matričnimi DNA molekulami. Platforma Solexa Genome Analyzer (GA) je prišla na tržišče leta 2006. Istega leta je to tehnologijo odkupila Illumina (Voelkerding in sod., 2009). GA deluje po principu tehnologije sekvenciranja s sintezo (angl.: sequencing by synthesis, SBS). Knjižnico za sekvenciranje predstavljajo nekaj sto baznih parov dolgi odseki preiskovane nukleinske kisline s pritrjenimi adapterji. Po denaturaciji

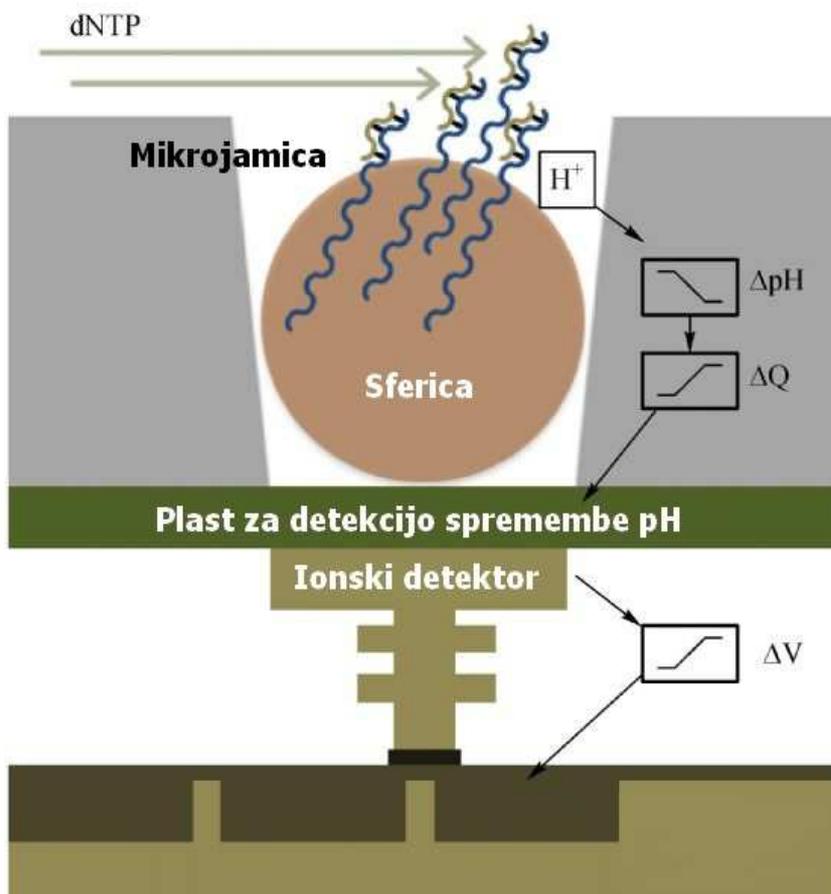
DNA molekul so enojne verige v pretočni celici pomnožene s tehnologijo »angl. bridge amplification«. Tvorijo se skupine klonskih odsekov DNA katere se pred samim sekvenciranjem obdelata s pomočjo linearizacijskega encima, ki dvojnovijačne nukleinske kisline pretvori v enojnovijačne molekule (Liu in sod., 2012). Sekvenciranje poteka v ciklih, pri čemer se v vsakem ciklu doda ena sama baza. To je doseženo z uporabo modificiranih, fluorescenčno označenih nukleotidov, ki reverzibilno zaustavijo podaljševanje verige (Shendure et Ji, 2008).

Največja težava, ki se pojavlja pri tej tehnologiji, so omejene dolžine odčitanih sekvenc, ki so posledica različnih faktorjev, med katere spada predvsem nepravilno delovanje modificiranih nukleotidov. Glavni tip napak, ki se pojavljajo pri določanju sekvenc se kaže v obliki substitucij, medtem ko so insercije in delecije redke. Težave, ki jih homopolimeri predstavljajo pri drugih tehnologijah, kot je na primer sistem 454, se tu ne kažejo v takšni meri. Vzrok za to je podaljševanje verige za eno samo bazo in odčitavanje rezultatov po vsakem posameznem ciklu (Shendure in Ji, 2008).

2.8.4.4 Ion Torrent

Tehnologija Ion Torrent uporablja polprevodnik, preko katerega sprememba pH omogoča direktno pretvorbo kemičnih informacij dodanih nukleotidov (A, C, T, G) v digitalne informacije (1, 0). Do spremembe pH prihaja zaradi sprostitve vodikovega iona (H^+) ob vgradnji nukleotida v nastajajočo verigo. Trenutno so na voljo za sekvenciranje z Ion Torrent tehnologijo štiri platforme. Ion Proton™ System je prvi visoko zmogljiv sekvenator, ki je sposoben v le nekaj urah sekvencirati velike genome, kot je na primer človeški genom. Ion Proton™ sistem se uporablja s čipom Ion PI™ Chip v3. Ion S5™ in Ion S5™ XL sta namenjen hitremu tarčnemu sekvenciranju, pri čemer se ju lahko uporablja s tremi različnimi čipi: Ion 520™ Chip, Ion 530™ Chip in Ion 540™ Chip. Ion Personal Genome Machine® (PGM™) System je prišel na tržišče leta 2010. Zaradi svoje majhnosti, sorazmerno ugodne cene in hitrega delovanja je primeren za manjše laboratorije ter za klinične vzorce. Čipi za uporabo z Ion PGM™ so Ion 314™ Chip v2 (zmogljivost 10 Mb), Ion 316™ Chip v2 (zmogljivost 100 Mb) in Ion 318™ Chip v2 (zmogljivost 1000 Mb), ki se med seboj razlikujejo po zmogljivosti (Liu in sod., 2012;

<http://www.thermofisher.com/search/results?query=ion+pgm+chips&persona=Catalog&navId=10974>).

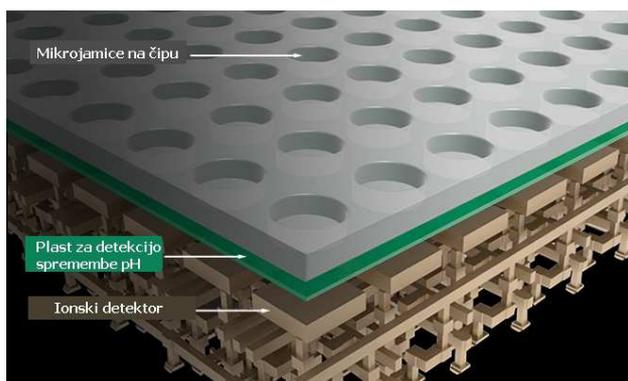


Slika 6: Shematski prikaz reakcijske mikrojamice pri Ion Torrent sekvenciranju (povzeto po Merriman in Rothberg, 2012).

Figure 6: Schematic presentation of reaction microwell in Ion Torrent sequencing (adopted from Merriman in Rothberg, 2012).

Priprava knjižnice za sekvenciranje z Ion PGM se začne s fragmentacijo DNA, encimskim popravljanjem koncev in vezavo adapterjev. Pomnoževanje knjižnice poteka z emulzijskim PCR, pri čemer so DNA molekule vezane na mikrosfere s pomočjo sekvence, komplementarne adapterjem. Sledi obogatitev, pri čemer se odstrani sfere z nezadostno pomnoženo DNA, na polnih sferah pa se izvede prileganje oligonukleotidnih začetnikov. Sfere se nato nanese v jamice na ustreznem Ion čipu (Slika 7), na katerem poteče sekvenciranje (Mardis, 2013) Pretočni čip se izmenjujoče preplavlja s posameznim nukleotidom, detektor pa zazna, ali je v določenem ciklu prišlo do vezave nukleotida ali ne.

Če je dodan nukleotid, s katerim je čip preplavljen komplementaren sledečemu nukleotidu na matrici DNA, pride do spremembe pH, ki jo sekvenator zazna. Če je prišlo do zaporedne vezave dveh ali več homolognih baz, pa je sprememba pH višja (Liu in sod., 2012). Ker je odčitavanje neposredno in sekvenator deluje kot majhen pH meter, je za vsako zaznavo potrebnih le nekaj sekund (Thermo Fischer, 2016b).



Slika 7: Prikaz reakcijskih mikrojamic na Ion 314TM čipu (povzeto po Merriman in Rothberg, 2012).

Figure 7: Display of reaction microwells on Ion 314TM Chip (adopted from Merriman and Rothberg, 2012).

Velika prednost Ion Torrent sekvenciranja je, da za odčitavanje ne potrebuje detektorja za zaznavanje fluorescence, kar se odraža v večji hitrosti, manjši velikosti platforme ter nižji ceni reagentov (Liu in sod., 2012). Povprečna dolžina prebranega zaporedja je med 100 in 400 nukleotidi, z večanjem števila jamic na čipu pa je bila dosežena večja količina pridobljenih podatkov, ki je narasla iz začetnih 10 Mb na 1 Gb. Največ napak pri določanju sekvence se pojavlja v obliki insercij in delecij, predvsem na mestih daljših homopolimerov. Substitucije so pri tej tehnologiji redka napaka (Mardis, 2013).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorčenje blata prašičev na PED pozitivni farmi

Od januarja do septembra 2015 smo opravili skupno 11 vzorčenj blata prašičev na isti farmi, kjer smo 6. januarja 2015 prvič dokazali prisotnost virusa PED v Sloveniji. Posamezno vzorčenje blata smo opravili naključno iz petih različnih delov posameznega boksa. Bokse smo tudi izbirali naključno, namensko pa smo vzorčili bokse v katerih smo pri prašičih pitancih opazili znake akutne diareje. Skupno smo odvzeli 41 vzorcev blata prašičev. Posamezni vzorec smo odvzeli v količini približno 50 ml. Pri vzorčenju smo uporabljali sterilne rokavice, plastične žličke in lončke. Po odvzemu smo vzorce shranili na + 4 °C in jih nemudoma transportirali v laboratorij, kjer smo jih do nadaljevanja preiskav shranili v zamrzovalniku pri temperaturi nižji od - 60 °C.

3.2 METODE

3.2.1 Delo v Laboratoriju za molekularno virologijo

Delo smo izvajali v Laboratoriju za molekularno virologijo na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete. V sklop laboratorijev s podtlakom smo vstopali po protokolu za laboratorij varnostne stopnje BSL3, da smo preprečili in zmanjšali možnost za iznos virusov iz laboratorijskih prostorov.

Pri izvajanju vseh postopkov smo bili oblečeni v dodatni zaščitni plašč, uporabljali smo zaščitne rokavice in jih po potrebi večkrat zamenjali, z vzorci smo rokovali v brezprašnih komorah (zaščitnih laminarjih) in pri tem uporabljali sterilne materiale, proste DN-az/RN-az. Delovne površine smo med delom večkrat očistili in razkužili. Postopke pipetiranja smo izvajali s kalibriranimi pipetami in vedno uporabljali nastavke za pipete s filtri. Pri pripravi vzorcev in pipetiranju smo upoštevali osnovne postopke za preprečevanje kontaminacije med vzorci.

3.2.2 Priprava suspenzije vzorca iz blata

Posamezni vzorec blata smo odmrznili enourno inkubacijo na sobni temperaturi. Za pripravo suspenzije iz vzorcev smo s sterilno žličko za enkratno uporabo odvzeli približno 1 g vzorca blata in mu v 15 ml epruveti dodali 9 ml RPMI 1640 gojišča (Gibco, Velika Britanija). Vsebino epruвет smo dobro premešali z 10 sekundnim mešanjem na vrtničnem mešalniku, pustili 10 min na sobni temperaturi in še enkrat premešali. Suspenzije smo centrifugirali 10 minut pri 2.500 obratih na minuto. Po centrifugiranju smo 2 ml pripravljene suspenzije vzorcev shranili v sterilne vialke in nadaljevali z osamitvijo nukleinskih kislin.

3.2.3 Osamitev nukleinskih kislin RNA s komercialnim kompletom QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit

Osamitev virusne RNA smo po navodilih proizvajalca izvedli s komercialnim kompletom QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Nemčija), ki je namenjen hitri in standardizirani osamitvi virusne RNA iz vzorcev plazme, seruma, brezceličnih telesnih tekočin in supernatantov celičnih kultur. Po koncu postopka je dobljena virusna RNA prosta proteinov, inhibitorjev, nukleaz in ostalih nečistoč. V vsako osamitev smo zraven vzorcev vključili še najmanj eno pozitivno in eno negativno kontrolo.

3.2.4 Dokaz prisotnosti nukleinskih kislin virusa PED v vzorcih z metodo RT-qPCR

Po osamitvi nukleinskih kislin iz vzorcev blata smo specifično dokazovanje prisotnosti nukleinskih kislin virusa PED izvedli s komercialnim kitom RT-qPCR v realnem času (virotype[®] PEDV/TGEV RT-PCR Rgt, Qiagen, Nemčija), ki je namenjen sočasnemu dokazovanju prisotnosti virusov PED in TGE, v reakcijsko mešanico pa je vključena tudi interna pozitivna kontrola. Postopek smo izvajali po navodilih proizvajalca. Pri izvedbi postopka smo uporabljali materiale proste DN-az/RN-az. Ker reverzna transkripcija in PCR potekata v isti reakcijski epruvetki, je bila možnost kontaminacije zmanjšana. Uporabili smo oligonukleotidne sonde, ki so bile označene s fluorescenčnimi barvili FAM za PEDV, Quasar 670/Cy5 za TGEV in HEX za interno kontrolo.

Rezultate smo dobili v obliki vrednosti Ct (angl. cycle treshold), ki predstavljajo zaporedno številko cikla v katerem je jakost fluorescence izbranega barvila preseгла nastavljen prag zaznave (angl. treshold). Nižje vrednosti Ct pomenijo višje število kopij virusne RNA v preiskovanem vzorcu.

3.2.5 Ponovna osamitev nukleinskih kislin virusa PED iz pozitivnih vzorcev za potrebe sekvenciranja celotnega genoma

Iz šestih predhodno potrjenih močno pozitivnih vzorcev z metodo RT-qPCR za dokaz virusa PED smo za potrebe NGS ponovno izvedli osamitev nukleinskih kislin iz originalnih vzorcev z namenom, da bi potrdili ustreznost čistosti izbranih vzorcev in količino prisotne virusne nukleinske kisline za nadaljnjo uporabo v postopku sekvenciranja celotnega genoma.

Osamitev smo izvedli zaporedno, z dvema komercialnima kompletoma po navodilih proizvajalca. Uporabili smo QIAamp[®] Viral RNA Mini kit (Qiagen, Nemčija) in TRIzol[®] Reagent (Life Technologies, ZDA). Osamitev virusne RNA smo najprej izvedli s QIAamp[®] Viral RNA Mini kit (Qiagen, Nemčija) pri vseh šestih vzorcih, temu pa je sledila še osamitev s TRIzol[®] Reagent (Life Technologies, ZDA). Po zaključeni osamitvi smo dobljene končne vzorce preverili z metodo RT-qPCR (virotype[®] PEDV/TGEV RT-PCR Rgt, Qiagen).

3.2.5.1 Ponovna priprava suspenzije iz vzorcev blata

Postopek priprave posameznega vzorca smo izvedli, kot je bilo opisano pod točko 3.2.2. Po centrifugiranju smo suspenzijo vzorcev še dodatno filtrirali skozi sterilni filter s porami velikosti 0,45 µm (Sartorius, Nemčija).

3.2.5.2 Osamitev virusne nukleinske kisline s komercialnim kompletom QIAamp[®] Viral RNA Mini kit (Qiagen, Nemčija)

Osamitev virusne RNA smo najprej izvedli s QIAamp[®] Viral RNA Mini kit (Qiagen, Nemčija). Za vsak vzorec smo osamitev RNA izvedli v dveh ponovitvah. Za razliko od navodil proizvajalca smo tokrat na koncu osamitve RNA eluirali v 100 µl in ne v 60 µl pufru AVE.

3.2.5.3 Osamitev virusne nukleinske kisline z reagentom TRIzol[®] (Life technologies, ZDA)

Obe ponovitvi posamezne osamljene RNA (100 µl + 100 µl), ki smo ju v prejšnjem koraku pridobili s kompletom QIAamp[®] Viral RNA Mini kit (Qiagen, Nemčija), smo združili v končni volumen 200 µl za posamezni vzorec. Postopek osamitve smo nato izvedli še s komercialnim reagentom TRIzol[®] (Life technologies, ZDA) po navodilih proizvajalca in si na tak način zagotovili bolj čiste vzorce virusne nukleinske kisline. Reagent TRIzol[®] je namenjen hitri osamitvi celotne, visoko kvalitetne RNA iz tkivnih in celičnih vzorcev. Primeren je za hkratno obdelavo večjega števila vzorcev.

3.2.5.4 Kvantifikacija virusne RNA z metodo RT-qPCR

Pred nadaljevanjem postopka smo za potrditev uspešnosti posamezne osamitve virusne RNA iz vzorcev izvedli dokazovanje nukleinskih kislin virusa PED s komercialnim kompletom RT-qPCR v realnem času (virotype[®] PEDV/TGEV RT-PCR Rgt, Qiagen, Nemčija), kot je bilo že opisano pod točko 3.2.4.

3.2.6 Priprava vzorcev za NGS

Priprava vzorcev in kvalitetne knjižnice je ključni postopek, sestavljen iz več korakov, ki v zelo veliki meri vplivajo na rezultate določanja nukleotidnih zaporedij s tehnologijami NGS, zato je pomembno, da so postopki izvedeni strokovno in natančno, ter da se skozi celoten potek dela skrbi, da ne pride do kontaminacije vzorcev.

3.2.6.1 Merjenje količine osamljene RNA v vzorcih

Pred začetkom priprave knjižnice za NGS smo količino osamljene RNA v vzorcih izmerili s Qubit[®] 3.0 fluorometrom (Invitrogen, Life Technologies, ZDA) in Qubit[®] assays komercialnim kompletom po navodilih proizvajalca. Qubit[®] 3.0 fluorometer je namizni fluorometer, namenjen hitremu in natančnemu merjenju količine DNA, RNA ali proteinov v vzorcih. Koncentracijo v vzorcu zazna preko fluorescenčnega barvila, ki oddaja sevanje ob vezavi na tarčno molekulo, kar zmanjša učinke morebitne kontaminacije. Za opravljanje meritev potrebujemo minimalno 1 µl vzorca, kar olajša potek dela z manjšimi količinami vzorcev.

3.2.6.2 Fragmentacija

Postopek priprave DNA knjižnice za sekvenciranje smo izvedli z Ion Total RNA-Seq Kit v2.0 (Life Technologies, ZDA) po navodilih proizvajalca. Določene postopke smo prilagodili glede na količino izmerjene RNA. Cilj postopka je iz osamljene virusne RNA pripraviti kvalitetno cDNA knjižnico za nadaljnje postopke pri izvedbi NGS. Uporabljen komplet je primeren za sekvenciranje do 200 nukleotidov dolgih fragmentov nukleinskih kislin in podpira uporabo črtnih kod oziroma barkod (angl. barcodes), ki s tem omogočajo določanje nukleotidnega zaporedja več različnih vzorcev na istem čipu. Uporabili smo Ion RNA-Seq Barcode 1-16 Kit (Life Technologies, ZDA).

Prvi korak v pripravi knjižnice je fragmentacija osamljene RNA. Pri tem postopku smo uporabili vodo prosto nukleaz in sledili navodilom proizvajalca. Fragmentirano RNA smo dali na led in takoj nadaljevali s čiščenjem po protokolu proizvajalca. Uporabili smo Magnetic Bead Cleanup Module.

3.2.6.3 Vezava adapterjev

Na očiščeno fragmentirano RNA smo adapterje vezali po navodilih proizvajalca. Uporabili smo Ion Adapter Mix v2, ki je komplet oligonukleotidov z enovijačno degenerirano sekvenco na enem koncu in definirano sekvenco, ki je potrebna za nadaljevanje postopka na Ion PGMTM sistemu na drugem koncu. Uporaba omenjenih oligonukleotidov usmeri orientacijo RNA molekul pri hibridizaciji tako, da so proizvedene tarčne molekule (matrice) primerne za sekvenciranje iz smeri 5' konca verige.

3.2.6.4 Reverzna transkripcija

Z reverzno transkripcijo smo želeli pridobiti enoverižne cDNA kopije fragmentiranih RNA molekul. Uporabili smo 10X RT Buffer pufer, 2,5 mM dNTP Mix in Ion RT Primer v2 (Life Technologies, ZDA). Dobljeno cDNA smo očistili po predpisanem protokolu proizvajalca.

3.2.6.5 Pomnoževanje cDNA in priprava knjižnice z barkodami

Za pripravo knjižnice z barkodami smo uporabili Ion Total RNA-Seq Kit v2 in Ion XpressTM RNA-Seq Barcode 01-16 Kit (Life Technologies, ZDA) in jo po končanem postpku očistili po

navodilih proizvajalca. Očiščeno namnoženo cDNA z vezanimi barkodami smo do nadaljnjee uporabe shranili v zamrzovalniku na - 20 °C.

3.2.6.6 Ocena uspešnosti priprave knjižnice

Uspešnost priprave in kvaliteto pridobljene knjižnice smo izmerili na aparaturi LabChip® GX (Caliper, Life Sciences, ZDA), ki je namenjena ločevanju nukleinskih kislin ali proteinov glede na njihovo velikost. Uporabili smo komercialni komplet HT DNA High Sensitivity LabChip® Kit po navodilih proizvajalca. Meritve smo opravili na podjetju Omega d.o.o.

Tehnologija, uporabljena pri LabChip® GX temelji na principu gelske elektroforeze. Analiza vzorcev poteka avtomatizirano, na čipih, kar bistveno skrajša čas, ki je potreben za ločevanje molekul različnih velikosti, hkrati pa omogoči neposredno pretvorbo dobljenih informacij v digitalno obliko in s tem olajša interpretacijo rezultatov.

3.2.6.7 Združevanje vzorcev, vezava matrične cDNA na Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles sferice, obogatitev in pomnoževanje vzorca s sistemom Ion OneTouch™2

Ion PGM™ Template OT2 200 komplet je namenjen pripravi vzorcev na Ion One Touch 2 sistemu (Life Technologies, ZDA), ki je vključen v postopek sekvenciranja z Ion Torrent tehnologijo . Sistem vsebuje inštrumenta Ion One Touch ES, ki je namenjen obogatitvi pozitivnih sferic, in Ion One Touch 2 inštrument (Slika 8), ki je namenjen pomnoževanju z emulzijskim PCR. Postopek obogatitve in pomnoževanja knjižnice na Ion Sphere™ partiklah (v nadaljevanju sferice) je avtomatiziran, kar omogoča lažjo in hitrejšo pripravo vzorcev za sekvenciranje. Na sferice se vežejo matrične nukleinske kisline pripravljene knjižnice, ki se na posamezni sferici pomnožijo.

V prvem koraku smo pripravili Ion OneTouch™ 2 aparaturo za uporabo po navodilih proizvajalca. Sledila je uporaba priprava raztopine za pomnoževanje z emulzijskem PCR. Uporabili smo Ion PGM™ Template OT2 200 Reagent Mix, Ion PGM™ Template OT2 200 PCR Reagent B, Ion PGM™ Template OT2 200 Enzyme Mix in Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles (ISP, v nadaljevanju sferice), po navodilih proizvajalca. Pripravljene barkodirane sferice smo ustrezno razredčili ter zmešali v skupen vzorec. Tega

smo nato dodali, v ustrezni količini, k mešanici za pomnoževanje z emulzijskem PCR. Takoj smo nadaljevali s polnjenjem reakcijskega filtra Ion PGM™ OneTouch Plus Reaction Filter Assembly. Z vzorcem napolnjen reakcijski filter smo namestili na Ion OneTouch™ 2 aparaturo in zagnali emulzijski PCR po navodilih proizvajalca.

Po končanem pomnoževanju z emulzijskem PCR smo sledili navodilom proizvajalca za pripravo vzorca, ki gre v obogatitev (angl. enrichment) pred sekvenciranjem. Koncentracijo pozitivnih sferic (angl. template positive ISPs) smo preverili s fluorometrom Qubit® 3.0 (Life Technologies, ZDA), ki ima program za testiranje kvalitete ISP (odstotek ISP na katere se je uspešno vezala matrična cDNA). Uporabili smo Ion Sphere™ Quality Control Kit, po navodilih proizvajalca. Delo smo nadaljevali z obogatitvijo pozitivnih ISP z vezano matrično cDNA na inštrumentu Ion OneTouch™ ES, po navodilih proizvajalca.



Slika 8: Ion OneTouch™ 2 inštrument (Veterinarska fakulteta).

Figure 8: Ion OneTouch™ 2 instrument (Veterinary faculty).

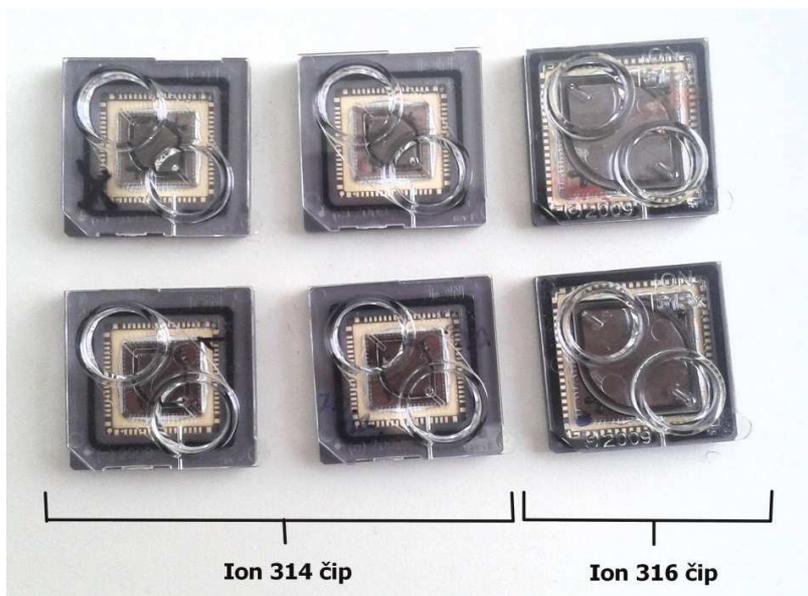
3.2.7 Sekvenciranje celotnega genoma virusa PED s tehnologijo Ion Torrent

Sekvenciranje celotnega genoma virusa PED smo opravili na aparaturi Ion PGM™ System aparaturi (Slika 9), s komercialnim kompletom Ion PGM™ HiQ™ Sequencing Kit (Life Technologies, ZDA). Za uporabo so na voljo trije čipi: Ion 314™ Chip v2, Ion 316™ Chip v2 in Ion 318™ Chip v2 (Slika 10). Pri našem delu smo uporabili najmanjši čip, Ion 314™ Chip v2.



Slika 9: Sekvenator Ion PGM™ System (Veterinarska fakulteta).

Figure 9: Ion PGM™ System sequencing platform (Veterinary faculty).



Slika 10: Ion 314™ Chip v2 ter Ion 316™ Chip v2 čipi (Veterinarska fakulteta).

Figure 10: Ion 314™ Chip v2 and Ion 316™ Chip v2 chips (Veterinary faculty).

3.2.7.1 Nastavitev nove izvedbe na Torrent Server in priprava Ion PGM™ aparature za uporabo

Na spletni strani smo preko Torrent strežnika dostopali do spletne strani Torrent Browser for Torrent Server, ki je povezana z našim sekvenatorjem v laboratoriju. Vnesli smo nastavitve za izvedbo sekvenciranja. Vnesli smo tudi izbrano referenčno zaporedje celotnega genoma seva L00721 (v GenBank dostopen pod številko LM645057) v FASTA formatu za primerjavo s pridobljenimi rezultati.

Pred uporabo sekvenatorja Ion PGM™ System smo aparaturo očistili in pripravili za uporabo po navodilih proizvajalca. Uporabili smo komplet Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit.

3.2.7.2 Polnjenje čipa Ion 314™ Chip v2 in zagon postopka sekvenciranja

Z vzorcem (barkodirana očiščena knjižnjica po emulzijskem PCR in obogatitvi pozitivnih sferic) smo po navodilih proizvajalca, po končani inicializaciji sekvenatorja, napolnili čip Ion 314™. K vzorcu smo dodali tudi kontrolne sferice Control Ion Sphere™ Particles (Control ISP) za preverjanje uspešnosti reakcije sekvenciranja. Napolnjen čip smo vstavili v sekvenator in zagnali postopek sekvenciranja po navodilih proizvajalca.

3.2.8 Analiza rezultatov sekvenciranja

Za analizo dobljenih rezultatov smo uporabili računalniški program Integrative Genomics Viewer (IGV) ter komercialni komplet računalniških programov DNASTAR (Lasergene, ZDA), ki je namenjen urejanju sekvenc. Analiza s programom DNASTAR je obsegala delo v programih EditSeq in MegAlign. Primerjava našega genoma virusa PED z drugimi celotnimi genomi je bila narejena z algoritmom BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) na spletnem strežniku NCBI (National Center for Biotechnology Information, ZDA). Zaporedje celotnega genoma slovenskega seva SLO/JH-11/2015 smo dodali v podatkovno zbirko GenBank (zaporedna številka KU297956) po navodilih spletnega orodja BankIt.

3.2.8.1 Delo s programom IGV

Urejanje dobljene sekvence celotnega genoma virusa PED smo začeli s programom IGV (Integrative Genomics Viewer). Dobljene sekvence odsekov genoma slovenskega seva SLO/JH-11/2015 smo primerjali in poravnali z izbranim referenčnim sevom L00721/GER/2014 (Nemčija, 2014) v FASTA formatu, ki je v podatkovni zbirki GenBank dostopen pod številko LM645057. Program IGV je omogočal jasen prikaz pokritosti posameznih odsekov genoma ter pokazal razlike v nukleotidnem zaporedju med vstavljenim referenčnim sevom in odčitanimi zaporedji analiziranega seva. Uporabili smo začetni in končni del zaporedja genoma, ki je bil pokrit najmanj 5x in celotno zaporedje genoma pregledali ter popravili napake od začetka do konca, na vseh mestih posameznih nukleotidov. Na ta način smo dobili zaporedje celotnega genoma slovenskega seva virusa PED SLO/JH-11/2015. Vse razlike med referenčnim in analiziranim genomom smo zabeležili v programu EditSeq.

3.2.8.2 Delo s programom EditSeq in algoritmom BLAST

EditSeq je program, ki omogoča preprosto obdelavo sekvenc nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij. V njem lahko zaporedje nukleotidov ročno spreminjamo in avtomatsko pretvorimo dele genoma v aminokislinsko zaporedje ter določimo začetek in konec bralnih okvirjev. Na ta način smo v genomu slovenskega seva SLO/JH-11/2015 določili bralne okvirje za ORF1a, ORF1b, protein receptorja, membranski protein, nukleoprotein in protein ovojnice. Nukleotidna zaporedja znotraj bralnih okvirjev smo pretvorili v aminokislinska zaporedja in

na tak način potrdili natančnost določitve bralnih okvirjev. Nukleotidna zaporedja (.seq) in aminokislinska zaporedja (.pro), ki smo jih v tem programu analizirali smo hranili za nadaljnje analize. Primerjavo zaporedij smo izvedli tudi za 49 celotnih genomih PEDV, ki smo jih pridobili iz baze podatkov GenBank preko NCBI spletnega strežnika. S tem smo si ustvarili lastnopodatkovno zbirko, ki smo jo potrebovali za izvedbo filogenetskih primerjav v programu MegAlign. Pri izbiri posameznih sevov, ki smo jih vključili v primerjavo smo si pomagali s filogenetsko raziskavo, ki so jo opravili Carvajal in sod. leta 2015.

3.2.8.3 Delo s programom MegAlign

Komercialni program MegAlign je namenjen poravnavi in primerjavi nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij. Slovenski sev virusa PED SLO/JH-11/2015 smo poravnali in primerjali z 49 drugimi sevi virusov PED. Medsebojno primerjavo zaporedij smo naredili s celotnimi genomi ter s posameznimi bralnimi okvirji. Rezultate smo prikazali v obliki filogenetskih dreves ter tabel, ki prikazujejo odstotke razlik med nukleotidnimi ali aminokislinskimi zaporedji posameznih sevov.

4 REZULTATI

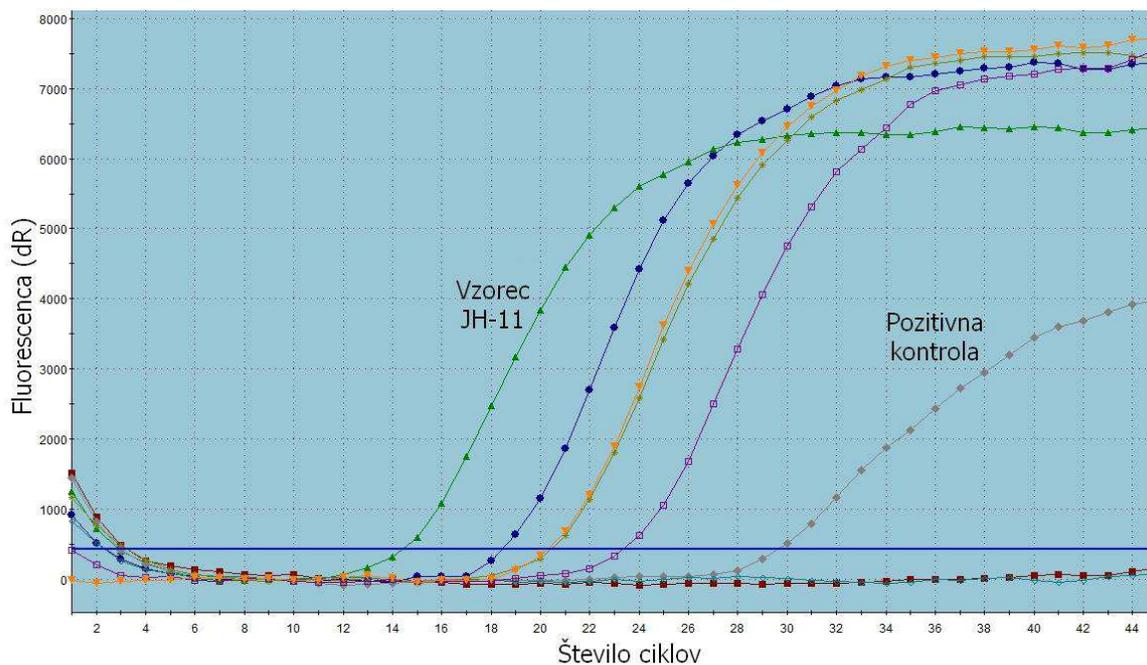
4.1 PRVI DOKAZ VIRUSA PED V VZORCIH BLATA PRAŠIČEV

Virus PED smo v Sloveniji prvič dokazali v vzorcih blata prašičev pitancev v januarju 2015. V letu 2015 smo nadaljevali s spremljanjem okužene reje in testiranjem vzorcev blata na virus PED. V začetku postopka sekvenciranja celotnega genoma smo najprej izbrali 6 pozitivnih vzorcev, iz katerih smo s komercialnim kompletom QIAamp[®] Viral RNA osamili nukleinske kisline in dokazali prisotnost virusa PED z metodo RT-qPCR. Dobljene vrednosti Ct so bile med 12,55 in 20,72 (Tabela 4 in Slika 11).

Tabela 4: Rezultati metode RT-qPCR za dokaz virusa PED pri 6 pozitivnih vzorcih.

Table 4: The results of RT-qPCR method for 6 PED virus positive samples.

Ime vzorca	Datum odvzema vzorca	Vrednost Ct
PED JH-9	3.9.2015	14,28
PED JH-11	3.9.2015	12,55
PED Ba	5.11.2015	16,64
PED JH-23-1	6.1.2015	15,70
PED JH-18	19.1.2015	19,34
PED 1470 27 8 s	19.1.2015	20,72



Slika 11: Grafični prikaz rezultatov metode RT-qPCR za dokaz virusa PED.

Figure 11: The results of RT-qPCR method for PED virus positive samples.

4.2 DOKAZ VIRUSA PED PO ZAPOREDNI OSAMITVI S KOMERCIALNIM KOMPLETOM QIAamp[®] IN REAGENTOM TRIzol[®]

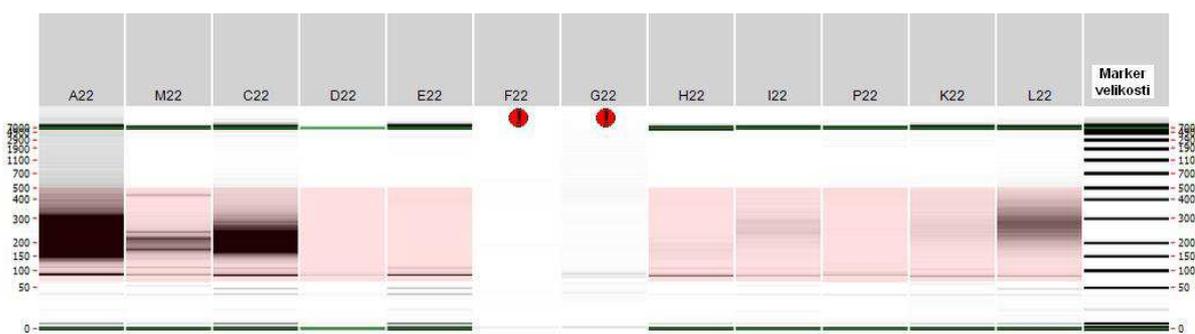
Za NGS smo izbrali najbolj vzorec, ki je bil v RT-qPCR najbolj pozitiven, to je vzorec PED JH-11 s Ct 12,55 (Tabela 4), ki je bil v okuženi reji odvzet septembra 2015. Osamitev nukleinskih kislin smo izvedli s komercialnim kompletom QIAamp[®] Viral RNA Kit, nato pa še s komercialnim reagentom TRIzol[®]. Po ponovni osamitvi smo z metodo RT-qPCR preverili prisotnost in količino nukleinskih kislin virusa PED. Dobljena vrednost Ct je bila 15,76, kar smo ocenili kot primerno in s tem vzorcem nadaljevali postopek za NGS.

4.3 PREVERJANJE USPEŠNOSTI POSTOPKA PRIPRAVE VZORCEV ZA SEKVENCIRANJE S TEHNOLOGIJO ION TORRENT

Za uspeh metode NGS je bistvenega pomena kvalitetna priprava vzorca in knjižnice. Morebitne napake ali nepravilnosti v postopkih se izražajo pri samem sekvenciranju in lahko privedejo do slabih rezultatov. Za preverjanje uspešnosti postopka priprave knjižnice, smo med pripravo vzorcev večkrat izvajali kontrolne meritve.

Količino RNA v vzorcu, ki smo jo pridobili z zaporedno osamitvijo s kompletom QIAamp® Viral RNA Kit in reagentom TRIzol®, smo določili s pomočjo fluorometra Qubit® 3.0. Koncentracija osamljene RNA v vzorcu je znašala 2,38 ng/μl. S to vrednostjo smo potrdili ustreznost izbranega vzorca in nadaljevali s postopkom.

Preverjanje uspešnosti fragmentacije knjižnice za sekvenciranje smo izvedli na aparaturi LabChip® GX (Caliper, Life Sciences, ZDA), ki deluje po principu gelske elektroforeze. Rezultati so potrdili uspešnost fragmentacije, ker je bila večina fragmentov velikih med približno 140 bp in 320 bp, kar je primerno za določanje nukleotidnega zaporedja na aparaturi Ion PGM™ (Slika 12).



Slika 12: Rezultati meritve uspešnosti priprave knjižnice za sekvenciranje. Vzorec PED JH-11 predstavlja prvi stolpec (označen z A22), ostale kolone (označene od M22 do L22) pa predstavljajo rezultate meritev za vzorce, ki niso bili vključeni v to raziskavo. Zadnja kolona predstavlja velikostni standard.

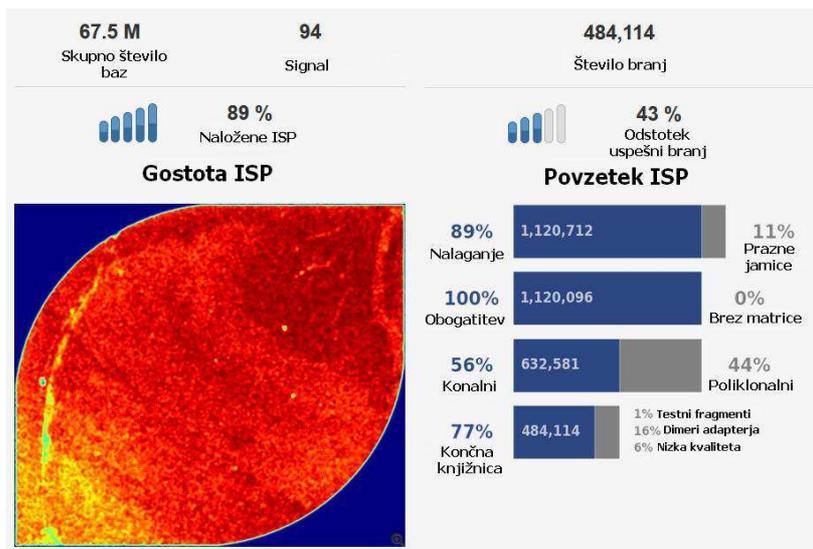
Figure 12: The results of library preparation control. PED JH-11 sample is shown in the first lane (A22), The other lanes (M22 to L22) represent the samples which were not included in this study. The last lane represents the ladder size.

Fluorometer Qubit[®]3.0 smo ponovno uporabili za oceno uspešnosti vezave matrične DNA na ISP, katero smo izvedli na sistemu Ion OneTouch[™] 2. Fluorometer Qubit[®]3.0 ima predhodno naložen program, ki izmeri koncentracijo ISP z uspešno vezanimi cDNA molekulami. Izmerili smo koncentracijo 5,18 ng/μl ISP.

4.4 NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE GENOMA VIRUSA PED SEVA SLO/JH-11/2015 IN FILOGENETSKA PRIMERJAVA

Določili smo nukleotidno zaporedje celotnega genoma slovenskega seva PED SLO/JH-11/2015 (28.028 nt). Celotno zaporedje je prikazano v obliki izpisa iz GenBank v Prilogi 1, ime vzorca PED JH-11 pa smo preimenovali v SLO/JH-11/2015, da smo v imenu dodatno uporabili kratico imena naše države (SLO) in leto ugotovitve (2015). Pri analizi genoma smo se osredotočili na njegovo zgradbo in filogenetsko primerjavo celotnih genomov virusov PED ter natančneje analizirali razlike v genu za protein receptorja. Ostale dele genoma smo primerjali s prvim evropskim sevom CV777 in prototipnim S INDEL sevom OH851.

Pri sekvenciranju na aparaturi Ion PGM System (Slika 13) smo s pripadajočo programsko opremo spremljali osnovne parametre sekvenciranja. Slikovno je prikazana učinkovitost nalaganja čipa, ki je v našem primeru dosegla 89 %, poleg tega pa so prikazani tudi parametri, ki se nanašajo na uspeh obogatitve pozitivnih sferic (100 %) ter kvaliteto ISP in odčitanih sekvenc. Pridobili smo 56 % monoklonalnih ISP s 632.581 odčitki sekvenc. Končna odčitana knjižnica (brez testnih sekvenc, dimerov adapterjev in sekvenc nizke kvalitete) je obsegala 77 % odčitkov, kar je znašalo 484.114 odčitkov. Ti podatki so prikazani za celoten čip, na katerem smo poleg našega vzorca sekvencirali še pet drugih vzorcev, ki niso povezani s to raziskovalno nalogo. Pri sekvenciranju vzorca PED SLO/JH-11/2015 smo dobili največje število sekvenciranih odsekov dolžine okrog 120 nt, kot je prikazano na sliki 14. Takšen rezultat potrjuje uspešnost postopka sekvenciranja.



Slika 13: Prikaz osnovnih parametrov sekvenciranja. Prikazana je učinkovitost nalaganja čipa Ion 314TM in podatki o ISP. Prikazani podatki se nanašajo na vse vzorce naložene na čip.

Figure 13: The presentation of the sequencing parameters, such as Ion 314TM Chip loading efficiency and ISP parameters. The data are presented for all of the loaded samples.



Slika 14: Prikaz razmerja in dolžine sekvenciranih fragmentov za vzorec PED JH-11.

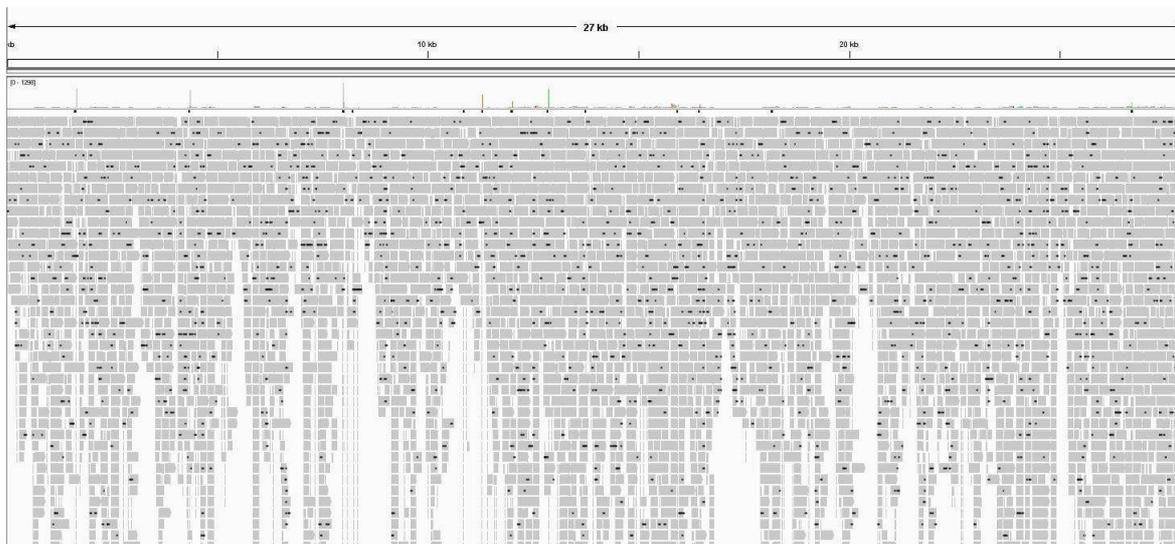
Figure 14: The presentation of the read lengths distribution for sample PED JH-11.

Rezultate sekvencirana dobljene z aparaturom Ion PGMTM System smo analizirali s prileganjem na izbran (referenčni) nemški sev L00721/GER/2014 v računalniškem programu IGV. V tem programu je prikazana pokritost posameznih nukleotidov v dolžini celotnega genoma (Slika 15). Na podlagi primerjave smo določili vsa mesta, na katerih se pojavljajo razlike nukleotidnega zaporedja med obema sevoma. V povprečju je pokritost celotnega genoma znašala približno 50 krat, najnižja je bila 5 kratna, najvišja pa 1.298 kratna (Slika 16).



Slika 15: Prikaz krajšega odseka genoma SLO/JH-11/2015 s prilegajočimi zaporedji v programu IGV. Prikazani sta razliki dveh nukleotidov na pozicijah 22.789 (G v A) in 22.844 (C v T) glede na referenčno sekvenco L00721/GER/2014.

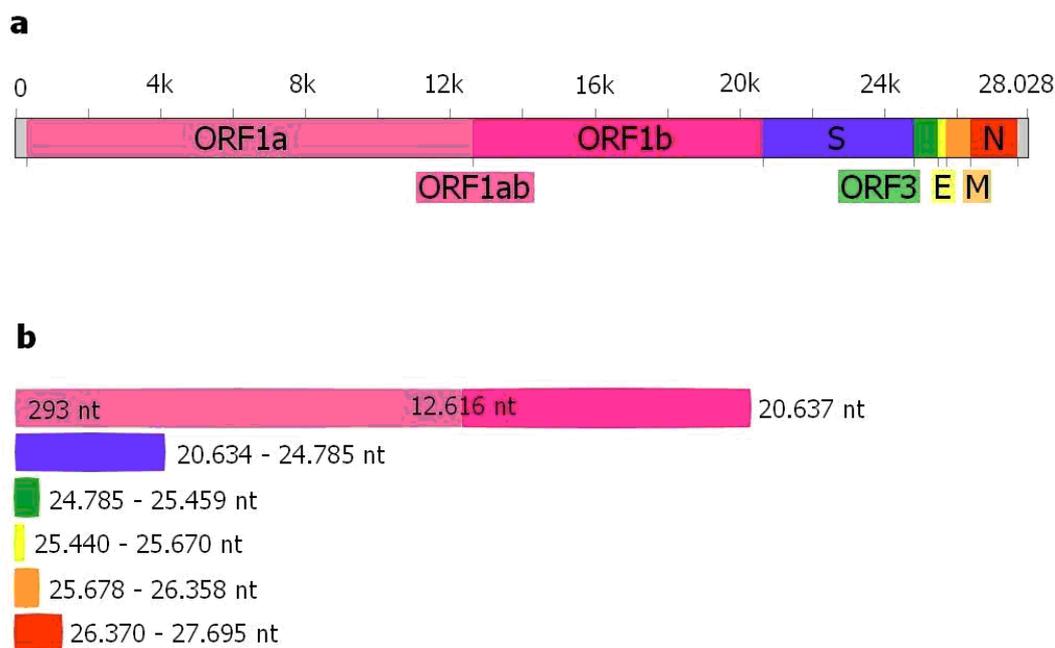
Figure 15: Display of the short region in SLO/JH-11/2015 genome. Two nucleotide differences in positions 22.789 (G to A) and 22.844 (C to T), in comparisson to reference sequence L00721/GER/2014, are presented.



Slika 16: Prikaz pokritosti celotnega genoma SLO/JH-11/2015 v programu IGV. Prikazane so različno dolge odčitane sekvence, ki se prekrivajo med seboj. Prileganje je izvedeno na referenčno sekvenco L00721/GER/2014.

Figure 16: The presentation of the complete SLO/JH-11/2015 genome coverage in IGV software. Different lengths of sequenced fragments that are overlapping are visible. Reference sequence used is L00721/GER/2014.

Dolžina celotnega genoma SLO/JH-11/2015 je znašala 28.028 nt, brez poli-A repa. Zaporedje celotnega genoma smo določili s pomočjo uporabe sekvence genoma nemškega seva L00721/GER/2014, ki je bil v GenBank poslan 16. decembra 2014 iz Friedrich-Loeffler-Instituta v Nemčiji (Hanke in sod., 2015). Genom je organiziran na enak način, kot je bilo predhodno opisano za izolat 15V010 iz Belgije (Slika 17) (Theuns in sod., 2015).



Slika 17: a) Shematski prikaz strukture genoma seva SLO/JH-11/2015. b) Začetne in končne pozicije posameznih bralnih okvirjev.

Figure 17: a) Schematic presentation of the genomic structure of SLO/JH-11/2015 strain. b) The starting and end positions of open reading frames are presented.

4.4.1 Filogenetska primerjava celotnih genomov virusa PED

V filogenetsko primerjavo smo vključili 49 celotnih genomov virusov PED, ki smo jih pridobili v podatkovni bazi GenBank. Izbrali smo predstavnike uvrščene med klasične seve PED in predstavnike uvrščene med S INDEL seve, ki so jih ugotavljali v različnih obdobjih in na različnih delih sveta. S tem smo zagotovili, da bo naša raziskava vključevala čimbolj reprezentativen izbor virusov PED.

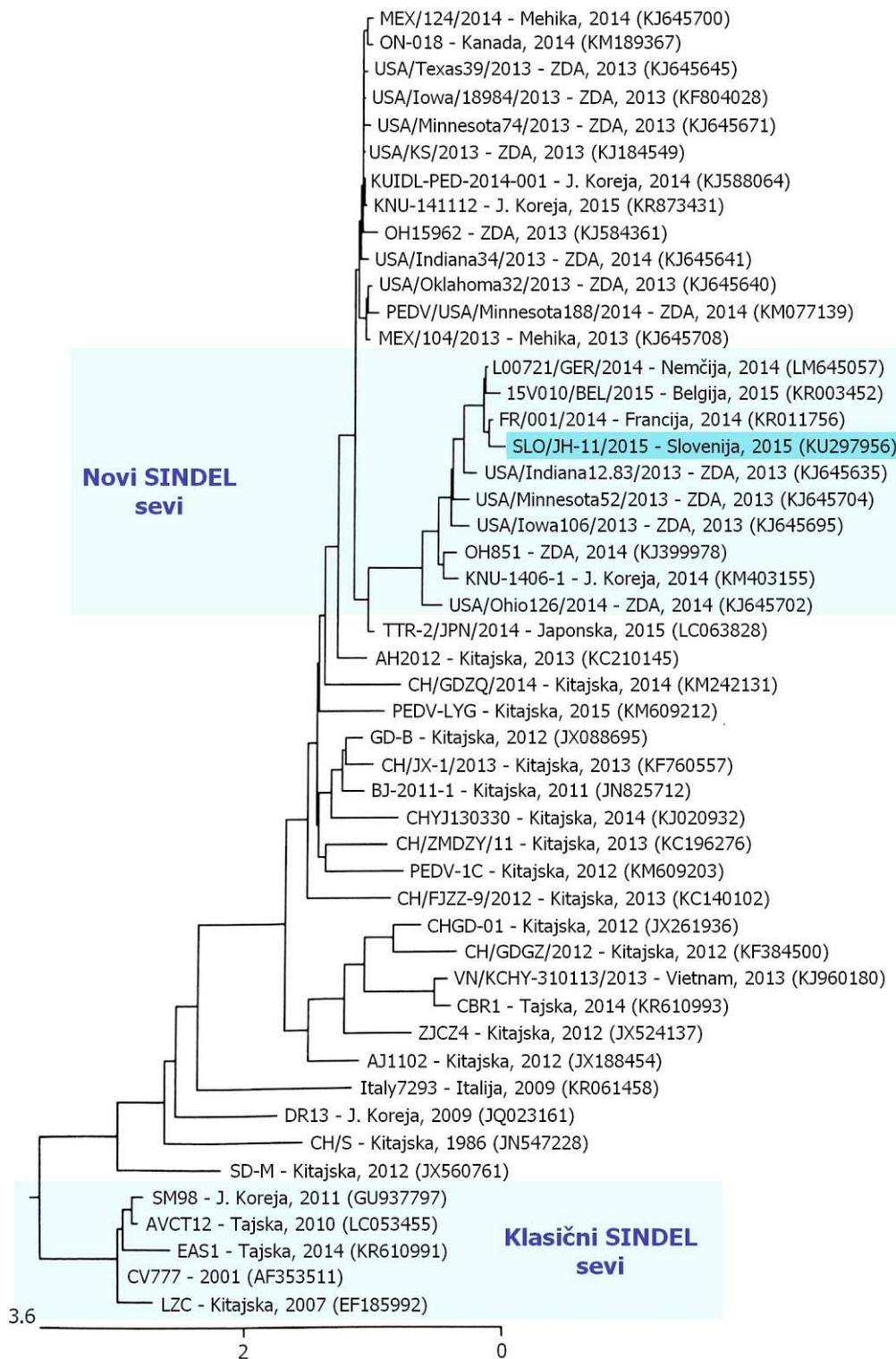
Izvedena primerjava nukleotidnih zaporedij celotnih genomov v programu BLAST je pokazala, da sta bila slovenskemu sevu SLO/JH-11/2015 genetsko najbližja seva iz Francije in Nemčije z 99,8 % identičnostjo zaporedja nukleotidov. Francoski sev FR/001/2014 se je od našega seva razlikoval v 44 nt, nemški sev L00721/GER/2014 pa v 49 nt. Sledila sta jima belgijski sev 15V010/BEL/2015 z 93 nt razlike in 99,7 % identičnostjo zaporedja ter ameriški sev USA/Indiana12.83/2013 z 99,6 % identičnostjo zaporedja nukleotidov. Ameriška seva USA/Iowa106/2013 in USA/Minnesota52/2013 sta bila z našim sevom identična v 99,4 %, prototipni ameriški sev OH851 S INDEL pa se je od našega seva razlikoval v 185 nt in 99,3 % identičnostjo zaporedja. Tajski sev KNU-1406-1 je bil slovenskemu sevu identičen v 99,3 %, ameriški sev USA/Ohio126/2014 pa v 99,1 %. Zgoraj naštetimi sevi so ugotovljeni najbližji sevi virusov PED iz različnih držav, ki so bili v času študije dostopni v podatkovni zbirki GenBank. Prototip sev CV777 je bil slovenskemu sevu soroden v 97,0 % (Tabela 3 in Slika 18).

Tabela 3: Prikaz odstotka podobnosti in divergence med izbranimi sevi virusov PED.

Table 3: The presentation of the percent of identity and divergence amongst PED virus strains.

		Odstotek podobnosti																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Divergenca	1	■	99.7	96.9	98.0	96.9	97.1	96.8	96.8	97.0	97.1	97.0	99.6	96.6	96.9	97.0	97.1	97.0	97.1	96.8	1
	2	0.2	■	96.6	97.6	96.6	96.8	96.4	96.4	96.7	96.8	96.6	99.4	96.2	96.6	96.7	96.8	96.6	96.8	96.5	2
	3	3.2	3.4	■	97.3	99.4	98.7	99.2	99.2	98.4	98.6	97.5	96.5	98.1	99.3	98.5	98.6	99.1	98.6	99.2	3
	4	2.0	2.2	2.8	■	97.3	97.5	97.1	97.1	97.4	97.5	97.3	97.6	96.7	97.2	97.4	97.5	97.2	97.5	97.2	4
	5	3.2	3.4	0.6	2.8	■	98.8	99.5	99.5	98.4	98.5	97.5	96.5	98.1	99.6	98.4	98.6	99.4	98.7	99.5	5
	6	3.0	3.2	1.3	2.5	1.2	■	99.0	99.0	99.3	99.4	97.8	96.7	97.6	99.1	99.3	99.5	99.2	99.8	99.0	6
	7	3.2	3.4	0.8	2.8	0.5	1.0	■	99.9	98.5	98.6	97.4	96.4	98.0	99.9	98.5	98.6	99.8	99.0	99.9	7
	8	3.3	3.4	0.8	2.8	0.5	1.0	0.1	■	98.4	98.5	97.4	96.4	98.0	99.9	98.5	98.6	99.8	99.0	99.9	8
	9	3.1	3.3	1.5	2.6	1.6	0.6	1.5	1.5	■	99.8	97.6	96.6	97.5	98.5	99.7	99.8	98.8	99.3	98.5	9
	10	3.0	3.2	1.5	2.6	1.5	0.6	1.4	1.4	0.2	■	97.7	96.7	97.6	98.6	99.8	99.9	98.8	99.4	98.6	10
	11	3.1	3.3	2.5	2.6	2.6	2.3	2.6	2.6	2.4	2.4	■	96.6	97.0	97.5	97.6	97.8	97.7	97.8	97.4	11
	12	0.4	0.5	3.6	2.4	3.6	3.4	3.6	3.7	3.5	3.4	3.5	■	96.2	96.5	96.6	96.7	96.6	96.7	96.4	12
	13	3.5	3.7	1.9	3.1	1.9	2.4	2.0	2.1	2.5	2.4	3.0	3.9	■	98.0	97.5	97.6	96.2	97.5	98.0	13
	14	3.2	3.4	0.7	2.8	0.4	0.9	0.1	0.1	1.4	1.4	2.6	3.6	2.0	■	98.6	98.7	99.8	99.1	99.9	14
	15	3.1	3.3	1.5	2.7	1.6	0.7	1.5	1.5	0.3	0.2	2.4	3.5	2.5	1.5	■	99.8	98.8	99.3	98.5	15
	16	3.0	3.2	1.4	2.5	1.5	0.5	1.4	1.4	0.1	0.1	2.3	3.4	2.4	1.3	0.2	■	98.9	99.4	98.6	16
	17	3.1	3.2	0.9	2.6	0.6	0.8	0.2	0.2	1.2	1.2	2.4	3.5	2.1	0.2	1.2	1.1	■	99.3	99.8	17
	18	3.0	3.2	1.4	2.5	1.3	0.2	1.0	1.0	0.7	0.6	2.3	3.4	2.5	0.9	0.7	0.6	0.8	■	99.0	18
	19	3.3	3.5	0.8	2.8	0.5	1.0	0.1	0.1	1.5	1.4	2.6	3.7	2.0	0.1	1.5	1.4	0.2	1.0	■	19
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	

1	CV777 (AF353511)
2	SM98 - J. Koreja, 2011 (GU937797)
3	GD-B - Kitajska, 2012 (JX088695)
4	SD-M - Kitajska, 2012 (JX560761)
5	AH2012 - Kitajska, 2013 (KC210145)
6	OH851 - USA, 2014 (KJ399978)
7	USA/Minnesota76/2013 - USA, 2013 (KJ645671)
8	MEX/124/2014 - Mehika, 2014 (KJ645700)
9	15V010/BEL/2015 - Belgija, 2015 (KR003452)
10	FR/001/2014 - Francija, 2014 (KR011756)
11	Italy7293 - Italija, 2009 (KR061458)
12	EAS1 - Tajska, 2014 (KR610991)
13	CBR1 - Tajska, 2014 (KR610993)
14	KNU-141112 - J. Koreja, 2015 (KR873431)
15	SLO/JH-11/2015 - Slovenija, 2015 (KU297956)
16	L00721/GER/2014 - Nemčija, 2014 (LM645057)
17	TTR-2/JPN/2014 - Japonska, 2015 (LC063828)
18	KNU-1406-1 - J. Koreja, 2014 (KM403155)
19	ON-018 - Kanada, 2014 (KM189367)



Slika 18: Primerjava celotnih genomov 49 sevov virusov PED. Razlike med sevi so prikazane v obliki filogenetskega drevesa, narejenega v programu MegAlign (DNASTAR, Lasergene, ZDA)

Figure 18: Phylogenetic tree comparison of 49 PED virus complete genome sequences, using MegAlign programme (DNASTAR, Lasergene, ZDA).

4.4.2 Določitev bralnih okvirjev

V nukleotidnem zaporedju celotnega genoma SLO/JH-11/2015 smo določili posamezne bralne okvirje. Razporeditev bralnih okvirjev se je ujemala s preostalimi sevi virusov PED, ki so na voljo v GenBank.

4.4.2.1 Bralni okvir ORF1ab

Na 5' koncu genoma je nekodirajoča regija, ki zajema prvih 292 nt. Bralni okvir ORF1ab kodira virusno replikazo, ki jo sestavljata dva proteina (kodirata ju ORF1a in ORF1b). Skupaj zajemata približno dve tretjini celotnega genoma virusa PED. Bralni okvir ORF1a obsega 12.324 nt, začne se na poziciji 293 in konča na poziciji 12.616. ORF1b obsega 8.022 nt, začne se na poziciji 12.616 in konča na poziciji 20.637. Primerjava ORF1ab bralnega okvirja slovenskega seva SLO/JH-11/2015 z 12 drugimi sevi iz podatkovne baze GenBank je pokazala, da so razlike v nukleotidnem zaporedju med posameznimi sevi PED zelo majhne. Filogenetsko so bili slovenskemu sevu najbližji sevi virusov PED ugotovljeni v letih 2014 in 2015 v Evropi; sev FR/001/2014 iz Francije, sev L00721/GER/2014 iz Nemčije in sev 15V010/BEL/2015. Slovenski sev SLO/JH-11/2015 in prvi PED sev CV777 sta si bila v regiji ORF1a podobna v 97,3 % nt, kar znaša razliko v 549 nt. Z 99,3 % identičnostjo zaporedja in 135 nt razlike je bil sevu SLO/JH-11/2015 bližje ameriški sev OH851.

ORF1a obsega zaporedje 4.108 aminokislin. Aminokislinski zaporedji seva SLO/JH-11/2015 in seva CV777 sta si bila podobna v 97,5 % in se razlikovala z zamenjavo aminokislin na 100 različnih mestih. Seva SLO/JH-11/2015 in OH851 pa sta si bila podobna v 99,3 % in imela v ORF1a 28 različnih aminokislin.

ORF1b kodira zaporedje 2.673 aminokislin. Slovenski sev SLO/JH-11/2015 je bil z evropskim sevom CV777 identičen v 99,3 %, razlikovala pa sta se v 20 različnih aminokislinah. S prototipnim S INDEL sevom pa OH851 je bil identičen v 99,7 % in se razlikoval v 8 aminokislinah.

4.4.2.2 Bralni okvir proteina receptorja (S)

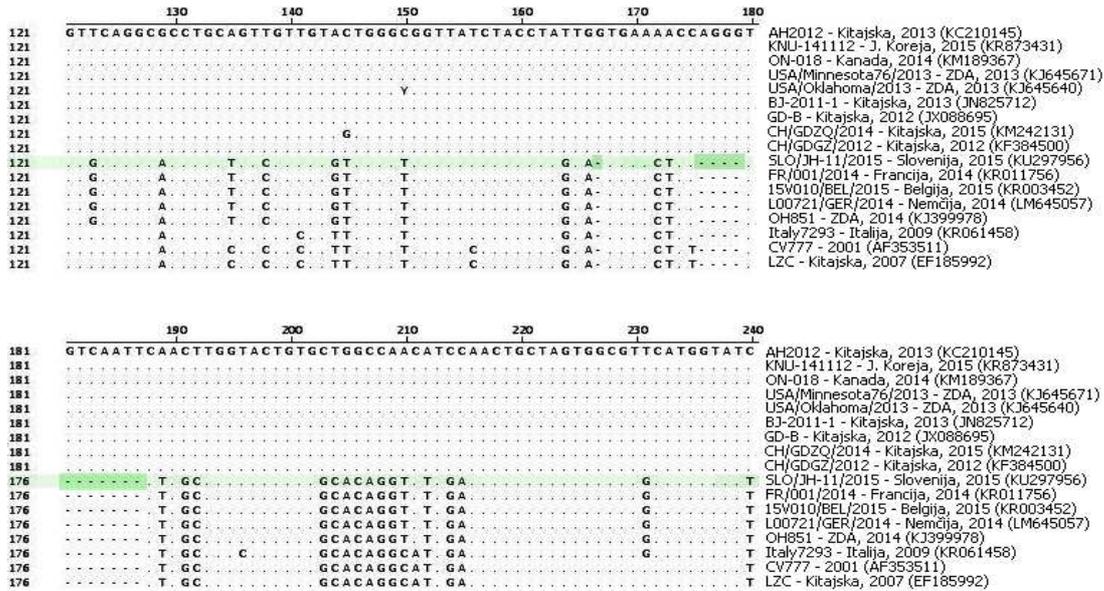
Bralni okvir proteina receptorja (protein S) se v slovenskemu sevu SLO/JH-11/2015 začne na poziciji 20.634 in konča na poziciji 24.785. Skupno obsega 4.152 nukleotidov. V primerjavi s

kitajskim referenčnim sevom AH2012 smo v sevu SLO/JH-11/2015 odkrili štiri delecije in eno insercijo (Tabela 4, Slika 19 in Slika 20), poleg tega pa je bilo v začetnem delu gena S prisotnih še več točkovnih mutacij, ki so bile po večini razporejene v prvih 1300 nt gena S. Zaradi značilnih insercij in delecij smo sev SLO/JH-11/2015 uvrstili med S INDEL seve.

Tabela 4: Prikaz delecij in insercije v bralnem okvirju proteina receptorja. Uporabljen referenčni sev AH2012, ki ne spada med S INDEL seve.

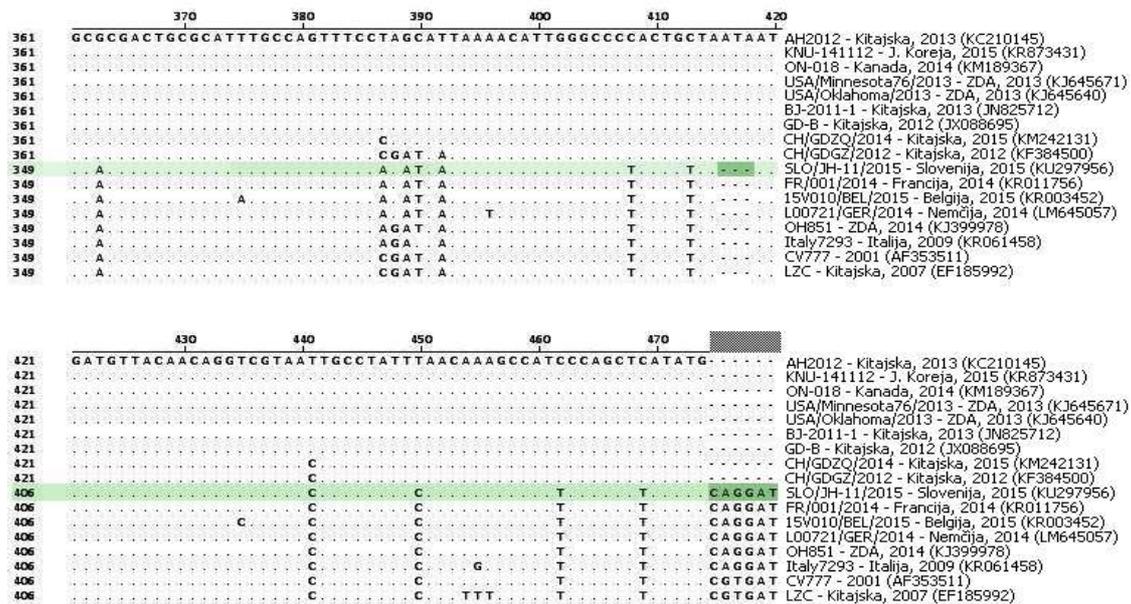
Table 4: Deletions and the insertion in the spike protein open reading frame. Non S INDEL strain AH2012 is used as reference.

	Število nukleotidov:	Pozicija nukleotida v celotnem genomu:	Pozicija nukleotida v zaporedju, ki kodira protein receptorja:
Delecija 1	1-nt (G)	20.801	167
Delecija 2	4-nt (AGGG)	20.810 - 20.813	176 - 179
Delecija 3	7-nt (GTCAATT)	20.815 - 20.821	181- 187
Delecija 4	3-nt (ATA)	21.050 - 21.052	416 - 418
Insercija	6-nt (CAGGAT)	med 21.108 in 21.109	med 474 in 475



Slika 19: Prikaz delecij na treh mestih v delu genoma ki kodira protein receptorja in primerjava s 16 drugimi sevi virusa PED. Prva delecija je na poziciji 167, druga na poziciji 176-179 in tretja na 181-187.

Figure 19: The presentation of the three deletions in the part of genome, that encodes spike protein, and comparison with 16 other PED virus strains. The first deletion is in position 167, the second in position 176-179 and the third deletion is on the position 181-187.

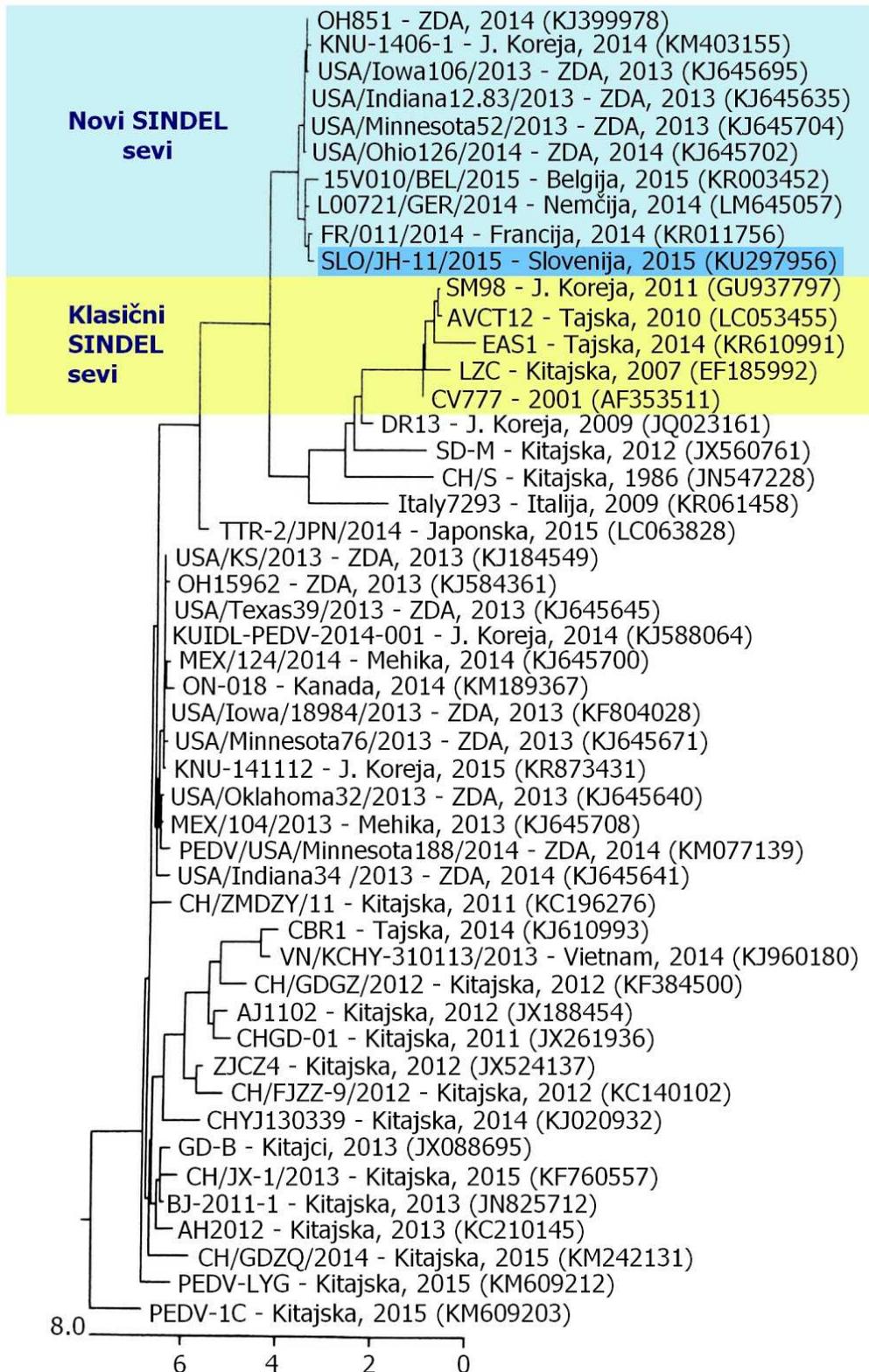


Slika 20: Prikaz delecije in insercije v delu genoma, ki kodira protein receptorja in primerjava s 16 drugimi sevi virusa PED. Delecija je na poziciji 416-418, insercija je med pozicijama 474 in 475.

Figure 20: The deletion and the insertion in the part of genome, that encodes spike protein and comparison with 16 other PED virus strains. The deletion is in position 416-418, the insertion is between positions 474 and 475.

Za filogenetsko primerjavo nukleotidnega zaporedja, ki kodira protein receptorja, smo uporabili 49 sevov virusa PED, ki so bili dostopni v podatkovni zbirki GenBank (Slika 21). Slovenski sev SLO/JH-11/2015 je bil na filogenetskem drevesu najbližje francoskemu sevu FR/001/2014 z 99,8 % identičnostjo, nemškemu sevu L00721/GER/2014 z 99,7 % identičnostjo in belgijskemu sevu z 99,5 % identičnostjo. Sledili so jim štirje ameriški sevi USA/Ohio126/2014 z 99,4 % identičnostjo, USA/Minnesota52/2013 in USA/Indiana12.83/2013 z 99,5 % identičnostjo in USA/Iowa106/2013 z 99,3 % identičnostjo. Korejski sev KNU-1406-1 je slovenskemu sevu identičen v 99,1 %, ameriški sev OH851 pa v 99,4 %. Podobnost s prototipnim sevom CV777 je bila 95,7 % identičnih nukleotidov.

Nukleotidno zaporedje gena za protein S smo prevedli tudi v aminokislinsko zaporedje in ga primerjali z zaporedjei aminokislin ostalih 48 sevov virusa PED, katere smo vključili v raziskavo. Protein S sestavlja zaporedje 1.384 aminokislin. Slovenskemu sevu SLO/JH-11/2015 je bil najbližji francoski sev FR/001/2014 z 99,6% identičnostjo, kateremu je sledil nemški sev L00721/GER/2014 z 99,4 % identičnostjo aminokislinskega zaporedja. Ameriški sevi USA/Indiana12.83/2013, USA/Ohio126/2014, USA/Minnesota52/2013 in USA/Iowa106/2013 so bili slovenskemu sevu identični v 99,3 %, OH851 pa v 99,2 %, kar pomeni 11 različnih aminokislin. Ugotovili smo 99,1% identičnost še z južnokorejskim sevom KNU-1406 in belgijskim sevom 15V010/BEL/2015. Identičnost s sevom CV777 je znašala 96,1%, kar pomeni 53 aminokislinskih razlik v proteinu receptorja.



Slika 21: Filogenetska primerjava 4.152 nukleotidov, ki kodirajo protein receptorja.

Figure 21: Phylogenetic tree based on the 4.152 nucleotides comparison, that encode spike protein.

4.4.2.3 Bralni okvir ORF3

Bralni okvir ORF3, ki kodira pomožni membranski protein (mp), obsega zaporedje 675 nt, začne se na poziciji 24.785 in konča na poziciji 25.459. Filogenetska primerjava zaporedja nukleotidov v ORF3 za 13 sevov virusa PED je pokazala, da se evropski izolati SLO/JH-11/2015 (Slovenija), L00721/GER/2014 (Nemčija), FR/001/2014 (Francija) in 15V010/BEL/2015 (Belgija) v tem delu genoma ne razlikujejo. Slovenski sev SLO/JH-11/2015 je bil evropskemu sevu CV777 identičen v 96,7 %, kar pomeni razliko v 22 nt, prototipnemu ameriškemu S INDEL sevu pa v 99,9 % z enim nukleotidom razlike.

ORF3 sestavlja 224 aminokislin. Razlike na aminokislinskem zaporedju med sevom SLO/JH-11/2015 in sevom CV777 so bile na devetih mestih. Seva SLO/JH-11/2015 in OH851 sta se razlikovala v 1 aminokislini na poziciji 85 v ORF3.

4.4.2.4 Bralni okvir proteina ovojnice

Bralni okvir proteina ovojnice (E) se v genomu nahaja med pozicijama 25.440 in 25.670. Skupno obsega 231 nt. Sev SLO/JH-11/2015 je bil z evropskim sevom CV777 v tem delu genoma identičen v 97,0 %, z belgijskim sevom 15V010/BEL2015 je bil identičen v 99,6 % nt, popolnoma enako zaporedje nukleotidov pa smo ugotovili pri francoskemu sevu FR/001/2014, nemškemu sevu L00721/GER/2014 ter prototipnemu S INDEL sevu OH851.

Protein ovojnice sestavlja zaporedje 76 aminokislin. Aminokislinski zaporedji slovenskega seva SLO/JH-11/2015 in evropskega seva CV777 sta bili identični v 98,7 % aminokislin, kar pomeni razliko v eni aminokislini.

4.4.2.5 Bralni okvir membranskega proteina

Bralni okvir membranskega proteina (M) se v genomu nahaja med pozicijama 25.678 in 26.358. Skupno obsega 681 nt. Identičnost v zaporedju nukleotidov med slovenskim sevom SLO/JH-11/2015 in evropskim sevom CV777 je znašala 98,2 %, med sevom SLO/JH-11/2015 in OH851 pa 99,9 %.

Membranski protein sestavlja 226 aminokislin. Aminokislinsko zaporedje membranskega proteina seva SLO/JH-11/2015 je bilo popolnoma enako zaporedju seva OH851, identičnost s sevom CV777 pa je bila 98,7 % , kar znaša tri različne aminokisliline.

4.4.2.6 Bralni okvir proteina nukleokapside

Bralni okvir proteina nukleokapside (N) se v genomu nahaja med pozicijama 26.370 in 27.695. Skupno obsega 1.326 nukleotidov. Slovenski sev SLO/JH-11/2015 in evropski sev CV777 sta bila v tej regiji identična v 95,3 % nt, identičnost zaporedja nukleotidov z ameriškim, prototipnim, S INDEL sevom OH851 pa je znašala 98,9 %.

Protein nukleokapside sestavlja 441 aminokislin. V tej regiji genoma sta bili zaporedji aminokislin sevov SLO/JH-11/2015 in CV777 identični v 96,1 %, razlikovali pa sta se v 16 aminokislinah. Seva SLO/JH-11/2015 in OH851 sta bila identična v 98,6 % aminokislin, razlikovala pa sta se v 6 aminokislinah.

5 RAZPRAVA

V okviru raziskovalne naloge smo primarni cilj, to je določitev nukleotidnega zaporedja celotnega genoma slovenskega seva virusa PED z novo tehnologijo NGS Ion Torrent, v celoti dosegli. Želeli smo tudi pokazati, da je ta postopek mogoče uspešno uporabiti z osamitvijo virusne RNA neposredno iz vzorcev blata klinično prizadetih prašičev in brez uporabe specifičnih oligonukleotidnih začetnikov. Prav tako smo uspešno izvedli filogenetsko analizo, pri kateri smo celotni genom slovenskega seva SLO/JH-11/2015 primerjali z 49 genomi sevov virusov PED, ki so dostopni v podatkovni zbirki GenBank. S študijo smo potrdili naša pričakovanja, da spada slovenski sev SLO/JH-11/2015 med S INDEL seve, ter da je genetsko najbližje sevom PED, ki so jih v letih 2014 in 2015 ugotovili v Nemčiji, Franciji in Belgiji.

Prvič so okužbe z virusom PED zaznali v Veliki Britaniji leta 1971 (Oldham, 1972), kmalu pa se je bolezen pojavila tudi v Belgiji, kjer so povzročitelja prvič uvrstili med koronaviruse. Sev CV777 je bil sploh prvi znani sev virusa PED v svetu (Pensaert in Debouck, 1978). Kasneje so prisotnost virusa PED še večkrat dokazali po Evropi. Pri izvedbi epizootiološke raziskave in primerjave celotnih genomov smo v sklopu naše raziskovalne naloge slovenski sev natančno primerjali tudi s prvim znanim sevom CV777. S tem smo potrdili, da v letu 2015 v Sloveniji ugotovljeni sev virusa PED SLO/JH-11/2015 ni posledica kroženja prvotnega evropskega seva, temveč da je bil na področje Evrope vnesen od drugod.

Bolezen PED, po poročanjih različnih avtorjev v Evropi, v preteklosti ni povzročala velikih ekonomskih škod, zato ji stroka ni posvečala velike pozornosti. Podobno je bilo v preostalih delih sveta, do nedavnega so o primerih okužb poročali le iz nekaterih azijskih držav. Edini večji izbruh PED v Evropi do leta 2014, ki je dosegel razsežnosti epidemije, so zabeležili v letih od 2005 do 2006 v Italiji (Martelli in sod., 2008). Po prvem pojavu na Japonskem, leta 1982 (Takahashi in sod., 1983), se je PED relativno hitro razširil v vzhodnem delu Azije. Na tem območju PED do danes ostaja pomembna bolezen prašičev, ki je endemično prisotna in povzroča stalne ekonomske izgube v prašičereji. K temu prispeva veliko število prašičev, ki jih redijo v Aziji in stalno povečevanje prašičereje v tem delu sveta.

Povečano zanimanje za okužbe z virusom PED se je pojavilo po letu 2013, ko je prišlo do prvih izbruhov v ZDA. Po sekvenciranju prvega celotnega genoma ameriškega seva se je pokazalo, da je ta najbolj podoben kitajskim sevom ugotovljenim med leti 2011 in 2012, kar kaže na to, da se je virus PED v ZDA najverjetneje vnesel iz Kitajske (Stevenson in sod., 2013). V enem letu se je virus PED bliskovito razširil po Severni in Srednji Ameriki in pri tem povzročil zelo velike ekonomske škode. Ameriška populacija prašičev naj bi se v času epidemije zmanjšala za kar 10 % (Jung in Saif, 2015). To obdobje hitrega širjenja virusa v ZDA je imelo za posledico številne objave in povečanje števila v celoti sekvenciranih genomov virusa PED, kar je omogočilo izvedbo natančnejših epizootioloških študij in s tem vpogled v širjenje virusa po ZDA in v ostalem svetu. V letu 2014 so v ZDA osamili prvi S INDEL sev OH851, za katerega so značilne delecije in insercije v genu za protein receptorja. To je nova različica virusa PED, ki se klinično kaže z nižjo smrtnostjo sesnih pujskov v primerjavi s klasičnimi sevi PED (Wang in sod., 2014).

V letu 2014 so o prvih izbruhih okužb z virusom PED poročali iz nekaterih evropskih držav kot so Nemčija, Belgija, Francija in Ukrajina. Filogenetske primerjave so pokazale, da ugotovljeni sevi virusa PED, ki trenutno krožijo po Evropi, spadajo med S INDEL seve, zaradi česar se predvideva, da se je virus PED v Evropo verjetno vnesel iz ZDA (Stadler in sod., 2015; Theuns in sod., 2015; Grasland in sod., 2015). Na podlagi teh predhodnih ugotovitev smo postavili hipotezo, da tudi slovenski sev SLO/JH-11/2015 genetsko spada v skupino S INDEL sevov. Po uspešni določitvi celotnega genoma seva SLO/JH-11/2015, smo izvedli filogenetske primerjave s preostalimi evropskimi sevi, ki so dostopni v podatkovni zbirki GenBank, ter z večjim številom azijskih in ameriških sevov. Pri tem smo v primerjave vključili prvotni sev CV777, evropske seve, ki so bili ugotovljeni po letu 2014 ter prototipni, ameriški S INDEL sev OH851. Na ta način smo uspeli potrditi hipotezo, da je ugotovitev slovenskega seva SLO/JH-11/2015 posledica vnosa virusa PED v Slovenijo iz ene od evropskih držav, kjer so predhodno že potrdili prisotnost S INDEL sevov. Prav tako smo s študijo dokazali, da je slovenski sev genetsko bližje ameriškemu sevu OH851, kot pa prvotnemu evropskemu sevu CV777, kar potrjuje vnos novega S INDEL seva po letu 2013 v Evropo.

Povečano zanimanje za okužbe z virusom PED v svetu ter prvi pojav tega virusa v Sloveniji sta razloga, zaradi katerih smo se odločili za sekvenciranje celotnega genoma virusa. Poleg tega smo bili pred dodatnim izzivom, da bi za izvedbo tega postopka sekvenciranja na Veterinarski fakulteti prvič uporabili novo tehnologijo Ion Torrent. Poznavanje celotnega nukleotidnega zaporedja slovenskega seva SLO/JH-11/2015 pomembno prispeva k razjasnitvi epizootiološke situacije v Evropi, saj je bilo podatkov o pojavljanju okužb do leta 2014 izredno malo, pri čemer je edina večja izjema izbruh PED v Italiji v letih 2005 in 2006 (Martelli in sod., 2009).

Veterinarska fakulteta na Univerzi v Ljubljani je v letu 2014 pridobila nov sekvenator naslednje generacije, ki uporablja tehnologijo Ion Torrent. NGS je v svetu v porastu in je vedno pogostejše uporabljena tehnologija, ki bo v prihodnje pomembno prispevala k napredku genetike, genomike, epidemiologije in diagnostike. Menimo, da bo v prihodnosti NGS postala nepogrešljiva rutinska metoda, tako na področju raziskovanja kot diagnostike, v vseh pomembnejših laboratorijih. K temu pomembno prispeva Ion Torrent sekvenator Ion PGMTM System, ki je zaradi svoje zmogljivosti, prilagodljivosti, majhne velikosti in cenovne dostopnosti sedaj na razpolago tudi manjšim laboratorijem.

Kljub splošnim navodilom proizvajalca in potrebnem času za izvedbo postopkov (približno en teden), ki je potreben za sekvenciranje z Ion PGMTM System, je potrebna ustrezna izurjenost, poznavanje molekularnih postopkov in usposobljenost delavcev, ki upravljajo s sekvenatorjem in izvajajo pripravo vzorcev ter knjižnice. Tekom raziskave smo se natančno spoznali s posameznimi koraki v postopku priprave vzorcev in samim postopkom NGS, s čimer smo tudi postavili temelje za pripravo standardnega protokola za rutinsko uporabo sekvenatorja (angl. standard operating procedure, SOP).

Eden izmed ciljev raziskave je bil določiti nukleotidno zaporedje celotnemu genomu virusa PED neposredno iz vzorcev blata v katerem smo predhodno dokazali prisotnost nukleinske kisline virusa PED. V številnih raziskavah, kjer so določali celotni genom virusa PED, so uporabili predhodno osamitev virusa PED na celičnih kulturah. Na ta način je bil dobljeni vzorec čistejši in je vseboval večje količine virusa, kar je povečalo možnosti za uspešno sekvenciranje celotnega genoma. Poleg tega so v večini primerov pri pripravi samih vzorcev

izvedli pomnoževanje osamljene RNA s PCR z uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov (Hoang in sod., 2013). Osamitev virusov na celični kulturi in pomnoževanje osamljene RNA pred določanjem nukleotidnega zaporedja s tehnologijo NGS je postopek, ki se lahko uporablja tudi pri sekvenciranju genomov drugih vrst virusov (Kvisgaard in sod., 2013). Na začetku študije nismo vedeli, za kateri sev virusa PED gre, zato smo celotni genom virusa nameravali določiti brez uporabe specifičnih oligonukleotidnih začetnikov. Suspenzijo vzorca blata smo centrifugirali in jo pred osamitvijo dodatno filtrirali skozi filter s porami velikosti 0,45 nm, s čemer smo želeli odstraniti čim več nečistoč, ki bi lahko motile sekvenciranje. Osamitev virusne RNA smo izvedli z dvema zaporednima osamitvima, da bi dobili čimbolj nepoškodovano in čisto virusno RNA. Uspešnost izvedene osamitve smo pred sekvenciranjem preverili s komercialno metodo RT-qPCR in na podlagi primerjave vrednosti Ct potrdili uporabnost takšnega načina osamitve. Merjenje količine osamljene RNA v vzorcu s fluorometrom je potrdilo ustreznost vzorca za nadaljnjo uporabo. Glede priprave vzorcev smo postavili hipotezo, da za sekvenciranje ni potrebno izvesti obogatitve z uporabo oligonukleotidnih začetnikov, kar je bil pogosto uporabljen postopek v drugih raziskavah, izvedenih predvsem v ZDA, kjer so virusu PED najpogosteje določali nukleotidno zaporedje. Res je, da smo uporabili najbolj močno pozitiven vzorec in mu uspešno določili zaporedje nukleotidov celotnega genoma, smo pa s takšnim načinom priprave vzorcev našo hipotezo potrdili. Seveda pa bi bilo smiselno v primeru manjšega števila virusnih kopij v vzorcu najprej uporabiti specifične oligonukleotidne začetnike za pomnoževanje dolgih fragmentov, če bi želeli iz takšnega vzorca uspešno določiti celotni genom virusa PED.

Pripravo knjižnice smo uspešno izvedli s komercialno dostopnimi reagenti, pri čemer smo upoštevali osnovna navodila proizvajalca. Čeprav so komercialno že na razpolago reagenti Ion Torrent različnih proizvajalcev, smo v našem primeru uporabili vse reagente istega proizvajalca; Life Technologies. Določene korake smo pri izvedenem postopku prilagodili glede na količino naše tarčne RNA v vzorcu. Fragmentacija osamljene RNA je prvi korak v postopku priprave knjižnice, katerega rezultat naj bi bili okrog 200 nukleotidov dolgi fragmenti, kar je primerna dolžina za kasnejše sekvenciranje na Ion PGMTM System. Fragmentirano RNA smo po navodilih proizvajalca prečistili in nadaljevali s postopkom hibridizacije z vezavo adapterjev na RNA fragmente. S tem smo poskrbeli, da so vse molekule v knjižnici pripravljene na sekvenciranje s 5' konca. S postopkom reverzne

transkripcije smo iz RNA fragmentov z adapterji pridobili komplementarne enojnovijačne DNA molekule (cDNA), ter jih po navodilih proizvajalca prečistili. Nazadnje smo pripravili označeno knjižnico z barkodami, saj smo tako lahko na isti čip vključili večje število različnih vzorcev. Ker smo pri sekvenciranju na čip naložili poleg našega vzorca PED še pet drugih vzorcev, ki niso vključeni v to raziskavo, smo z uporabo barkodnega označevanja zagotovili preprosto ločevanje odčitanih sekvenc med posameznimi vzorci pri kasnejši analizi podatkov.

Po končani pripravi knjižnice smo njeno ustreznost ovrednotili z uporabo gelske elektroforeze, s katero smo ločili molekule nukleinskih kislin glede na njihovo velikost. Rezultati te meritve so potrdili, da je bila večina odsekov v pripravljene knjižnici velikosti med 100 in 400 nukleotidov, kar je primerna sestava knjižnice za nadaljnje sekvenciranje na Ion PGM™ System sekvenatorju.

Postopek združevanja vzorcev, pomnoževanja in obogatitve knjižnice je potekal avtomatizirano. Na ta način smo dobili ISP z vezanimi matričnimi nukleinskimi kislinami, ki so se na posamezni sferici pomnožili. Tako pripravljene sfere so bile primerne za neposredno nalaganje na Ion 314™ čip.

Pred izvedbo sekvenciranja smo na strežnik, ki je bil povezan z sekvenatorjem, vnesli vse potrebne podatke za sekvenciranje ter določili referenčno zaporedje, na katerega je po koncu sekvenciranja program prilegal posamezna odčitana zaporedja. Kot referenčni sev smo uporabili nemški sev L00721/GER/2014 (LM645057) iz leta 2014 (Stadler in sod., 2015), saj smo glede na epizootiološko situacijo predvidevali, da bo podobnost med slovenskim in nemškim sevom velika. Ta odločitev se je v nadaljevanju pokazala kot ustrezna. Po končanem sekvenciranju smo na strežniku dostopali do rezultatov, kjer so bili na voljo podatki tako o odčitanih zaporedjih za naš vzorec kot o kvaliteti napolnjenosti čipa in sferic z vezanimi matričnimi nukleinskimi kislinami. Posamezne, sekvencirane odseke genoma PED smo še dodatno analizirali s pomočjo spletnega iskalnika BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), računalniškega programa IGV in paketa programov DNASTAR. Na tak način smo sestavili celotno nukleotidno zaporedje slovenskega seva PED SLO/JH-11/2015.

Uspešno smo določili vse bralne okvirje, ki kodirajo posamezne proteine in izvedli filogenetske primerjave genomov posameznih sevov virusa PED, ki so na voljo v podatkovni zbirki GenBank. Ugotovili smo več kot 99% identičnost zaporedja s predhodno ugotovljenimi sevi PED v Evropi in ZDA. Ta podatek potrjuje tudi veliko natančnost uporabljenega postopka. Če bi postopek Ion Torrent sekvenciranja uporabili tudi za določanje zaporedja celih genomov pri sevih, ki se genetsko zelo razlikujejo od dostopnih podatkov v podatkovni zbirki GenBank, bi bila natančnost uporabljenega postopka še veliko pomembnejša. V večini primerov so prav takšni sevi zanimivi za izvedbo filogenetskih in epizootioloških študij. S filogenetsko preiskavo, v katero smo vključili 49 celotnih genomov različnih sevov virusa PED, smo ugotovili, da je sev PED SLO/JH-11/2015 uvrščen v skupino novih S INDEL sevov, katere so pred ugotovitvijo v Sloveniji ugotovili v Nemčiji, Belgiji, Franciji in ZDA. Ta podatek je pričakovan, saj iz nekaterih evropskih držav uvažamo žive prašiče. Ti so bili najverjetneje vir okužbe za slovensko rejo, v kateri smo ugotovili virus PED. Na podlagi razlik v nukleotidnem zaporedju celotnega genoma smo ugotovili, da je bil našemu sevu najbližje, francoski sev FR/001/2014, razlika med njima je znašala 44 nt, sledil je nemški sev L00721/GER/2014 z 49 nt razlike in belgijski sev 15V010/BEL/2015 s 93 nt razlike, ameriški sev OH851 pa se je od slovenskega seva razlikoval kar v 185 nt. Iz rezultatov naše študije bi lahko sklepali, da je najverjetnejši vir okužbe reje, v kateri smo določili celotni genom virusa PED uvoz okuženih prašičev iz istega vira okužbe, kot sta seva PED v podatkovni zbirki GenBank iz Francije ali Nemčije.

Slovenski sev PED SLO/JH-11/2015 je dolg 28.028 nukleotidov, sama organizacija genoma pa ustreza predhodno opisani organizaciji pri belgijskem sevu 15V010/BEL/2015 (Theuns in sod., 2015). V genomu seva PED SLO/JH-11/2015 smo na podlagi predhodnih zaporedij celotnih genomov, dostopnih v podatkovni zbirki GenBank potrdili obstoj šestih bralnih okvirjev: ORF1ab, gen S, gen mp (ORF3), gen E, gen M ter gen N. Bralni okvir ORF1ab se izraža v dveh delih, ORF1a in ORF1b, z -1 ribosomalnim zamikom bralnega okvirja, na poziciji 12.616. V genu za protein S smo odkrili štiri delecije na pozicijah 167, 176-179, 181-189 in 416-418, ter eno, 6 nukleotidov dolgo, insercijo med pozicijama 474 in 475. Te insercije in delecije v proteinu S so značilne za S INDEL seve. Na podlagi tega podatka in uvrstitve na filogenetskem drevesu smo sev PED SLO/JH-11/2015 uvrstili med S INDEL

seve, kar potrjuje že predhodne študije, ki so bile izvedene po Evropi (Grasland in sod., 2015; Stadler in sod., 2015; Theuns in sod., 2015).

Zaporedje celotnega genoma slovenskega seva PED SLO/JH-11/2015 v dolžini 28.028 nt je na voljo v podatkovni zbirki GenBank pod številko KU297956, s tem pa se pridružujemo državam v Evropi, ki so že uspele določiti celotno nukleotidno zaporedje genomom sevov PED, ki so se pojavljali po letu 2014. Celoten genom slovenskega seva PED SLO/JH-11/2015 je bil aprila 2016 objavljen v reviji Genome Announcements in je na voljo v prilogi 2 (Toplak in sod., 2016).

Zaključimo lahko, da smo odgovorili na vse postavljene hipoteze in dosegli vse zastavljene cilje. Uspeli smo v celoti določiti nukleotidno zaporedje celotnemu genomu slovenskega seva SLO/JH-11/2015 z neposredno osamitvijo virusne RNA iz vzorcev blata ter brez uporabe specifičnih oligonukleotidnih začetnikov. Po naših podatkih gre za četrti v celoti sekvenciran genom virusa PED v Evropi ter prvi v celoti sekvenciran virusni genom na področju veterinarske medicine v Sloveniji.

6 SKLEPI

- Potrdili smo, da je osamitev virusne RNA iz vzorcev blata s komercialnim kompletom QIAamp[®] Viral RNA Mini kit in komercialnim reagentom TRIzol[®] primerna metoda za pridobitev virusne nukleinske kisline za metodo NGS.
- Tehnologija sekvenciranja Ion Torrent je primerna metoda za hitro in zanesljivo določitev nukleotidnega zaporedja celotnega genoma brez uporabe specifičnih oligonukleotidnih začetnikov.
- Slovenski sev virusa PED SLO/JH-11/2015 spada med nove S INDEL seve.
- Slovenski sev virusa PED SLO/JH-11/2015 je genetsko soroden preostalim sevom virusa PED, ki po letu 2014 krožijo po Evropi.

7 ZAHVALE

Najprej se iz srca zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Ivanu Toplaku, dr. vet. med., za vso podporo, potrpežljivost, pomoč pri delu in pisanju ter izkazano naklonjenost, zaradi česar so bili moji prvi koraki na področju raziskovanja tako prijetni.

Zahvaljujem se tudi asist-razisk. dr. Urški Kuhar dr. vet. med., asist. dr. Darji Kušar, univ. dipl. biol., Bojanu Papiću, dr. Danijeli Rihtarič, dr. vet. med. ter vsem ostalim, ki so sodelovali pri izvedbi naše raziskave in mi bili s tem v veliko pomoč. Želela bi se zahvaliti dr. Simonu Korenu, univ. dipl. biokem. in dr. Nataši Toplak, univ. dipl. biol. iz podjetja Omega d.o.o., za izkazano dobro voljo, mnoga pojasnila ter možnost, da smo del meritev izvedli v njihovem laboratoriju.

Hvala veterinarju Tončku Giderju za odvzem vzorcev blata v pozitivni reji in posredovanje podatkov o datumu vzorčenja.

Posebej bi se želela zahvaliti prof. dr. Jožetu Gromu, dr. vet. med., ki je v meni videl potencial in me usmeril na pot raziskovanja, ter mi namenil veliko spodbudnih besed v trenutkih, ko sem to najbolj potrebovala.

Prav tako gre zahvala tudi prijatelju Juretu za vso pomoč pri prevodih, kolegom in prijateljem, ki so vedno verjeli vame in seveda družini, ki mi vedno brezpogojno stoji ob strani in omogoča, da sledim svojim sanjam.

Nenazadnje bi se želela zahvaliti tudi Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani, brez katere izvedba te naloge ne bi bila mogoča.

Iz srca hvala!

8 LITERATURA

Al Tawfiq JA, Memish ZA. Middle East respiratory syndrome coronavirus: epidemiology and disease control measures. *Infect Drug Resist* 2014; 7: 281–7.

Alborali GL, Boniotti B, Lavazza A. Surveillance and control of PED coronavirus in pig in Italy. In: *International Conference on Swine Enteric Diseases, Chicago, USA, 2014*: 18 str.

https://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_dis_spec/swine/downloads/meeting/presentations/24%20-%202020%20-%20Alborali.pdf (24.3.2016)

Bashamboo A, Ledig S, Wieacker P, Achermann JC, Achermann J, McElreavey K. New technologies for the identification of novel genetic markers of disorders of sex development (DSD). *Sex Dev* 2010; 4: 213–24.

Beaudette FR, Hudson CB. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J Am Vet Med Assoc* 1937; 90: 51–60.

Boursnell ME, Brown TD, Foulds IJ, Green PF, Tomley FM, Binns MM. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J Gen Virol* 1987; 68: 57–77.

Bradburne AF. Antigenic relationships amongst coronaviruses. *Arch Gesamte Virusforsch* 1970; 31: 352–64.

Carvajal A, Argüello H, Martínez-Lobo FJ, et al. Porcine epidemic diarrhoea: new insights into an old disease. *Porcine Health Management* 2015; 1: 12 str.

Chasey D, Cartwright SF. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea. *Res Vet Sci* 1978; 25: 255–6.

Cheever FS, Daniels JB, Pappenheimer AM, Bailey OT. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. *J Exp Med* 1949; 90: 181–94.

Cheng VC, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 660–94.

Dastjerdi A, Carr J, Ellis RJ, Steinbach F, Williamson S. Porcine epidemic diarrhea virus among farmed pigs, Ukraine. *Emerg Infect Dis* 2015; 12: 2235–7.

Deng F, Ye G, Liu Q et al. Identification and comparison of receptor binding characteristics of the spike protein of two porcine epidemic diarrhea virus strains. *Viruses* 2016; 8: 55.

Dong H, Wang S. Exploring the cancer genome in the era of next-generation sequencing. *Front Med* 2012; 6: 48–55.

Dovichi NJ, Zhang J. How capillary electrophoresis sequenced the human genome. *Angew Chem Int Ed* 2000; 39: 4463–8.

Doyle LP, Hutchings LM. A transmissible gastroenteritis in pigs. *J Am Vet Med Assoc* 1946; 108: 257–9.

Drosten C, Günther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1967–76.

EFSA Panel on Animal Health and Welfare. Scientific Opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging pig deltacoronavirus. *EFSA Journal* 2014; 12: 3: 10. *EFSA J* 2014; 12(10): e3877 (68 str.)

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2014.3877/pdf> (14. 12. 2015)

Espy MJ, Uhl RJ, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 165–256.

Grasland B, Bigault L, Bernard C, et al. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea S gene indel strain isolated in France in December 2014. *Genome Announc* 2015; 3 (3): e00535-15 (2 str.).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4457056/> (6. 11. 2015)

Hamre D, Procknow JJ. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966; 121: 190–3.

Hanke D, Jenckel M, Petrov A, et al. Comparison of porcine epidemic diarrhoe viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerg Inf Dis* 2015; 12 (3): 293 – 6.

http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/3/14-1165_article (22. 3. 2016)

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1986; 6: 986–94.

Hoang H, Killian ML, Madson DM, et al. Full-length genome sequence of a plaque-cloned virulent porcine epidemic diarrhea virus isolate (USA/Iowa/18984/2013) from a Midwestern U.S. swine herd. *Genome Announc* 2013; 1 (6): e01049-13 (2 str.)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3868854/> (7. jul. 2016)

Hung LS. The SARS epidemic in Hong Kong: what lessons have we learned? *J R Soc Med* 2003; 69 (8): 374 –8.

Ion PGM chips: Sequencing chips. Waltham: Thermo Fischer Scientific, 2016.
<http://www.thermofisher.com/search/results?query=ion+pgm+chips&persona=Catalog&navId=10974> (14.6.2016)

Ion Torrent™ Next Generation Sequencing Technology. Waltham, Thermo Fischer Scientific, 2016.

<https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-technology.html> (13.5.2016)

Joshi M, Desphande JD. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *Inte J Biomed Res* 2010; 5: 81–97.

Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhoea virus infection: etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J* 2015; 204: 134–43.

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: the ninth report of the International Comitee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Elsevier, Academy Press, 2012.

Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1953–66.

Kvisgaard LK, Hjulsager CK, Fahnøe U, Breum SØ, Ait-Ali T, Larsen LE. A fast and robust method for full genome sequencing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) type 1 and type 2. *J Virol Methods*, 2013; 193: 697–709.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23891870> (8. jul. 2016)

Kweon C, Kwon B, Jung TS, et al. Isolation of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) in Korea. *Korean J Vet Res* 1993; 33: 249–54.

Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: an emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virol J* 2015; 12: e193 (16 str.).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4687282/> (11.3.2016)

Li BX, Ge JW, Li YJ. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology* 2007; 365: 166–72.

Li W, Li H, Liu Y. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1350–3.

Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: Article ID 251364 (11 str.).

<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/251364/> (11. 3. 2016)

Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ. Performance comparison of bench-top high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 2012; 30: 434–9.

MacLahlan NJ, Dubovi EJ. *Fenner's veterinary virology*, 4th ed. San Diego, Elsevier: Academic Press, 2011: 394–413.

Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem* 2013; 6: 287–303.

Martelli P, Lavazza A, Nigrelli AD, Merialdi G, Alborali LG, Pensaert MB. Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Vet Rec* 2008; 162: 307–10.

McIntosh K, Kapikian AZ, Hardison KA, Hartley JW, Chanock RM. Antigenic relationships among the coronaviruses of man and between human and animal coronaviruses. *J Immunol* 1969; 102: 1109–18.

Merriman B, Rothberg JM. Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis* 2012; 33: 3397 – 417.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.201200424/abstract;jsessionid=85A86B73FF4E00D1AE71BDD38F86B73B.f03t03> (17. 4. 2016)

Metzker ML. Sequencing technology – the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; 11 (1): 31 – 46.

<http://www.nature.com/nrg/journal/v11/n1/full/nrg2626.html> (2. 4. 2016)

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 (Pt 1): 263–73.

Nyrén P, Pettersson B, Uhlén M. Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay. *Anal Biochem* 1993; 208: 171–5.

Oldham J. Letter to the editor. *Pig farming* 1972; (Oct suppl.): 72–3.

Park JE, Shin HJ. Porcine epidemic diarrhea virus infects and replicates in porcine alveolar macrophages. *Virus Res* 2014; 191: 143–52.

Pensaert MB, de Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol* 1978; 58: 243–7.

Pensaert MB, Debouck P, Reynolds DJ. An immunoelectron microscopic and immunofluorescent study on the antigenic relationship between the coronavirus-like agent, CV 777, and several coronaviruses. *Arch Virol* 1981; 68: 45–52.

Prober JM, Trainor GL, Dam RJ. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 1987; 238: 336–41.

Qin E, Zhu Q, Yu M, et al. A complete sequence and comparative analysis of a SARS-associated virus (isolate BJ01). *Chin Sci Bull* 2003; 48: 941–8.

Rahman MT, Uddin MS, Sultana R, Moue A, Setu M. Polymerase chain reaction (PCR): a short review. *Anwer Khan Mod Med Coll J* 2013; 4 (1): 30–6.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463–7.

Schalk AF, Hawn MC. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J Am Vet Med Assoc* 1931; 78: 413–22.

Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1135–45.

SOLiD Next-Generation Sequencing Chemistry. Waltham: Thermo Fischer Scientific, 2016.

<https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/solid-next-generation-sequencing/solid-next-generation-sequencing-systems-reagents-accessories/solid-next-generation-sequencing-chemistry.html> (13.5.2016)

Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 2012; 44: 167–75.

Song D, Moon H, Kang B. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin Exp Vaccine Res* 2015; 4: 166–76.

Srinuntapunt S, Trongwongsa L, Antarasena C, Sangsuwan W, Prommuang P. Porcine epidemic diarrhoea in Trang Province. *J Thai Vet Med Assoc* 1995; 46: 11–9.

Stadler J, Zoels S, Fux R, et al. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. *BMC Vet Res* 2015; 11: 142.

Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, et al. Emergence of porcine epidemic diarrhoea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diag Invest* 2013; 25: 649–54.

Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. *Diseases of swine*. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006: 367–72.

Takahashi K, Okada K, Ohshima K. An outbreak of swine diarrhoea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. *Nihon Juigaku Zasshi* 1983; 45: 829–32.

Theuns S, Conceicao-Neto N, Christiaens I, et al. Complete genome sequence of s porcine epidemic diarrhea virus from a novel outbreak in Belgium, January 2015. *Genome Announc* 2015; 3 (3): e00506-15 (2 str.).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4440965/> (2.4.2015)

Toplak I, Gider T, Barlovič S, Juntas P, Štukelj M. The persistence of the porcine epidemic diarrhea virus on infected finishing pig farm during ten months period. In: Abstracts book, 24th International Pig Veterinary Society Congress (and) 8th European Symposium of Porcine Health Management, Dublin, Ireland, 2016: 512 str.

http://imgpublic.mci-group.com/ie/PCO/IPVS_ESPHM_2016_Book_of_Abstracts.pdf.
(20. 6. 2016)

Toplak I, Ipavec M, Kuhar U, et al. Complete genome sequence of the porcine epidemic diarrhea virus strain SLO/JH-11/2015. *Genome Announc* 2016: 4 (2): e01725-15 (2 str.)

<http://genomea.asm.org/content/4/2/e01725-15.full> (8. 4. 2016)

Toplak I, Štukelj M, Rihtarič D, Hostnik P, Grom J. First detection of porcine epidemic diarrhea virus in Slovenia. In: Changing viruses in a changing world: Montpellier, France, 2015. 10th international veterinary virology, 2015: 178 str.

<http://esvv2015.cirad.fr/program-proceedings/proceedings>. (7. 1. 2016)

Tyrell DA, Bynoe ML. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet* 1966; 1: 76–7.

Van der Wolf PJ, Van Walderen A, Meertens MN, et al. First case of porcine epidemic diarrhoea (PED) caused by a new variant of PED virus in the Netherlands. In: Proceedings of the 7th European Symposium of Porcine Health Management, Nantes. 2015: 79.

VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 2008; 44: 619–26.

Nidovirales. Virus taxonomy: 2015 release. London: International Committee on Virus Taxonomy, 2015.

<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (4.5.2016)

Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem* 2009; 55: 641–58.

Wang L, Byrum B, Zhang Y. New variant of porcine epidemic diarrhoea virus, United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 917–9.

Watson JD, Berry A. DNA: the secret of life. New York: Alfred A. Knopf, 2003; 48–213.

Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171: 737–8.

Wesley RD, Wesley IV, Woods RD. Differentiation between transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus using cDNA probe. *J Vet Diagn Invest* 1991; 3:29–32.

Woo PC, Wang M, Lau SK, et al. Comparative analysis of twelve genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features. *J Virol* 2007; 81: 1574–85.

Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009a; 234: 1117–27.

Woo PC, Lau SK, Lam CS, et al. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. *J Virol* 2009b; 83: 908–17.

Woo PC, Lau SK, Lam CS, et al. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus *Deltacoronavirus* supports bat coronaviruses as the gene source of *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* and avian coronaviruses as the gene source of *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus*. *J Virol* 2012; 86: e3995–4008.

Wood EN. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *Vet Rec* 1977; 100: 243–4.

Xuan HXD, Wang D, Zhu W, Zhao F, Gong H. Study on the culture of porcine epidemic diarrhoea virus adapted to fetal porcine intestine primary cell monolayer. *J Vet Sci* 1984; 4: 202–8.

Zaki AM, Van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 2012; 367: 19.

9 PRILOGE

Priloga 1: Celoten genom seva SLO/JH-11/2015 - izpis iz baze podatkov GenBank (KU297956); Complete genome sequence of the Porcine Epidemic Diarrhoea Strain SLO/JH-11/2015.

Priloga 2: Objavljeni članek iz revije Genome Announcements; Complete genome sequence of the porcine epidemic diarrhea strain SLO/JH-11/2015.