

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**UGOTAVLJANJE RAZŠIRJENOSTI IN DOLOČITEV
CELOTNIH GENOMOV PRAŠIČJIH CIRKOVIRUSOV TIP 2
IN 3 (PCV 2 & PCV 3) PRI POGINJENIH DOMAČIH IN
DIVJIH PRAŠIČIH**

**DETERMINATION OF THE PREVALENCE AND THE
COMPLETE GENOME SEQUENCING PORCINE
CIRCOVIRUSES TYPE 2 AND 3 (PCV 2 & PCV 3) IN DEAD
DOMESTIC PIGS AND WILD BOAR**

Tim Šteferl

Ljubljana, 2021

Dediju Nacetu v spomin (1938–2020)

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 578.2:57.088.2:578.835:575.113:636.4:616-091.1(497.4)(043.2)

**UGOTAVLJANJE RAZŠIRJENOSTI IN DOLOČITEV
CELOTNIH GENOMOV PRAŠIČJIH CIRKOVIRUSOV TIP 2
IN 3 (PCV 2 & PCV 3) PRI POGINJENIH DOMAČIH IN
DIVJIH PRAŠIČIH**

**DETERMINATION OF THE PREVALENCE AND THE
COMPLETE GENOME SEQUENCING PORCINE
CIRCOVIRUSES TYPE 2 AND 3 (PCV 2 & PCV 3) IN DEAD
DOMESTIC PIGS AND WILD BOAR**

Tim Šteferl

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom pod mentorstvomizr. prof. dr. Ivana Toplaka na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2021

POVZETEK

Ključne besede: bolezni prašičev – epidemiologija; cirkovirusne okužbe – virologija; cirkovirus – genetika – klasifikacija; verižna reakcija s polimerazo – metode; virusni genom; zaporedje aminokislin; zaporedje baz; filogeneza; prašiči, Slovenija

Raziskavo ugotavljanja prevalence prašičjih cirkovirusov tip 2 in 3 (PCV 2 in PCV 3) smo pri prašičih v Sloveniji izvedli na vzorcih 88 poginjenih domačih in 43 poginjenih divjih prašičev. Vzorce smo na prisotnost nukleinskih kislin PCV 2 in PCV 3 preiskali z metodo PCR v realnem času. PCV 2 smo dokazali pri 68,2 % domačih in 18,6 % divjih prašičih, prisotnost PCV 3 pri 22,7 % domačih in 34,9 % divjih prašičih, sočasno okužbo s PCV 2 in PCV 3 pa smo ugotovili pri 15,9 % domačih in 18,6 % divjih prašičih. Tridesetim testiranim vzorcem smo določili tudi število kopij virusnega genoma PCV 2 in PCV 3. Število kopij PCV 2 v vzorcih je bilo od 168,3 do 431.300.000, število kopij PCV 3 pa od 7,20 do 12.910. Štirim pozitivnim vzorcem PCV 2 in dvema pozitivnima vzorcema PCV 3 smo določili nukleotidno zaporedje celotnega genoma. Primerjava nukleotidnega zaporedja celotnih genomov PCV 2 je pokazala od 96,0 do 99,8 % identičnost, primerjava nukleotidnega zaporedja celotnih genomov PCV 3 pa 99,0 % identičnost nukleotidnega zaporedja med tipiziranimi sevi v Sloveniji. Ugotovljene seve PCV 2 smo uvrstili v genotipa PCV 2b in PCV 2d, ugotovljena seva PCV 3 pa v genotip PCV 3a. V raziskavi smo ugotovili, da sta PCV 2 in PCV 3 močno razširjena med domačimi in divjimi prašiči v Sloveniji. Nukleotidna zaporedja tipiziranih slovenskih sevov PCV 2 in PCV 3 so podobna tistim, ki so jih ugotovili v tujini. V raziskavi smo prvič določili nukleotidno zaporedje celotnih genomov sevov PCV 2 in PCV 3, ugotovljenim med domačimi in divjimi prašiči v Sloveniji.

SUMMARY

Keywords: Swine diseases – epidemiology; circoviridae infections – virology; circovirus – genetics – classification; polymerase chain reaction – methods; genome, viral, aminoacid sequence; base sequence; phylogeny; swine; Slovenia.

In this study we determined the prevalence of porcine circoviruses 2 and 3 (PCV 2 & PCV 3) in samples of 88 dead domestic pigs and 43 dead wild boar in Slovenia. Samples were examined for the presence of PCV 2 and PCV 3 nucleic acid using real time PCR. Nucleic acid of PCV 2 was detected in 68,2 % samples of domestic pigs and 18,6 % samples of wild boar, whereas the nucleic acid of PCV 3 was detected in 22,7 % samples of domestic pigs and 34,9 % samples of wild boar. In 30 samples the viral load of PCV 2 and PCV 3 was quantified. The number of genome copies was ranged from 168,3 to 431.300.000 for PCV 2 and from 7,20 to 12.910 for PCV 3. Full genome nucleotide sequences in four PCV 2 and two PCV 3 positive samples were determined. The comparison of full genome sequences showed from 96,0 to 99,8 % nucleotide identity for PCV 2 and 99,0 % nucleotide identity for PCV 3. Slovenian PCV 2 strains were classified into genotypes PCV 2b and PCV 2d and PCV 3 strains were classified into genotype PCV 3a. In the study it was determined that PCV 2 and PCV 3 are widespread in domestic pigs and wild boar in Slovenia. Slovenian PCV 2 and PCV 3 strains are similar to those from abroad. In this study, the complete genome nucleotide sequence of PCV 2 and PCV 3 was determined for the first time from positive samples of domestic pigs and wild boar in Slovenia.

KAZALO

1	UVOD.....	1
1.1	OPREDELITEV PROBLEMA	2
1.2	CILJI RAZISKOVANJA	2
1.3	DELOVNE HIPOTEZE	3
2	PREGLED LITERATURE	4
2.1	PRVA ODKRITJA CIRKOVIRUSOV.....	4
2.1.1	Prvi opisi prašičjih cirkovirusov	4
2.1.2	Cirkovirusi pri drugih živalskih vrstah in ljudeh.....	5
2.1.3	PCV 1 in PCV 2 kot kontaminanta v humanem rotavirusnem cepivu	7
2.1.4	Pomen prašičjih cirkovirusov pri ksenotransplantacijah.....	8
2.2	KLASIFIKACIJA CIRKOVIRUSOV	9
2.3	GENOM PRAŠIČJIH CIRKOVIRUSOV	12
2.4	EPIZOOTIOLOGIJA PRAŠIČJIH CIRKOVIRUSOV	14
2.5	SOČASNE OKUŽBE Z DRUGIMI PATOGENI.....	15
2.6	CEPLJENJE PRAŠIČEV PROTI PRAŠIČJIM CIRKOVIRUSOM.....	16
2.7	PATOGENEZA OKUŽBE S PRAŠIČJIMI CIRKOVIRUSI	17
2.8	KLINIČNA SLIKA OKUŽBE S PCV 2 IN PCV 3.....	18
2.8.1	Sistemska bolezen (PCV-SD, PMWS)	18
2.8.2	Sindrom dermatitisa in nefropatije (PDNS).....	18
2.8.3	Pljučna bolezen	19
2.8.4	Enterična bolezen.....	19
2.8.5	Reproduktivna bolezen	19
2.8.6	Subklinična infekcija	19
2.9	PATOMOFORMOLOŠKE SPREMEMBE PO OKUŽBI S PCV 2	20
2.10	DIAGNOSTIČNE METODE.....	21
2.10.1	Klinična diagnostika.....	21
2.10.2	Dokazovanje prisotnosti virusne nukleinske kisline	22
2.10.3	Dokazovanje prisotnosti protiteles	23
2.11	GENOTIPIZACIJA PRAŠIČJIH CIRKOVIRUSOV	24
2.12	STANJE OKUŽB S CIRKOVIRUSI V SLOVENIJI	25
3	MATERIALI IN METODE	27
3.1	MATERIALI	27
3.1.1	Vzorci poginjenih domačih in divjih prašičev	27

3.2	METODE	27
3.2.1	Priprava suspenzije vzorcev	27
3.2.2	Preventivni ukrepi pri delu z vzorci	27
3.2.3	Izolacija nukleinskih kislin z QIAamp Viral RNA kitom	28
3.2.4	Dokaz nukleinskih kislin PCV 2 in PCV 3 z metodo PCR v realnem času.....	29
3.2.5	Kvantifikacija pozitivnih vzorcev PCV 2 in PCV 3	30
3.2.6	Dokaz nukleinske kisline s klasično metodo PCR	30
3.2.7	Določanje nukleotidnega zaporedja.....	33
3.2.8	Analiza celotnih genomov s programom DNASTAR	34
3.2.9	Uporaba programa BLAST na spletnem strežniku NCBI.....	35
3.2.10	Primerjava celotnih genomov s sevi v genski banki	35
3.2.11	Analiza celotnih genomov s programom MEGA	35
4	REZULTATI	36
4.1	REZULTATI PREGLEDA 131 VZORCEV POGINJENIH DOMAČIH IN DIVJIH PRAŠIČEV.....	36
4.2	RAZŠIRJENOST PCV 2 IN PCV 3 MED DOMAČIMI IN DIVJIMI PRAŠIČI PO OBČINAH V SLOVENIJI	43
4.3	DOLOČITEV ŠTEVILA KOPIJ PCV 2 IN PCV 3 V IZBRANIH VZORCIH	46
4.4	POMNOŽEVANJE NUKLEINSKIH KISLIN PCV 2 IN PCV 3 ZA POTREBE SEKVENCIRANJA	47
4.5	DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA ŠTIRIM POZITIVNIM VZORCEM PCV 2.....	49
4.6	DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA DVEH POZITIVNIH VZORCEV PCV 3	51
4.7	MEDSEBOJNA PRIMERJAVA ZAPOREDIJ CELOTNIH GENOMOV PCV 2 IN PCV 3.....	52
4.8	PRIMERJAVA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ PCV 2 IN PCV 3 Z NAJBЛИŽJIMI SEVI IZ GENSKE BANKE.....	55
4.9	DOLOČITEV BRALNIH OKVIRJEV VIRUSOV PCV 2 IN PCV 3.....	59
4.9.1	Bralni okvir ORF 1	59
4.9.2	Bralni okvir ORF 2	60
4.9.3	Bralni okvir ORF 3	61
5	RAZPRAVA	62
6	SKLEPI	70
7	ZAHVALE	71
8	LITERATURA.....	72
9	PRILOGE.....	81

KAZALO TABEL

Tabela 1: Klasifikacija rodu Circovirus (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV, 2021)	10
Tabela 2: Primerjava velikosti genoma in kodirajočih proteinov med prašičjimi cirkovirusi .	13
Tabela 3: Nekatera komercialno dostopna cepiva proti PCV 2 in njihove lastnosti	16
Tabela 4: Oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili za sekvenciranje celotnih genomov PCV 2 in PCV 3.	31
Tabela 5: Podatki o 131 testiranih vzorcih domačih in divjih prašičev, ki so bili vključeni v testiranje z metodo PCR v realnem času.	36
Tabela 6: Rezultati preiskav 131 vzorcev na PCV 2 in PCV 3 z metodo PCR v realnem času.	42
Tabela 7: Število kopij virusnih genomov PCV 2 in PCV 3 v preiskanih vzorcih.	46
Tabela 8: Pozitivni vzorci, pri katerih smo dokazali nukleinsko kislino PCV 2 in jih odbrali za sekvenciranje.	47
Tabela 9: Pozitivni vzorci, pri katerih smo dokazali nukleinsko kislino PCV 3 in jih odbrali za sekvenciranje.	48
Tabela 10: Vzorci PCV 2, ki smo jim določili nukleotidno zaporedje celega genoma.....	49
Tabela 11: Vzorci PCV 3, ki smo jim določili nukleotidno zaporedje celega genoma.....	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Organiziranost genoma PCV 3.....	12
Slika 2: Prikaz držav, iz katerih so poročali o prisotnosti PCV 3 do leta 2018.....	15
Slika 3: Razširjenost PCV 2 v Sloveniji.....	44
Slika 4: Razširjenost PCV 3 v Sloveniji.....	45
Slika 5: Prikaz produktov PCR v 1,8 % agaroznem gelu, 6 kandidatnih vzorcev za sekvenciranje	48
Slika 6: Originalni izpis zaporedja prvih 627 nukleotidov za vzorec 1 dobljen z oligonukleotidnim začetnikom PCV2-CBB3, ki smo ga prejeli iz firme MacroGen.....	50
Slika 7: Filogenetsko drevo, izrisano s programom MegAlign (DNASTAR, Lasergene), prikazuje medsebojno primerjavo sorodnosti na podlagi primerjave 1.767 nukleotidov štirih slovenskih sevov PCV 2 in osmih referenčnih sekvenc, ki predstavljajo posamezne PCV 2 genotipe.	53
Slika 8: Prikaz identičnosti 1.767 nukleotidov v % za štiri slovenske seve in osem referenčnih sevov.....	53
Slika 9: Filogenetsko drevo, izrisano s programom MegAlign (DNASTAR, Lasergene), prikazuje medsebojno primerjavo sorodnosti na podlagi primerjave 2.000 nukleotidov dveh slovenskih sevov PCV 2 in dveh referenčnih sekvenc, ki predstavljajo genotipa PCV 3.....	54
Slika 10: Prikaz identičnosti 2.000 nukleotidov v % za dva slovenska seva PCV 3 in dve referenčni sekvenci.	54
Slika 11: Filogenetska primerjava 1.767 nukleotidov štirih slovenskih sevov PCV 2 z najbližjimi sevi iz tujine	57
Slika 12: Filogenetska primerjava 2.000 nukleotidov dveh slovenskih sevov PCV 3 z najbližjimi sevi iz tujine	58

PRILOGE

Priloga 1: Filogenetska primerjava 945 nukleotidov regije ORF 1 štirih slovenskih sevov PCV 2 z najbližjimi sevi iz tujine.....	81
Priloga 2: Filogenetska primerjava 702 do 705 nukleotidov regije ORF 2 štirih slovenskih sevov PCV 2 z najbližjimi sevi iz tujine	82
Priloga 3: Filogenetska primerjava 315 nukleotidov regije ORF 3 štirih slovenskih sevov PCV 2 z najbližjimi sevi iz tujine.....	83
Priloga 4: Filogenetska primerjava 891 nukleotidov regije ORF 1 dveh slovenskih sevov PCV 3 z najbližjimi sevi iz tujine.....	84
Priloga 5: Filogenetska primerjava 645 nukleotidov regije ORF 2 dveh slovenskih sevov PCV 3 z najbližjimi sevi iz tujine.....	85
Priloga 6: Dolžine genomov, odprtih bralnih okvirjev in kodiranih proteinov slovenskih sevov PCV 2 in referenčnih sevov.....	86
Priloga 7: Pregled dolžin genomov, odprtih bralnih okvirjev in kodiranih proteinov slovenskih sevov PCV 3 in referenčnih sevov	87
Priloga 8: Prikaz nukleotidnega zaporedja štirih celotnih genomov PCV 2, ki smo jih določili v okviru izvedene raziskovalne naloge.....	88
Priloga 9: Prikaz nukleotidnega zaporedja dveh celotnih genomov PCV 3, ki smo ju določili v okviru izvedene raziskovalne naloge.....	92

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

aa	aminokislina
BFDV	virus bolezni kljuna in perja; angl. beak and feather disease virus
BLAST	spletni strežnik; angl. Basic Local Allignment Search Tool
bp	bazni par
CD	označevalec pripadnosti; angl. cluster of differentiation
Ct	prag cikla; angl. cycle treshold
dATP	deoksiadenozin trifosfat
dCTP	deoksicitidin trifosfat
dGTP	deoksigvanin trifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dTTP	deoksitimin trifosfat
ELISA	encimsko imunski test
ICTV	mednarodni komite za taksonomsko uvrstitev virusov; angl. International Committee on Taxonomy of Viruses
NCBI	spletni strežnik; angl. National Center for Biotechnology Information
NHP	nečloveški primat; angl. non-human primate
nt	nukleotid
ORF	odprti bralni okvir
ori	začetek replikacije; angl. origin of replication
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PCV	prašičji cirkocirus; angl. porcine circovirus
PCVAD	s cirkovirusi povezana bolezen; angl. porcine circovirus associated disease
PDNS	sindrom dermatitisa in nefropatije

PMWS	sindrom multisistemskega poodstavitvenega hujšanja
PRDC	prašičji respiratorni bolezenski kompleks; angl. porcine respiratory disease complex
PRRS	prašičji respiratorni in reprodukcijski sindrom
RNA	ribonukleinska kislina
RPMI	gojišče; angl. Roswell Park Memorial Institute
SURS	Statistični urad Republike Slovenije
TAE	trisacetat EDTA; angl. tris acetate EDTA
Vero	trajna linija ledvičnih celic afriške zelene opice
VNT	virus nevtralizacijski test

1 UVOD

Prašičereja velja za eno najpomembnejših živinorejskih panog v svetu. Arheološki dokazi kažejo na to, da so prašiče udomaćili pred približno 10.000 leti na področju reke Tigris na Bližnjem vzhodu, v Evropi pa nekoliko pozneje, pred 6.000 do 8.000 leti. Ločeno je bil udomaćen tudi na Kitajskem. Udomaćevanje se je verjetno začelo z rejo mladih pujskov divjih prašičev, ki so zaradi lova izgubili mater. Človek je dokaj hitro spoznal, da je prašič vsejeda žival, ki se relativno hitro razmnožuje. Te njegove biološke lastnosti je uporabil sebi v prid za proizvodnjo hrane, saj omogočajo hitro in poceni prirejo mesa. Po podatkih Organizacije Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO) iz leta 2019 je na svetu približno 850 milijonov domačih prašičev. Po številu prašičev daleč prednjači Ljudska republika Kitajska s 310 milijoni prašičev, sledijo ji Združene države Amerike s 78,7 milijoni, Federativna republika Brazilija s 40,5 milijoni, Kraljevina Španija z 31,2 milijoni in Zvezna republika Nemčija s 26 milijoni prašičev (FAOSTAT, 2021). Čeprav ima Kitajska največjo čredo prašičev na svetu, je neto uvoznica, kar pomeni, da uvozi več prašičev, kot jih izvozi. Za največje izvoznice prašičev veljajo ZDA, Evropska unija in Kanada.

Slovenija je izrazito govedorejska država, takoj na drugem mestu pa je po gospodarski pomembnosti prašičereja. Prašičereja ima v Sloveniji zelo dolgo tradicijo. Že v srednjeveških urbarjih zasledimo, da so morali kmetje zemljiški gospodi plačevati t.i. »svinjski davek« pa tudi žirnino, to je davek na pašo svinj v gozdu. O prašičih na Kranjskem v svoji Slavi vojvodine Kranjske piše tudi Valvasor, prašičereje pa neposredno ne omenja, iz česar lahko sklepamo, da v 17. stoletju prašičereja na Slovenskem ni bila pomembna gospodarska dejavnost. Prevladovala je pašna reja prašičev pri revnejših slojih prebivalstva. Prvi so pričeli pospeševati prašičerejo graščaki z uvozom plemenskih merjascev yorkširske pasme. Prašičereja je na Slovenskem v 19. stoletju začela pridobivati na pomenu, po prvi svetovni vojni pa se je zmanjšala zaradi izgube avstrijskega trga. Po drugi svetovni vojni je slovenska prašičereja doživela razcvet zaradi gradnje velikih prašičjih farm in intenzivne proizvodnje prašičjega mesa. Uvedli so tudi spremljanje plodnosti prašičev in rodovništvo, postavljeni pa so bili tudi temelji moderne selekcije. Slovenska prašičereja je bila zgled intenzivne prašičereje in je predstavljala najrazvitejši del industrije prašičjega mesa v Jugoslaviji. V nekdanji Socialistični federativni republiki Jugoslaviji je Slovenija dosegala približno 80 % samooskrbo s prašičjim mesom (Šalehar, 2013; Grilj, 2016).

Stalež prašičev v Sloveniji je leta 2002 doživel svoj vrh, ko je bilo v Republiki Sloveniji 655.665 prašičev, po vstopu v Evropsko unijo leta 2004 pa beležimo vztrajen padec števila prašičev. Takrat je namreč prišlo do sprostitev omejitev prometa s prašiči in prašičjim mesom, vključno z odpravo karantene za kupljene prašiče. Posledično so se pojavili vnosi nekaterih bolezni, ki so v kombinaciji z nižjimi cenami prašičev in intenzivnejšo prirejo mesa v drugih državah Evropske unije dodobra zatresli temelje slovenske prašičereje. Po podatkih Statističnega urada Republike Slovenije se je število slovenskih prašičev do leta 2019 znižalo na 240.138, delež samooskrbe s prašičjim mesom pa je leta 2018 znašal 38 %. Poraba prašičjega mesa je pri nas večja od domače prireje, zato je Slovenija neto uvoznica. Leta 2018 smo porabili 78.000 ton prašičjega mesa, domača prireja pa je znašala 29.500 ton mesa. Poraba prašičjega mesa je bila v Sloveniji na prebivalca v zadnjem desetletju za petino večja od evropskega povprečja in znaša nekaj manj kot 38 kg na prebivalca. Večina prašičev se v Sloveniji vzredi v Pomurski in Podravske statistični regiji (MKGP, 2021; SURS, 2021).

Prašičerejo vedno spremljajo tudi kužne bolezni, ki tej živinorejski panogi povzročajo nemalo težav. Nekatere bolezni npr. slinavko in parkljevko, bolezen Aujeszkega in klasično prašičjo kugo smo v Sloveniji uspešno zatrli, po drugi strani nam težave povzroča virus prašičjega respiratornega in reprodukcijskega sindroma, ki smo ga v reje zanesli po vstopu v EU leta 2004 (Toplak in sod., 2010). Nedvomno največjo grožnjo svetovni prašičereji povzroča virus afriške prašičje kuge in le vprašanje časa je, kdaj bomo bolezen potrdili tudi v Sloveniji. Med ekonomsko najbolj pomembne spadajo tudi okužbe s prašičjim cirkovirusom 2 (PCV 2), v zadnjih letih iz držav poročajo o prisotnosti okužb s prašičjim cirkovirusom 3 (PCV 3), nedavno tudi PCV 4, katerih patogeneza še ni razjasnjena.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

V Sloveniji so bile v preteklosti raziskave s področja prisotnosti PCV 1 in PCV 2 že opravljene, vendar so podatki v zadnjih letih skopi. Ker iz drugih držav poročajo o prisotnosti PCV 2 in novejšega PCV 3, je tudi v Sloveniji smiselno osvežiti podatke ter ponovno preučiti prisotnost in razširjenost PCV 2 in PCV 3 pri domačih in divjih prašičih.

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

Cilji raziskovanja so bili dokazati prisotnost in razširjenost PCV 2 in PCV 3 pri domačih in divjih prašičih v Sloveniji. Prisotnost nukleinske kisline PCV 2 in PCV 3 smo dokazovali z

metodo PCR v realnem času. Izbranim vzorcem smo posebej za PCV 2 in PCV 3 določili celotno nukleotidno zaporedje in jih primerjali z najbližjimi zaporedji v genski banki ter jih ustrezno tipizirali. Izbranim vzorcem smo s kvantifikacijo določili količino PCV 2 in PCV 3.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Pri domačih in divjih prašičih v Sloveniji so prisotne okužbe s PCV 2 in PCV 3.
- Prisotnost PCV 2 in PCV 3 je v Sloveniji geografsko razpršena.
- Ugotovljeni sevi PCV 2 in PCV 3 v Sloveniji so genetsko podobni ostalim sevom v genski banki.
- V pozitivnih vzorcih se količina virusa PCV 2 in PCV 3 razlikuje.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 PRVA ODKRITJA CIRKOVIRUSOV

Večino, kar danes vemo o cirkovirusih, izvira iz raziskav s področja veterinarske medicine, saj cirkovirusi predvsem pri pticah in prašičih povzročajo težja obolenja. Cirkovirus tip 1 (PCV 1) so odkrili leta 1974 kot kontaminanta celične linije PK-15 (Tischer in sod., 1974). Do leta 2010 so prašiči veljali za edine sesalce, ki jih cirkovirusi prizadanejo, najbolj raznovrstni v tej družini virusov pa so cirkovirusi ptic (Rosario in sod., 2017). Od leta 1974 do danes so odkrili številne cirkoviruse pri različnih živalih, v prihodnosti pa lahko pričakujemo, da bodo odkriti še novi.

2.1.1 Prvi opisi prašičjih cirkovirusov

PCV 1 so odkrili leta 1974 kot kontaminanta celične linije PK-15 ATCC CCL-33 (Tischer in sod., 1974). Ugotovili so, da so celične linije prašičjih ledvic kronično okužene z majhnimi virusi, za katere so sprva domnevali, da vsebujejo molekulo RNA. Najbolj verjeten rezervoar virusa so prašiči, saj so protitelesa proti PCV 1 našli v 20 od 22 naključno izbranih prašičjih serumov. V serumih naključno izbranih kuncev, miši, telet in ljudi, vključno s serumi laboratorijskih delavcev, ki so rokovali z okuženimi celičnimi linijami, niso ugotovili protiteles proti PCV 1. Pod elektronskim mikroskopom so opazili krožne molekule, zaradi česar so novo odkriti virus poimenovali cirkovirus (Tischer in sod., 1982).

Leta 1991 so v Kanadi prvič opisali primer sindroma poodstavitvenega hujšanja (angl. Post-weaning multisystemic wasting syndrome – PMWS) v čredi s plemenskimi svinjami (Ellis in sod. 1998). Leta 1995 so na farmi s 600 plemenskimi svinjami so opazili visoko smrtnost odstavljenecv med 3. in 8. tednom starosti. Pri obolelih odstavljenecih so ugotovili prisotnost znakov hujšanja, tahipneje, dispneje, bledice, povečanih bezgavk in zlatenice. Antibiotična terapija se ni izkazala za uspešno, večina bolnih odstavljenecv je poginila ali pa so jih evtanazirali 3 do 4 tedne po pojavu kliničnih znakov (Harding in sod., 1998). Proti koncu devetdesetih let prejšnjega stoletja so v tkivih prašičev s PMWS dokazali prisotnost cirkovirusa in tako dokazali povezavo med virusnimi partikli in PMWS (Ellis in sod., 1998; Allan in sod., 1998). S kasnejšim sekvenciranjem in filogenetskimi analizami so novo odkriti virus poimenovali PCV 2, da bi ga razlikovali od PCV 1. S primerjavo sekvenc celotnih genomov PCV 1 in PCV 2 se je izkazalo, da si delita zgolj 75 % identičnosti zaporedja nukleotidov (Fenaux in sod., 2000). Leta 2008 so v Nemčiji retrospektivno preiskali vzorce tkiv poginulih

prašičev, poslanih na patološko sekcijo med leti 1961 in 1998, ter DNA PCV 2 dokazali že v vzorcu iz leta 1962 (Jacobsen in sod., 2009), kar predstavlja tudi najstarejši potrjen primer PCV 2 na svetu. Okužbe z virusom PCV 2 so prisotne po celem svetu in PCV 2 velja za enega izmed ekonomsko najpomembnejših patogenov v svetovni prašičereji (Opreissnig in Langohr, 2013).

Leta 2015 so na prašičji farmi v Severni Karolini v ZDA opazili povečano smrtnost in znižano oploditveno sposobnost pri svinjah s kliničnimi znaki značilnimi za prašičji sindrom dermatitisa in odpovedi ledvic (angl. Porcine dermatitis nephropathy syndrome, PDNS), vendar prisotnosti PCV 2 niso ugotovili (Palinski in sod., 2016). V vzorcih tkiv abortiranih prašičjih fetusov in poginulih svinj s kliničnimi znaki PDNS so z metodo sekvenciranja naslednje generacije (NGS) ugotovili neznano zaporedje, ki se je le delno ujemalo z znanimi cirkovirusnimi genomi (Palinski in sod., 2016). S sekvenciranjem po Sangerju so določili krožni genom, dolžine 2.000 nukleotidov, s preiskavo ORF pa so identificirali tri kodirajoče regije (angl. open reading frame – ORF), ki so kodirale proteine, daljše od 200 aminokislin (Palinski in sod., 2016). Primerjave sekvenc med novim prašičjim cirkovirusom in PCV 1 ter PCV 2 so pokazale samo 31 do 48 % identičnost v aminokislinskem zaporedju in izkazalo se je, da je PCV 3 popolnoma nov, prej neznan virus. PCV 3 so do danes potrdili v mnogih državah, kar nakazuje, da je že razširjen po celem svetu (Ouyang in sod., 2019a).

Leta 2019 so iz klinično bolnih domačih prašičev z znaki PDNS izolirali in molekularno karakterizirali novo vrsto prašičjega cirkovirusa, poimenovanega PCV 4 (Zhang in sod., 2020).

2.1.2 Cirkovirusi pri drugih živalskih vrstah in ljudeh

Cirkovirusi so eni najmanjših poznanih virusov in imajo sposobnost okuževanja različnih vrst živali. Do danes so okužbe s cirkovirusi poleg prašičev potrdili še pri drugih sesalcih, vključno z netopirji, šimpanzi, psi, ljudmi, kamelami in podlasicami. Cirkovirusi so prisotni tudi pri pticah, sladkovodnih ribah in insektih (Rosario in sod., 2017; Opriessnig in sod., 2020).

Cirkovirusne bolezni pri pticah povezujejo z akutnimi in kroničnimi obolenji, ki se klinično izražajo s potrtostjo, drisko, imunosupresijo in spremembami na keratinskih strukturah. Nedvomno najpomembnejša cirkovirusna pri pticah je bolezen kljuna in perja (angl. beak and feather disease, PBFD). Bolezen povzroča virus bolezni kljuna in perja (BFDV) in prizadane večino ptic iz rodu *Psittaciformes*, najpogosteje pa so klinično bolni kakaduji (Martens in sod., 2020). Pri prizadetih pticah pride do izgube perja, abnormalnega razvoja puhastega in odraslega

perja. Kljun je svetleč, hipetrofičen, nalomljen ali nekrotičen, prisotne so lahko delaminacije keratina. Pri živalih je lahko prizadeto samo perje, kljun ali oboje. Za okužene ptice je značilna levkopenija in neregenerativna anemija. Bolezen je progresivna, kar pomeni, da nekatere ptice poginejo takoj po pojavu poškodovanih keratinskih struktur, druge pa lahko živijo še mesece ali leta brez perja. Zaradi perzistentne deplecije levkocitov so živali dovzetne za sekundarne infekcije (MacLachlan in Dubovi, 2011). Vrsto specifične cirkoviruse pri pticah so potrdili tudi pri kanarčkih, racah, ščinkavcih, gosch, galebih, golobih, krokarjih, škorcih, labodih in avstralskem zebrastem ščinkavcu (Rosario in sod., 2017).

Pri sladkovodnih ribah na Madžarskem so cirkoviruse prvič izolirali ob povečanem poginu mladice navadnih mren (*Barbus barbus*). V preiskavi 19 rib iz Donave in ribogojnic ob reki, so pri 8 potrdili cirkovirusno DNA, pri čemer so sekvencirali dva cela virusna genoma, poimenovana BaCV1 in BaCV2 (angl. barbel circovirus 1 in 2). Raziskovalcem ni uspelo dokazati, ali sta BaCV 1 in BaCV 2 tudi dejansko vzrok pogina ribjih mladice (Lorincz in sod., 2011). Pri poginulih somih v Blatnem jezeru so istega leta pri evropskem somu (*Silurus glanis*) odkrili BaCV soroden virus, imenoval CfCV (angl. catfish circovirus). Virus so odkrili pri preiskavi poginulih in umirajočih somov. Pri živalih so opazili spremembe na koži, vnetje gastrointestinalnega trakta in propadanje jeder hematopoetskih celic. Natančna vloga CfCV pri somih še ni pojasnjena, verjetno pa gre za imunosupresiven virus in povzroča razboj bolezni pri somih, sploh v obdobju drstenja (Lorincz in sod., 2012).

Cirkoviruse so potrdili tudi pri netopirjih, šimpanzih in psih (Rosario in sod., 2017). Iz vzorcev človeškega blata so izolirani cirkularni virusni genomi, podobni cirkovirusom pri ptičih in prašičih. Prisotnost genoma prašičjih cirkovirusov v blatu ljudi je verjetno posledica uživanja svinjskega mesa (Li in sod., 2010).

2.1.3 PCV 1 in PCV 2 kot kontaminanta v humanem rotavirusnem cepivu

Okužbe z rotavirusom A globalno predstavljajo vodilni etiološki dejavnik akutnih gastroenteritisov pri otrocih, mlajših od 5 let in so razlog za 5 % vseh smrti otrok v tej starostni skupini (Dennehy, 2015). Cepivi Rotarix in RotaTeq se po celem svetu uporabljata za zmanjševanje obolevnosti in smrtnosti za rotavirusom. V obeh primerih gre za atenuirani cepivi, ki sta visoko učinkoviti v razvitih državah in srednje učinkoviti v državah v razvoju (Esona in sod., 2014).

Prvič so virusni genom PCV 1 odkrili v cepivu Rotarix, kjer so v 41,6 % izoliranih genomskih sekvenc iz cepiva Rotarix ugotovili ujemanje s PCV 1 (Victoria in sod., 2010). Ker se pri izdelavi cepiva Rotarix uporabljajo mediji brez seruma, so kot možen vir kontaminacije navedli tripsin, pridobljen iz prašičjih trebušnih slinavk, ki so ga uporabljali pri obdelavi Vero celičnih linij ob pripravi novih pasaž. Po kontaminaciji s PCV 1 so bile Vero celice verjetno stalno okužene. V rotavirusnem cepivu RotaTeq so le nekaj mesecev kasneje potrdili prisotnost nizkih koncentracij DNA PCV 1 in PCV 2 (McClenahan in sod., 2011; Gilliland in sod., 2012).

Pri laboratorijskih testiranjih cepiv Rotarix in RotaTeq so ugotovili, da cepivo Rotarix vsebuje cele ali skoraj cele genome PCV 1 in da je PCV 1 v cepivu infektiven, cepivo RotaTeq je vsebovalo zgolj dele genomov PCV 1 in PCV 2, infektivnih cirkovirusov pa niso zaznali (McClenahan in sod., 2011).

Po odkritju PCV 1 in PCV 2 v omenjenih rotavirusnih cepivih, so se pojavile skrbi o njihovi varnosti. PCV 1 in PCV 2 ne povzročata okužbe ali bolezni pri ljudeh, vendar smo ljudje virusoma izpostavljeni preko konzumiranja svinjskega mesa ali vdihavanja virusnih delcev iz prašičjih iztrebkov. PCV 1 in PCV 2 so pogosto potrdili v vzorcih človeškega blata, ki je verjetno posledica uživanja okuženega svinjskega mesa. Ljudje ne razvijemo specifičnih protiteles proti prašičjim cirkovirusom, zato se v humanih celicah verjetno ne morejo razmnoževati (Victoria in sod., 2010).

Pri otrocih, cepljenih s cepivom RotaTeq, so potrdili prisotnost PCV 2 DNA v vzorcih blata. Kljub temu, da so PCV 2 DNA v blatu potrdili z metodo PCR v realnem času (qPCR), jim ni uspelo pridobiti nukleotidnih zaporedij s klasičnim PCR za potrebe sekvenciranja, to pomeni, da je PCV 2 DNA v blatu prisotna v majhnih fragmentih ali v zelo nizkih koncentracijah. Iz

nepopolnih nukleotidnih zaporedij PCV 2 DNA sledi, da blato cepljenih otrok ne vsebuje infektivnih delcev (Esona in sod., 2014).

2.1.4 Pomen prašičjih cirkovirusov pri ksenotransplantacijah

Ksenotransplantacija pomeni vsak postopek transplantacije, implantacije ali infuzije živih živalskih celic, tkiv ali organov v človeka ali človeških telesnih tekočin, celic, tkiv ali organov, ki so bili poprej v *ex vivo* stiku z živalskimi celicami, tkivi ali organi. Postopek so prvič izvedli leta 1667 pri poskusu ksenotransfuzije krvi iz jagnjet v človeka (Lu in sod., 2020).

Nečloveški primati (angl. non-human primates, NHP) so človeku filogenetsko in evolucijsko najbližje, zato so dolgo potekale raziskave potencialnih ksenotransplantacij ledvic, srca in jeter (Lu in sod., 2020). Zaradi etičnih razlogov, verjetnosti medvrstnega prenosa infekcijskih bolezni, težavnosti vzreje in razlik v velikosti organov, NHP niso primeri donorji ksenotransplantatov.

Za najbolj primerne živali za potrebe ksenotransplantacije veljajo prašiči. Zaradi velikega števila pujskov v leglu, kratke dobe rasti, velikosti in fiziološke podobnosti ljudem ter majhne verjetnosti ksenozoonoz trenutno veljajo za najbolj primerno kandidatno vrsto. Po drugi strani pa velika genetska razlika med prašiči in ljudmi predstavlja oviro, saj se pojavlja težja in hujša zavrnitvena reakcija pri vaskulariziranih organih (Lu in sod., 2020).

S PCV 1 in PCV 2 so eksperimentalno okužili humane celične linije. Pri tem so okužbo s PCV 1 opazili v humanih celičnih linijah 293, HeLa in Chang jetrnih celicah, okužbo s PCV 2 pa zgolj v Rd celicah. PCV 1 v okuženih celicah ni povzročal strukturnih sprememb, PCV 2 pa v okuženih celicah povzroča citopatski efekt. Poleg celičnih linij so za okužbo s PCV 1 dovzetni tudi humani levkociti, v katerih prihaja do morfoloških sprememb, kar pomeni, da je PCV 1 lahko patogen. Kljub temu, da PCV 1 in PCV 2 lahko vstopita v človeške celice, se virus v njih ne more razmnoževati (Denner in Mankertz, 2017).

Okužbo s PCV 3 so potrdili v čredi genetsko spremenjenih prašičev, vzrejenih posebno za namen ksenotransplantacije. Srca PCV 3 pozitivnih prašičev so presadili v pavijane, po presaditvi pa je bil PCV 3 dokazan v presajenem prašičjem srcu in vseh organih pavijana prejelnika, največjo koncentracijo PCV 3 so dokazali v jetrih in vranici. Ni jasno, ali je PCV 3 sposoben okužiti pavijanove celice ali pa se PCV 3 iz srca po krvi zgolj prenese do drugih organov (Krüger in sod., 2019).

S PCV 3 so eksperimentalno okužili humane celice 293, vendar po 57 dneh inkubacije niso zaznali PCV 3 DNA, kar pomeni, da PCV 3 ni sposoben okužbe te humane celične linije (Krüger in sod., 2019).

Za potrebe ksenotransplantacij se lahko prašičjim cirkovirusom izognemo s pomočjo posebnih vzrejnih programov. Ti lahko temeljijo na selekciji negativnih živali, cepljenju in izolaciji negativnih živali. PCV 2 se prenaša tudi transplacentarno in preko kolostruma, zato je moč vzrejo PCV negativnih prašičev lahko doseči tudi z odtegnitvijo kolostruma in embriotransferjem (Denner in Mankertz, 2017).

2.2 KLASIFIKACIJA CIRKOVIRUSOV

V družino *Circoviridae* sta uvrščena dva rodova, *Circovirus* in *Cyclovirus*. Zadnja veljavna klasifikacija je objavljena v Rosario in sod. (2017) in je potrjena s strani Mednarodnega komiteja za taksonomijo virusov (ICTV). Klasifikacija temelji na nukleotidnem zaporedju celotnega genoma. Da je nek virus klasificiran v enega izmed dveh rodov, mora izkazovati 80% identičnost nukleotidne sekvence celotnega genoma. Člani obeh rodov se razlikujejo v poziciji sekvence *ori* (*angl. origin of replication*) glede na kodirajoče regije in v dolžini intergenskih regij (Breitbart in sod., 2017; Rosario in sod., 2017).

Viruse iz rodu *Circovirus* so odkrili samo pri vretenčarjih, medtem ko se virusi iz rodu *Cycloviridae* pojavljajo tudi pri nevretenčarjih. Nekdaj je družini *Circoviridae* pripadal tudi rod *Gyrovirus*, ki pa je bil kasneje razvrščen v družino *Anelloviridae* (Rosario in sod., 2017).

Tabela 1: Klasifikacija rodu *Circovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV, 2021).

Table 1: Current classification of the genus *Circovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV, 2021).

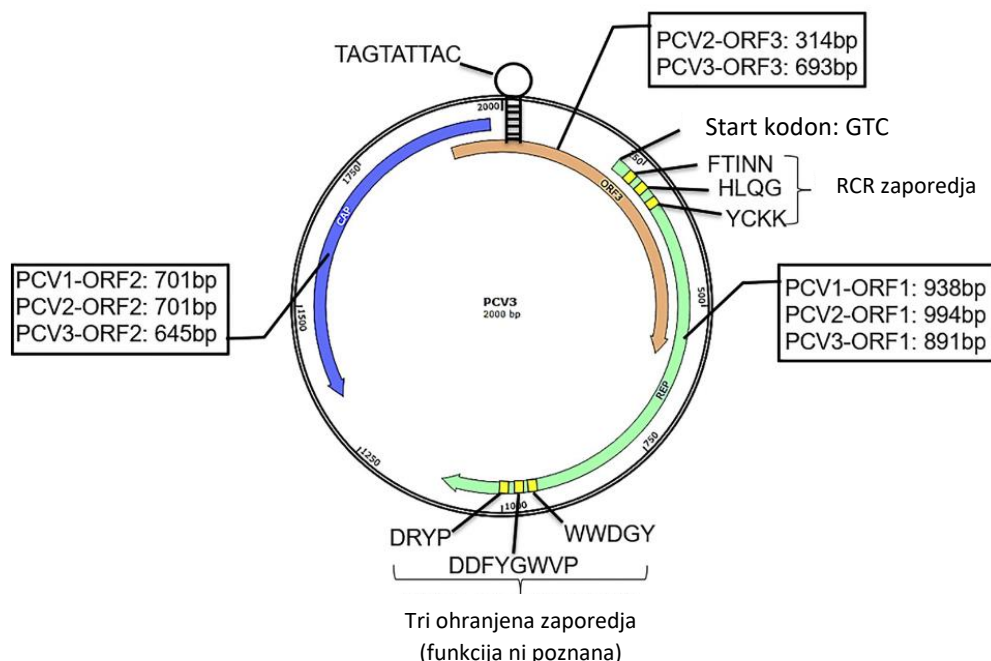
Vrsta	Kratica	Številka v genski banki
Cirkovirus mrene	BarCV	GU799606
Cirkovirus pri netopirjih 1	BatACV-1	JX863737
Cirkovirus pri netopirjih 2	BatACV 2	KC339249
Cirkovirus pri netopirjih 3	BatACV 3	JQ814849
Cirkovirus pri netopirjih 4	BatACV 4	KT783484
Cirkovirus pri netopirjih 5	BatACV 5	KJ641727
Cirkovirus pri netopirjih 6	BataCV 6	KJ641724
Cirkovirus pri netopirjih 7	BatACV 7	KJ641723
Cirkovirus pri netopirjih 8	BatACV 8	KJ641711
Cirkovirus pri netopirjih 9	BatACV 9	KJ641741
Cirkovirus pri netopirjih 10	BatACV 10	KX75686
Cirkovirus pri netopirjih 11	BatACV 11	KX756996
Cirkovirus pri netopirjih 12	BatACV 12	KJ641716
Virus bolezni kljuna in perja	BFDV	AF071878
Cirkovirus kanarčkov	CaCV	AJ301633
Pasji cirkovirus	CanineCV	KC241982
Cirkovirus pri šimpanzih 1	ChimpACV 1	GQ404851
Cirkovirus cibetovk	CivCV	LC416389
Cirkovirus rac	DuCV	DQ100076
Cirkovirus evropskega soma	EcatfishCV	JQ011377
Cirkovirus ščinkavcev	FiCV	DQ845075
Cirkovirus gosi	GoCV	AJ304456
Cirkovirus galebov	GuCV	DQ845074
Cirkovirus pri ljudeh 1	HuACV 1	GQ404856
Cirkovirus minkov	MiCV	KJ020099
Cirkovirus pri netopirjih 1	MosACV1	MH188038
Cirkovirus golobov	PiCV	AF252610

Prašičji cirkovirus 1	PCV 1	AF071879
Prašičji cirkovirus 2	PCV 2	AF027217
Prašičji cirkovirus 3	PCV 3	KT869077
Cirkovirus vran	RaCV	DQ146997
Cirkovirus pri glodalcih 1	RoACV 1	KY370034
Cirkovirus pri glodalcih 2	RoACV 2	KY370042
Cirkovirus pri glodalcih 3	RoACV 3	KY370039
Cirkovirus pri glodalcih 4	RoACV 4	KY370029
Cirkovirus pri glodalcih 5	RoACV 5	KY370027
Cirkovirus pri glodalcih 6	RoACV 6	KY370037
Cirkovirus pri glodalcih 7	RoACV 7	MF497827
Cirkovirus škorcev	StCV	DQ172906
Cirkovirus labodov	SwCV	EU056309
Cirkovirus pri klopih 1	TiACV1	KU230452
Cirkovirus pri klopih 2	TiACV1	KU230452
Cirkovirus avstralske zebrice	ZfiCV	KP793918

2.3 GENOM PRAŠIČJIH CIRKOVIRUSOV

Cirkovirusi spadajo med najmanjše živalske viruse, veliki so od 13 do 25 nm, virion je ikozaedralno simetričen in brez lipidne ovojnice. Genom prašičjih cirkovirusov predstavlja krožna enovijačna (ss) DNA molekula, ki vsebuje tri glavne odprte bralne okvirje (angl. Open reading frame - ORF) in nekaj domnevnih ORF regij. (Klaumann in sod., 2018; Opriessnig in sod., 2020).

Organizacija genoma vseh poznanih prašičjih cirkovirusov je podobna. Začetek replikacije (angl. ori – *origin of replication*) cirkovirusov predstavlja zanka 'NANTATTAC', ki se nahaja na intergenski regiji med ORF 1 in ORF 2 (Rosario in sod. 2012). Zaporedje ori je identično pri PCV 1 in PCV 3 in ga predstavlja zaporedje »TAGTATTAC« (Palinski in sod., 2016), ori PCV 2 predstavlja zaporedje »AAGTATTAC«, (Cheung, 2006), ori PCV 4 pa »CAGTATTAC« (Zhang in sod., 2020).



Slika 1: Organiziranost genoma PCV 3 je podobna organiziranosti PCV 1 in PCV 2, regiji ORF 1 in ORF 2 sta orientirana v obratni smeri. Med njima je zanka, ki vsebuje ohranjeno nukleotidno zaporedje, specifično za posamezen PCV in predstavlja začetek replikacije (origin of replication - ori). PCV 3 gen za Rep protein na 5' koncu vsebuje GTC start kodon in tri RCR motive, FTINN, HLQG IN YCKK. (Ouyang in sod., 2019a).

Figure 1: The arrangement of the PCV 3 genome is similar to those of PCV 1 and PCV 2, ORF 1 and ORF 2 regions are oriented in inverse directions. Between the ORF 1 and 2 regions is a stem-loop, which consists of a

nucleotide sequence, specific for each PCV and represents the origin of replication. PCV 3 Rep gene has a GTC start codon at it's 5' end and three RCR motifs, FTINN, HLQG and YCKK. (Ouyang et al., 2019a).

ORF 1 kodira zapis za proteina Rep in Rep', ki sodelujeta pri začetku pomnoževanja preko mehanizma kotalečega mehanizma pomnoževanja (angl. rolling cycle replication, RCR). ORF 1 velja hkrati za najbolj ohranjeno regijo v genomu prašičjih cirkovirusov (Cheung, 2015; Palinski et al., 2016; Zhang et al., 2020).

ORF 2 kodira zapis za strukturni protein kapside Cap, ki velja za najbolj variabilen in imunogen virusni protein. ORF 2 je orientiran v nasprotni smeri kot ORF 1. Podobnost v nukleotidnem zaporedju Cap proteina med PCV 1 in PCV 2 znaša 67 %. Med PCV 2 in PCV 3 je podobnost med 26 in 37 %, najnižja pa je podobnost med PCV 1 in PCV 3 ter znaša 24 % (Cheung, 2015; Palinski et al., 2016; Klaumann in sod., 2018; Zhang et al., 2020).

ORF 3 kodira nestrukturni protein, ki sodeluje pri apoptozi celice, njegova funkcija je dobro poznana pri PCV 1 in PCV 2 v *in vivo* ter *in vitro* pogojih, pri PCV 3 pa njegova funkcija še ni znana. Regija ORF 3 je pri PCV 2 orientirana v nasprotni smeri kot ORF 1, pri PCV 3 pa je orientirana v isti smeri kot ORF 1 (Cheung, 2015; Palinski in sod., 2016; Klaumann in sod., 2018).

ORF 4 so opisali samo pri genomu PCV 2. ORF 4 ni pomemben za razmnoževanje virusa, verjetno pa vpliva na modulacijo gostiteljevega imunskega odziva prek zmanjšanja delovanja kaspaz in regulacije limfocitov CD 4⁺ in CD 8⁺ (He in sod., 2013).

Tabela 2: Primerjava velikosti genoma in proteinov med prašičjimi cirkovirusi (Opriessnig in sod., 2020).

Table 2: The comparisson of genome length and proteins of porcine circoviruses (Opriessnig et al., 2020).

Virus	Velikost genoma^a	Rep protein^b	Rep' protein^b	Cap protein^b
PCV 1	1758-1760	312	168	230-233
PCV 2	1766-1769	314	297	233-236
PCV 3	1999-2001	296-297	Ni poznano	214
PCV 4	1770	296	Ni poznano	228

^a – število nukleotidov (nt), ^b – število aminokislin (aa),

^a – number of nucleotides (nt), ^b – number of aminoacids (aa)

2.4 EPIZOOTIOLOGIJA PRAŠIČJIH CIRKOVIRUSOV

Od prve ugotovitve prašičjega cirkovirusa leta 1974 v Nemčiji, so do začetka 90-ih let 20. stoletja opravili več seroloških preiskav v Nemčiji, Kanadi, Angliji in ZDA, ki so pokazale, da so cirkovirusi že močno razširjeni med populacijami prašičev v teh državah (Patterson in Opreissnig, 2010). Ker so študije izvedli preden so imeli na voljo teste, ki so omogočali razlikovanje med PCV 1 in PCV 2, točno določen tip PCV ni znan. Od konca 90-ih let imamo na voljo diagnostične teste, s katerimi lahko razlikujemo med PCV 1 in PCV 2. PCV 2 danes velja za splošno razširjenega patogena, kar pomeni, da je prisoten v večini, če ne celo v vseh čredah prašičev po svetu (Baekbo in sod., 2012).

Skupno je poznanih 8 genotipov PCV 2 (Franzo in Segales, 2018). Sprva je med prašiči prevladoval genotip PCV 2a, tega je izpodrinil PCV 2b (Patterson in Opreissnig, 2010), kar pripisujejo masovnemu cepljenju prašičev proti cirkovirozi. Prevlado genotipa PCV 2b nekateri povezujejo tudi z višjo incidenco s prašičjim cirkovirusom povezane bolezni (angl. porcine circovirus associated disease, PCVAD) in težjim potekom bolezni pri prašičih (Patterson in Opreissnig, 2010). Med letoma 2010 in 2015 je prišlo do drugega premika (angl. shift) prevladujočega genotipa, ko je PCV 2b zamenjal PCV 2d (Xiao in sod., 2015; Franco in Segales, 2018).

O prisotnosti PCV 3 so prvič poročali iz ZDA, od takrat so ga potrdili tudi v več evropskih državah, v Aziji in Južni Ameriki (Klaumann in sod., 2018). DNA PCV 3 so potrdili v slini, nosnih izločkih, fecesu, semenski tekočini in kolostrumu, tako pri zdravih kot bolnih živalih (Klaumann in sod., 2018; Ouyang in sod., 2019a). Čeprav gre za nedavno odkrit virus, so retrospektivne študije pokazale razširjenost PCV 3 že prej (Palinski in sod., 2016), Fu in sod. (2018) ocenjujejo, da PCV 3 med prašiči kroži že vsaj od leta 1966. Domneva se, da se je prašičji cirkovirus 3 razvil iz netopirjega cirkovirusa (Li in sod., 2018).

Genom PCV 3 so dokazali tudi med divjimi prašiči. Med divjimi prašiči so ugotovili višjo prevalenco PCV 3 kot pri domačih prašičih iz česar sklepajo, da divji prašiči predstavljajo rezervoar PCV 3 v naravi (Franzo in sod., 2018; Klaumann in sod., 2019).



Slika 2: Prikaz držav, iz katerih so poročali o prisotnosti PCV 3 do leta 2018 (Klaumann in sod., 2018).

Figure 2: Countries where PCV 3 has been reported until 2018 (Klaumann et al., 2018).

2.5 SOČASNE OKUŽBE Z DRUGIMI PATOGENI

Pri okužbi s PCV 2 glavno tarčo predstavljajo celice imunskega sistema prašiča. Iz tega razloga je sočasna okužba z drugimi patogeni bolj verjetna. V literaturi so ob prisotnosti PCV 2 opisane sočasne okužbe z virusom PRRS, prašičjim parvovirusom, virusom klasične prašičje kuge, virusom prašičje influence, virusom prašičje epidemične driske, prašičjim Torque Teno virusom ter drugimi podtipi PCV 2 (Ouyang in sod., 2019b). Opriessnig in sod. (2004) ugotavljajo, da sočasna okužba s PCV 2 in *Mycoplasma hyopneumoniae* verjetno vpliva na poslabšanje klinične slike PCVAD (angl. porcine circovirus associated disease), podobno velja za sočasno okužbo s PRRS (Harms in sod., 2001) in prašičjim parvovirusom (Allan in sod., 1999).

Pri prašičih, okuženih s PCV 3, so pričakovano dokazali sočasne okužbe z nekaterimi patogeni kot pri prašičih okuženih s PCV 2. Poročajo o sočasni okužbi PCV 2 in virusom PRRS, prašičjim Torque Teno virusom, virusom prašičje epidemične driske, prašičjim parvovirusom in drugimi patogeni mikroorganizmi (Klaumann in sod., 2018; Ouyang in sod., 2019b). Vloga PCV 3 na imunski sistem in vpliv na sočasne infekcije ter na razvoj bolezni zaenkrat še nista razjasnena.

2.6 CEPLJENJE PRAŠIČEV PROTI PRAŠIČJIM CIRKOVIRUSOM

Izbruhe bolezni in ekonomsko škodo, ki jo povzroča PCV 2 lahko omilimo s cepljenjem prašičev. Proti PCV 2 je na voljo pet komercialnih cepiv za uporabo na svinjah in pujskih starejših od dveh oziroma treh tednov. Komercialna cepiva so uspešna pri zniževanju števila viremičnih prašičev in zniževanju količine PCV 2 v krvi okuženih prašičev, količine izločenega virusa v nosnih izločkih, iztrebkih in semenski tekočini, znižana je možnost transplacentarnega prenosa (Chae, 2012). Cepljenje močno zniža incidenco prašičjega multisistemskega poodstavitvenega hujšanja (angl. porcine multisystemic wasting syndrome, PMWS), izboljša prirast prašičev do 18 g/dan v čredah, ki so sočasno okužene z virusom PRRS, prašičjim parvovirusom in *M. hyopneumoniae*. Pri cepljenih svinjah se uspeh umetne osemenitve izboljša za 7 % (Chae, 2012). Zaradi znižanja incidence PMWS se v prihodnje pričakuje zvišana incidenca PRDC, saj cepljeni pujski preživijo do starosti, ko se začnejo pojavljati drugi respiratorni patogeni.

Vsa komercialna cepiva temeljijo na genotipu PCV 2a, navzkrižno zaščito pa nudijo tudi proti genotipu PCV 2b (Chae, 2012). Cepiva proti PCV 2 najverjetneje ne nudijo zaščite proti PCV 3 (Wozniak in sod., 2019).

Tabela 3: Nekatera komercialno dostopna cepiva proti PCV 2 in njihove lastnosti (Chae, 2012).

Table 3: Some of the commercially available vaccines against PCV 2 and their properties (Chae, 2012).

Cepivo	Proizvajalec	Antigen	Kategorija	Doza	Cepljenje
Circovac	Merial	Inaktiviran PCV 2	Svinja, sesni pujski	2 ml; 0,5 ml	5 in 2 tedna pred praritvijo; 3 tedni
Circoflex	Boehringer-Ingelheim	Protein kapside	Sesni pujski	1 ml	2 teden
Circumvent	Merck	Protein kapside	Sesni pujski	2 ml	3 teden
Porcillis PCV	Merck	Protein kapside	Sesni pujski	2 ml	3 teden
Fostera PCV	Pfizer	Himerni PCV 1/2	Sesni pujski	2 ml	3 teden

2.7 PATOGENEZA OKUŽBE S PRAŠIČJIMI CIRKOVIRUSI

PCV 2 primarno prizadane limfoidno tkivo, pri čemer virus povzroči uničenje limfatičnih foliklov, propadlo tkivo pa zamenjajo histioci, kar vodi v imunosupresijo. Med okužbo se zniža število dendritskih celic, limfocitov B, naravnih celic ubijalk, $\gamma\delta$ T celic ter CD4+ in CD8+ limfocitov T, poviša pa se število monocitov in granulocitov (Meng, 2013). V *in vitro* pogojih so ugotovili, da so celice monocitno-makrofagnega sistema perzistentno okužene s PCV 2 in verjetno služijo za prenos virusa po gostitelju. (Segales in sod., 2012a).

PDNS je posledica nalaganja imunskih kompleksov v tkivih, kjer sprožijo akutno vnetje in poškodbo žilne stene in ledvičnega glomerula (Drolet in sod., 1999). Pri prašičjih fetusih, okuženih *in utero*, so za PCV 2 dovzetni miokardiociti, hepatociti in celice monocito-makrofagnega sistema (Segales in sod., 2012a).

Patogeneza PCV 3 še ni poznana.

2.8 KLINIČNA SLIKA OKUŽBE S PCV 2 IN PCV 3

PCV 1 ne spada med virusne patogene, saj pri prašičih ne povzroča kliničnih znakov bolezni. PCV 2 je eden najbolj pomembnih patogenov v prašičereji, z njim je povezanih več bolezenskih sindromov, vendar pa velik odstotek okuženih prašičev ne kaže kliničnih znakov. Tudi PCV 3 je povezan s pojavom kliničnih znakov pri prašičih, prav tako je velik odstotek okuženih prašičev brez kliničnih znakov. PCV 4 so prvič izolirali iz prašičev, ki so kazali znake respiratorne in enterične bolezni ter PDNS, ugotovili pa so ga tudi pri zdravih prašičih (Zhang in sod., 2020). Oblike bolezenskih znakov povzemamo po novi predlagani terminologiji kot jo navaja Segales (2012), ponedkod pa so zraven vključeni tudi bolezenski znaki, pri katerih so ugotovili PCV 3.

2.8.1 Sistemska bolezen (PCV-SD, PMWS)

Sistemska bolezen je najpogostejše opisana klinična manifestacija okužbe s PCV 2, znana tudi kot sindrom poodstavitvenega hujšanja (angl. PMWS – *porcine multisystemic wasting syndrome*). Bolezen najpogostejše prizadane odstavljenke med 6. in 14. tednom starosti. Značilni klinični znaki zanjo so kaheksija, bledica, intermitentna driska, dispnea, povečane ingvinalne bezgavke in občasno zlatenica. Obolevnost ponavadi znaša od 4 do 30 %, smrtnost pa od 4 do 20 % (Segales, 2012).

2.8.2 Sindrom dermatitisa in nefropatije (PDNS)

Sindrom dermatitisa in nefropatije (angl. porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS) prizadene sesne, pitovne in plemenske prašiče. Oboleli prašiči so anoreksični in depresivni, lahko z rahlo povišano telesno temperaturo, ležijo na tleh in se s težavo premikajo. Najbolj očiten znak PDNS so rdeče do vijolične makule ali papule na koži, ponavadi na zadnjih nogah in v dimljah, včasih pa po večini kože telesa. Čez čas lezije prekrijejo temne kraste, ki lahko za seboj pustijo brazgotine. Prevalenca PDNS je ponavadi pod 1 %, smrtnost pri prašičih, starejših od 3 mesecev, lahko doseže do 100 %, medtem ko pri mlajših dosega 50 %. Težko obolele živali poginejo nekaj dni po pojavu kliničnih znakov, prebolewniki pa si opomorejo in začnejo pridobivati na teži 7 do 10 dni po pojavu kliničnih znakov (Segales, 2012).

Znake, podobne PDNS so opazili tudi pri 4 in 8 tednov starih SPF (angl. specific pathogen free) prašičih, ki so bili eksperimentalno okuženi s PCV 3. Pri obojih so se pojavili blagi začetni znaki v obliki kašlja, kihanja in driske, tem pa so sledili težji znaki bolezni kot npr. tahipneja,

letargija, koža in uhlji so postali rdeči, multifokalno so po koži ugotavljali prisotne papule ter superficialen dermatitis. Smrtnost je v prvih štirih tednih 40 %, pri osem tedenskih prašičih pa 0 %. Rezultati študije so pokazali, da je PCV 3 sposoben samostojno povzročiti klinično bolezen, kljub temu, pa natančna patogeneza PCV 3 zaenkrat še ni razjasnjena (Jiang in sod., 2019).

2.8.3 Pljučna bolezen

Pri obolelih živalih sta prisotna dihalna stiska in dispnea (Segales, 2012).

Pri prašičih s kliničnimi znaki prašičjega respiratornega bolezenskega kompleksa (angl. porcine respiratory disease complex – PRDC) so ugotovili prisotnost PCV 3. Pri bolnih prašičih so ugotovili višji titer virusa kot pri klinično zdravih živalih (Kedkovid in sod., 2018)

2.8.4 Enterična bolezen

Edini klinični znak obolelih živali je driska (Segales, 2012).

2.8.5 Reproduktivna bolezen

Prašičji cirkovirusi so etiološko povezani s pojavom abortusov v pozni brejosti, mrtvorojenih in mumificiranih pujskov. Reprodukivna bolezen povezana s PCV 2 je v farmskih pogojih redka, saj je v čredah običajno ugotovljena visoka seroprevalenca PCV 2. Klinično najbolj prizadete po vnosu PCV 2 so povečini naivne črede z velikim številom mladic ali v PCV 2 seronegativnih čredah (Segales, 2012).

Pri svinjah, pri katerih so prvič ugotovili PCV 3, so opazili znižano oploditveno sposobnost (Palinski in sod., 2016). V primerjalni študiji med zdravimi svinjami in svinjami s kroničnimi reprodukivnimi sposobnostmi je bil odstotek PCV 3 pozitivnih višji pri bolnih svinjah (Zou in sod., 2018).

2.8.6 Subklinična infekcija

Gre za najpogostejšo obliko poteka okužbe s PCV 2, pri katerem okuženi prašiči ne kažejo očitnih kliničnih znakov obolenja. Opazen je znižan dnevni prirast, s cepljenjem pa lahko izboljšamo proizvodne parametre (Segales, 2012).

2.9 PATOMOFORMOLOŠKE SPREMEMBE PO OKUŽBI S PCV 2

V zgodnji fazi PMWS so najočitnejši klinični znak povečane bezgavke (predvsem ingvinalne superficialne bezgavke), ki kasneje atrofirajo. Histopatološko je opazna deplecija limfocitov in infiltracija z velikimi histiociti in polinuklearnimi celicami. Značilna je tudi atrofija skorje timusa, v dendritskih celicah in histiocitih pa opazimo citoplazemske virusne inkluzije (Segales, 2012a). Na drugih organih lahko opazimo limfohistiocitno ali granulomatozno intersticijsko pneumonijo, intersticijski nefritis, granulomatozni enteritis ter limfohistiocitni hepatitis različne intenzitete. Možnost limfohistiocitnega vnetja je v vseh tkivih (Segales in sod., 2012).

Najbolj očitna patomorfološka sprememba pri PDNS je sistemski nekrotični vaskulitis, ki se na koži izraža v obliki značilnih makul in papul na področju dimelj in zadnjih nog. Prašiči, ki akutno poginejo imajo bilateralno povečane ledvice z drobnimi rdečimi lezijami na površini in edemom ledvičnega meha. Vse to sovпада z fibronekrotičnim glomerulitisom in intersticijskim nefritisom. Pri prašičih, ki so preživeli akutno fazo PDNS je lahko prisoten kronični glomerulonefritis (Segales, 2012). Tudi v tem primeru je značilna deplecija limfocitov (Segales in sod., 2012).

Reprodukтивna oblika bolezni ima za posledico mrtvorojene in slabotne pujske. Pri njih ugotavljamo fibrotični in/ali nekrotični miokarditis, ki se kaže v obliki multifokalnih diskoloracij v miokardu. Posledično opazimo tudi hipertrofijo srca in pasivno kongestijo jeter. Pri fetusih lahko opazimo tudi blago pljučnico (Segales, 2012; Segales in sod., 2012).

Za pljučno obliko bolezni je značilna granulomatozna bronhointersticijska pljučnica, sprememb, značilnih za PMWS pa ni. Pri enterični obliki se pojavi granulomatozni enteritis, opazimo pa lahko tudi limfocitno deplecijo v Payerjevih ploščah, v drugih limfnih tkivih pa ne. Pri subklinični infekciji je prisotna blaga deplecija limfocitov z blagim vnetjem v limfnih tkivih, patomorfološke spremembe lahko povsem izostanejo (Segales in sod., 2012).

2.10 DIAGNOSTIČNE METODE

PCV 2 je splošno razširjen v prašičji populaciji. Ker prašičjih cirkovirusov ne moremo vedno direktno povezati z določenim obolenjem, je pri diagnozi PCVAD zato potrebno upoštevati različne diagnostične kriterije, ki temeljijo na klinični sliki, patohistoloških in laboratorijskih preiskavah (Segales in sod., 2012).

2.10.1 Klinična diagnostika

Za klinično diagnostiko PMWS (PCV-SD) so določeni naslednji kriteriji:

- prisotnost značilnih kliničnih znakov, kot naprimer hiranje, izguba teže, oteženo dihanje, povečane ingvinalne bezgavke, lahko tudi zlatenica.
- prisotnost značilnih patohistoloških sprememb v limfoidnem tkivu
- zmerna do visoka količina PCV 2 v tkivih obolelih prašičev (Segales in sod., 2012)

Diagnozo PMWS v čredi prašičev postavimo na podlagi povečanega pogina in zaostajanja v rasti ter ob prisotnosti zgoraj navedenih kriterijev pri vsaj enem prašiču (Segales in sod., 2012).

Za klinično diagnostiko PDNS sta določena naslednja kriterija:

- prisotnost hemoragičnih in nekrotičnih sprememb na koži, predvsem na zadnjih nogah in perineumu in/ali otekle ledvice s kortikalnimi petehijami.
- prisotnost nekrotičnega vaskulitisa in fibroznega glomerulonefritisa (Segales in sod., 2012).

Dokaz prisotnosti PCV 2 ni pogoj za diagnozo PDNS.

Za klinično diagnostiko reprodukcijskih motenj, povzročenih s PCV 2 so določeni trije kriteriji:

- abortusi v pozni brejosti in mrtvorojeni pujski, pri katerih je lahko občasno prisotna hipertrofija srca
- prisotnost fibroznega ali nekrotičnega miokarditisa
- visoka količina PCV 2 v miokardu in drugih tkivih fetusa

PCV 3 so potrdili pri prašičih s PDNS, respiratornimi, reprodukcijskimi, gastrointestinalnimi in nevrološki obolenji, DNA PCV 3 pa so dokazali tudi pri zdravih živalih (Klaumann in sod., 2018). Ker natančne patogeneze za PCV 3 ne poznamo, zaenkrat ni na voljo natančnih diagnostičnih parametrov.

2.10.2 Dokazovanje prisotnosti virusne nukleinske kisline

Za dokazovanje prisotnosti nukleinske kisline PCV 2 in PCV 3 se najpogosteje uporabljajo metode za pomnoževanje kratkih odsekov virusnega genoma (klasični PCR in PCR v realnem času). Virusno DNA PCV 2 in PCV 3 so dokazali v številnih tkivih pri simptomatskih in asimptomatskih prašičih (Segales in sod., 2012; Ouyang in sod., 2019a). Najpogosteje uporabljena tkiva za dokazovanje DNA PCV 2 in diagnostiko PCVAD so srce, pljuča, jetra, vranica, bezgavke, tonzile (O'Dea, 2008). Na voljo je širok nabor PCR testov za dokazovanje PCV 2 in PCV 3 (Segales in sod., 2012, Ouyang in sod., 2019a). Za dokaz PCV 2 se priporoča uporaba kvantitativnega PCR v realnem času, saj omogoča določitev števila kopij genoma v preiskovanem vzorcu (Opriessnig in sod., 2007).

2.10.2.1 Dokazovanje virusa z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Temelj metode PCR (angl. Polymerase chain reaction) je pomnoževanje specifičnega odseka genoma, katerega s 25 do 40 cikličnimi ponovitvami pomnožimo do nivoja zaznave (Templeton, 1992). Za izvedbo PCR metode potrebujemo izolirano DNA preiskovanega organizma, štiri deoksiribonukleotidfosfate (dATP, dTTP, dGTP in dCTP), oligonukleotidna začetnika (angl. forward in reverse primers), od DNA odvisno polimerazo ter pufer (Remick in sod., 1990).

PCR metoda je sestavljena iz treh glavnih korakov: prvi korak predstavlja denaturacijo DNA (pri 95 °C), kjer pride iz ene dvovijačne molekule DNA do nastanka dveh enovijačnih molekul DNA, drugi korak pomeni prileganje oligonukleotidnih začetnikov na komplementarna zaporedja na genomu (med 45°C in 75 °C), končni korak pa je sinteza komplementarne DNA med obema oligonukleotidnima začetnikoma (med 52 °C in 75 °C) (Saiki in sod., 1988). Pomnoževanje poteka s podaljševanjem oligonukleotidnih začetnikov z dodajanjem novih deoksiribonukleotidfosfatov v smeri 5' – 3', s pomočjo termostabilne DNA polimeraze. Reakcijo ustavimo z ohladitvijo na 4 °C po zadnjem ciklu.

Klasičen PCR izvajamo v avtomatskem pomnoževalniku, ki omogoča natančno vzdrževanje določenih temperatur in hitro prehajanje med prej navedenimi temperaturnimi območji (Saiki in sod., 1988). Metoda PCR je eno izmed ključnih molekularnih orodij, ki se uporablja v raziskavah in diagnostiki s področja mikrobiologije in genetike.

2.10.2.2 Dokazovanje virusa z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR)

Metoda PCR v realnem času (angl. Real-time PCR, qPCR) je nadgrajena kvalitativna in kvantitativna različica klasične PCR metode, ki med pomnoževanjem tarčne DNA podaja informacijo o specifičnosti oziroma o številu kopij, če gre za kvantitativno različico. Ugotavljanje virusne DNA temelji na uporabi oligonukleotidnih začetnikov in lovč (sond), označenih s fluorescenčnimi barvili (MacKay, 2004).

Najpogosteje uporabljene označene lovke so TaqMan oziroma 5' nukleazne sonde (MacKay in sod., 2002). Sonda TaqMan je oligonukleotid z vezanim fluoroflorom na 5' koncu in dušilcem na 3' koncu. Nevezana sonda ne oddaja fluorescenčnega signala, ker je dušilec preblizu fluorofluoru. Če se sonda veže na prilegajoče zaporedje na genomu, pride do podaljševanja oligonukleotidnega začetnika, encim Taq DNA polimeraza hidrolizira sondo in pride do odcepitve fluorofluora. Ker dušilca ni več v bližini, začne oddajati fluorescenčni signal, ki ga lahko izmerimo v posameznem ciklusu (Cockerill in sod., 2003).

Fluorescenco spremljamo z računalniškim programom, kjer se odčitane vrednosti izpišejo v obliku sigmoidne krivulje, ki predstavlja količino nastalega PCR produkta. Ko signal preseže prag zaznavanja, začne krivulja eksponentno rasti, to točko imenujemo vrednost Ct (angl. cycle threshold). Vrednost Ct nam poda informacijo o količini produktov PCR in je obratno sorazmerna začetnemu številu tarčnih kopij iskane DNA. Zaradi omejene količine reagentov se reakcija sčasoma upočasni, fluorescenca pa ne narašča več, zato to zadnjo fazo imenujemo plato faza (MacKay in sod., 2002).

2.10.3 Dokazovanje prisotnosti protiteles

Diagnostika PCVAD z uporabo seroloških metod ni najbolj primerna, saj je serološki profil (prisotnost protiteles) podoben pri klinično bolnih in asimptomatskih prašičih (Segales, 2012a), primerna pa je pri ugotavljanju časa vnosa okužbe v populacijo. Protitelesa proti PCV 2 lahko v populaciji prašičev ugotavljamo z virus nevtralizacijskim testom (VNT), testom ELISA in direktnim imunofluorescenčnim testom (Opriessnig., 2007).

Ker o PCV 3 poročajo iz mnogih držav po svetu, so se razvile tudi hitre in občutljive metode za detekcijo PCV 3. Deng in sod., (2018) so razvili indirektni test ELISA za dokaz virusnega antigena PCV 3 v serumu. Drugi testi za serološko diagnostiko PCV 3 so še v razvoju.

2.11 GENOTIPIZACIJA PRAŠIČJIH CIRKOVIRUSOV

PCV 1 izkazuje nizko genetsko raznolikost, prav tako je zanj značilno majhno število mutacij (Cortey in Segales, 2012). Prav nasprotno velja za PCV 2. Leta 2008 so na podlagi filogenetske primerjave ORF 2 regije virusnega genoma predlagani trije genotipi: PCV 2a, PCV 2b in PCV 2c. Seve PCV 2 so razvrstili glede na razmerje različnih nukleotidov v ORF 2 regiji med dvema sekvencama z upoštevanjem »cut off« vrednosti 0,0035. Za prototipne sekvence posameznih genotipov so določili prve vnešene sekvence v genski banki, ki so dostopne pod številkami AF055392 za PCV 2a, AF055394 za PCV 2b in EU148503 za PCV 2c. Med PCV 2c so uvrščene samo tri sekvence z Danske, zaznane v arhivskih vzorcih iz 80-ih let (Segales in sod., 2008). Sčasoma se je število znanih genotipov PCV 2 vztrajno povečevalo. Guo in sodelavci (2010) so na Kitajskem določili nov genotip PCV 2d, Davies in sodelavci (2016) pa so v ZDA identificirali nove seve PCV 2 in jih poimenovali PCV 2e, Bao in sodelavci (2018) pa so poročali o sekvencah, ki jih ni bilo moč uvrstiti v nobenega od prej navedenih genotipov, zato so to novo klado poimenovali PCV 2f.

Leta 2015 so Xiao in sodelavci na podlagi 1680 ORF 2 sekvenc seve uvrstili v štiri glavne genotipe: PCV 2a, PCV 2b, PCV 2c in PCV 2d ter tri vmesne klade (angl. IC – intermediate clades). Po trenutno veljavni klasifikaciji, ki sta jo predlagala Franzo in Segales (2018) je poznanih 8 genotipov PCV 2: PCV 2a, PCV 2b, PCV 2c, PCV 2d, PCV 2e, PCV 2f, PCV 2g in PCV 2h. Kriteriji, po katerih so določili posamezne genotipe so: vsaj 13 % razlike v nukleotidnem zaporedju v ORF 2 regiji genoma, z več kot 70 % statistično podporo v filogenetskem drevesu, k vsakemu genotipu pa mora spadati vsaj 15 sevov. Namen te klasifikacije je bil vzpostaviti »skupen jezik« za prihodnje študije, vendar avtorja opozarjata, da bo potrebno v prihodnje genotipizaciji posvečati več pozornosti, da bo dosežena homogena klasifikacija PCV 2 po svetu.

PCV 3 imajo primerjavi s PCV 2 nižjo genetsko raznolikost. Z uporabo različnih filogenetskih algoritmov so določili dva genotipa PCV 3, PCV 3a in PCV 3b (Franzo, 2018; Fux in sod., 2018; Li in sod., 2018). Li in sodelavci so genotip PCV 3a nadaljne razdelili še na podtipa PCV 3a-1 in PCV 3a-2, nekaj sevov pa uvrstili v vmesno klado PCV 3a-IM. Fu in sodelavci (2017) pa na podlagi dveh aminokislinskih mutacij na proteinu Cap navajajo tri genotipe PCV 3a, PCV 3b in PCV 3c, pri čemer genotip PCV 3a nadaljne razdelijo na podtipa PCV 3a1, PCV3a2 in PCV 3a3.

Franzo in sodelavci (2020) so nedavno predlagali nove kriterije za klasifikacijo PCV 3, pri čemer so se zgledovali na njihovo klasifikacijo PCV 2 (Franzo in Segales, 2018). Kriteriji temeljijo na več kot 70 % statistični podpori v filogenetskem drevesu, največ 3 % razlike v nukleotidnem zaporedju celega genoma ali največ 6 % razlike v nukleotidnem zaporedju regije ORF 2, vsaka klada pa naj vsebuje vsaj 5 sekvenc, kar predstavlja približno 1 % analiziranih PCV 3 sevov. Na podlagi omenjenih kriterijev so seve PCV 3 razdelili v dve kladi. Prvo klado so uradno poimenovali PCV 3a, medtem ko so v drugo klado uvrstili zgolj dve sekvenci, kar pa ne ustreza omenjenim kriterijem za klasifikacijo. Druga klada bi lahko bila v prihodnosti uradno priznana kot PCV 3b, v kolikor bo vanjo uvrščenih več sekvenc.

2.12 STANJE OKUŽB S CIRKOVIRUSI V SLOVENIJI

V Sloveniji smo prve klinične primere PMWS opisani leta 1999, PCV 2 pa so dokazali z metodo multiplex PCR prvič pri 22 domačih (Toplak in sod., 2002) in 8 divjih prašičih (Toplak in sod., 2004). Podatki o okužbah s PCV 2 so v zadnjih letih precej pomanjkljivi.

Toplak in sodelavci (2012) so ugotavljali genetsko variabilnost PCV 2, izoliranih pri domačih in divjih prašičih med letoma 2001 in 2010 v Sloveniji in Srbiji. V primerjavo so vključili 30 srbskih in 17 slovenskih sevov in filogenetsko analizo izvedli na podlagi delnega zaporedja ORF 2 regije, ki se je izkazala kot primerna za ugotavljanje genetske variabilnosti. Večino slovenskih in srbskih sevov so uvrstili v genotip PCV 2b, med sevi pa so ugotovili visoko genetsko podobnost, od 99,1 do 100 %. 6 slovenskih sevov in 1 srbski sev so uvrstili v genotip PCV 2a, med katerimi so ugotovili od 86,7 do 98,8 % identičnost, 1 slovenski in 1 srbski sev pa v genotip PCV 2d. Rezultati študije so pokazali, da je med slovenskimi in srbskimi prašiči prevladoval genotip PCV 2b.

V letu 2019 smo PCV 3 prvič ugotovili tudi v Sloveniji. V Vestniku Veterinarske zbornice smo leta 2020 objavili rezultate preliminarne študije, v kateri smo na prisotnost PCV 2 in PCV 3 z metodo PCR v realnem času preiskali 31 vzorcev domačih in 25 vzorcev divjih prašičev. Prisotnost PCV 2 smo dokazali pri 23 domačih in 3 divjih prašičih, PCV 3 pa pri 9 domačih in 3 divjih prašičih (Šteferl in Toplak, 2020). Plut in sodelavci (2020) so ugotavljali prisotnost PCV 3 pri domačih prašičih na šestih farmah z metodo PCR v realnem času. Preiskali so vzorce ustne tekočine, iztrebkov in seruma ter prisotnost PCV 3 dokazali v 73,5 % preiskanih vzorcih ustne tekočine, 23,5 % preiskanih iztrebkov in 13,1 % preiskanih serumskih vzorcih. Na petih farmah so PCV 3 zaznali pri vseh kategorijah prašičev. Sekvencirali so 15 delnih genomov v

regiji Rep (255 nt) in ugotovili 99,5 % podobnost med slovenskimi sevi. Pri prašičih, ki so jih cepili cepljeni proti PCV 2 so opazili rahlo znižanje PCV 2 pozitivnih vzorcev, niso pa opazili vpliva na prisotnost PCV 3. Ugotovitve kažejo na to, da cepljenje proti PCV 2 najverjetneje ne ščitijo pred PCV 3.

V času pisanja te naloge PCV 4 v Sloveniji še nismo dokazali.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci poginjenih domačih in divjih prašičev

V preiskavo smo vključili 88 domačih in 43 divjih prašičev iz 71 slovenskih občin. Vzorce smo odvzeli v okviru rednega pogina prašičev na farmah.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava suspenzije vzorcev

Iz različnih delov organov (vranica, ledivca, bezgavke, tonzile) smo s škarjami odvzeli približno 0,5 do 1 cm³ tkiva organa in koščke dali v vrečko za mastikator. S škarjami smo koščke organa sesekljali na drobne koščke in dodali 5 do 7 ml RPMI – 1640, da smo dobili 10 % suspenzijo. Tako pripravljeno vrečko smo dali v mastikator in vzorec homogenizirali 1,5 minute. Suspenzijo smo odlili v 15 ml epruveto in jo označili s številko vzorca. Vzorec smo centrifugirali 15 minut na 2.500 obratih/min. Za preiskavo PCR smo oddvojili 2 ml supernatanta v vijalko, jo označili z oznako vzorca in datumom priprave ter vzorec shranili na < - 50 °C do začetka preiskave.

3.2.2 Preventivni ukrepi pri delu z vzorci

Izolacijo nukleinske kisline DNA smo pri vseh 131 preiskanih vzorcih izvedli s komercialnim kompletom QIAamp Viral RNA (Qiagen, Nemčija). Da bi preprečili navzkrižno kontaminacijo in morebitno nenamerno kontaminacijo vzorcev smo med izolacijo nukleinskih kislin uporabljali številne preventivne ukrepe. Pri delu smo uporabljali zaščitni plašč in rokavice ter jih po potrebi večkrat zamenjali. Pri nanašanju vzorcev na kolonice smo bili pozorni na natančnost in pazili, da se z nastavkom pipete nismo dotikali zunanjih delov in membrane kolonice. Med nanašanjem smo vedno zamenjali nastavke s filtrom. Pri vorteksiranju smo s kratkim centrifugiranjem 1,5 ml epruvetk odstranili kapljice z notranjosti pokrova. Epruvete smo odpirali previdno, da nismo ustvarjali aerosola. Pokrovčke epruvet z vzorci in reagenti smo sproti zapirali. Ob morebitnem kontaktu rokavice z nesterilno površino smo rokavico takoj zamenjali.

3.2.3 Izolacija nukleinskih kislin z QIAamp Viral RNA kitom

Komercialni komplet QIAamp Viral RNA mini zagotavlja hiter in zanesljiv način izolacije virusne RNA in DNA. Nukleinske kisline lahko izoliramo iz plazme, seruma in ostalih telesnih tekočin ter tkiv. Vzorec najprej liziramo z lizirajočim pufrom ter s tem inaktiviramo RN-aze in zagotovimo izolacije nepoškodovane nukleinske kisline virusov. Nukleinske kisline v vzorcu vežemo na membrano, z dvema pufroma pa odstranimo proteine, nukleaze ter ostale kontaminante in inhibitorje. Tako dobimo čisto in intaktno DNA ali RNA molekulo.

Preiskovane vzorce smo vzeli iz zamrzovalnika in jih pred pričetkom izolacije DNA pustili na sobni temperaturi 20 °C približno 20 minut, da so se odtalili. Izolacijo DNA smo izvajali po navodilih proizvajalca. Liofilizirano epruvetko s »carrier RNA« smo raztopili v 310 µl pufra AVE in glede na številno vzorcev, ustrezno količino »carrier RNA« dodali k pufu AVL. Pred prvo uporabo kompleta smo z dodatkom absolutnega etanola pripravili delovni raztopini pufra AW1 in AW2.

- Za posamezni vzorec smo pripravili 1,5 ml epruvetke, jih označili in vanje odpipetirali 560 µl pufra AVL s »carrier RNA«.
- V epruvetke s pufrom AVL smo dodali 140 µl vzorca (pripravljena suspenzija iz organov), epruvete premešali na vorteksu in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. S kratkim centrifugiranjem smo odstranili tekočino s pokrova.
- Vsebinski epruvete smo dodali 560 µl čistega etanola. Epruvete smo dobro premešali na vorteksu in s kratkim centrifugiranjem odstranili tekočino s pokrova.
- 630 µl raztopine iz 1,5 ml epruvete smo nanesti na označeno kolonico QIAamp in jo centrifugirali 1 minuto pri 8.000 obratih. Kolonice smo nato nastavili v nove zbirne epruvete, tiste s filtratom pa zavrgli ter celoten postopek ponovili.
- Na kolonice smo nanesti 500 µl pufra AW1 in jih centrifugirali 1 minuto pri 6.000 obratih. Kolonice smo nastavili v nove zbirne epruvete, epruvete s filtratom pa zavrgli. Na kolono smo nanesti 500 µl pufra AW2 in jih centrifugirali 3 minute na 14.000 obratov.
- Kolono smo namestili v novo 1,5 ml epruveto in na membrano nanesti 60 µl pufra AVE. Inkubirali smo na sobni temperaturi 1 minuto in nato centrifugirali 1 minuto pri 8.000 obratih. Kolono smo zavrgli, izolirano DNA pa shranili v zamrzovalniku pri – 70 °C.

3.2.4 Dokaz nukleinskih kislin PCV 2 in PCV 3 z metodo PCR v realnem času

3.2.4.1 Pomnoževanje specifičnih odsekov genomov PCV 2 in PCV 3

Za določanje prisotnosti nukleinskih kislin PCV 2 in PCV 3 smo uporabili komercialno dostopen Bio-T kit PCV2 & PCV 3 (Biosellal, Francija), ki vsebuje PCR Master Mix, s katerim lahko v isti reakcijski mešanici določamo prisotnost nukleinskih kislin:

- PCV 2 (sonda, označena z barvilom 6-FAM),
- PCV 3 (sonda, označena z barvilom VIC (HEX))

Poleg tega kit vsebuje tudi Interno pozitivno kontrolo IPC (sonda, označena z barvilom Cy5), eksterno pozitivno kontrolo EPC in vodo, prosto RNaz in DNaz. Za pomnoževanje smo uporabili aparaturo za pomnoževanje in dokazovanje produktov PCR v realnem času Mx30005P (Stratagene, ZDA).

Zamrznjene reagentne smo odtopili, vokteksirali in na kratko centrifugirali. Za pomnoževanje nukleinskih kislin PCV 2 in PCV 3 z metodo PCR v realnem času smo iz mešanice reagentov pripravili reakcijsko mešanico v končnem volumnu 13 µl, ki je vsebovala:

- 10 µl PCR Master Mixa
- 0,5 µl interne pozitivne kontrole IPC
- 2,5 µl izolirane DNA preiskovanega vzorca (oziroma eksterne pozitivne kontrole)

Pomnoževanje na aparaturi Mx30005p je potekalo:

- 1 cikel 5 minut pri temperaturi 95 °C
- 45 ciklov
 - 15 sekund pri temperaturi 95 °C
 - 45 sekund pri temperaturi 60 °C

Posamezne vzorce smo ovrednotili kot pozitivne, če se je pojavila sigmoidna krivulja. Če krivulje ni bilo, smo vzorec ovrednotili kot negativen.

3.2.5 Kvantifikacija pozitivnih vzorcev PCV 2 in PCV 3

Za namen določanja kopij virusnega genoma PCV 2 in PCV 3 v vzorcih smo od vseh 131 preiskanih vzorcev odbrali 30 pozitivnih vzorcev z različnimi vrednostmi Ct. Bio-T kit PCV2 & PCV 3 (Biosellal, Francija) vsebuje standardni raztopini PCV 2 DNA in PCV 3 DNA, ki vsebujeta 10^6 kopij virusnega genoma/qPCR. Iz začetne raztopine vsakega standarda smo pripravili 10- kratne razredčitve (10^{-1} do 10^{-5}), s katerimi smo dobili standardno linearno krivuljo. Na podlagi naklona posamezne premice lahko iz vrednosti Ct izračunamo točno število kopij virusnega genoma v preiskovanem vzorcu. Določitev števila kopij v 30 odbranih vzorcih smo izvedli skupaj z razredčitvami standarda in določili število kopij posameznega virusa na reakcijsko mešanico.

3.2.6 Dokaz nukleinske kisline s klasično metodo PCR

3.2.6.1 Izbira in priprava začetnih oligonukleotidov

Za pomnoževanje nukleinskih kislin PCV 2 smo uporabili oligonukleotidne začetnike in protokol opisan v Csagola in sod. (2006). Uporabili smo dva para oligonukleotidnih začetnikov: PCV 2 – CBB1 in PCV 2 – CBB2 ter PCV 2 – CBB3 in PCV 2 – CSZ1. Oba para oligonukleotidnih začetnikov ustvarita dva prekrivajoča DNA fragmenta, iz katerih lahko sestavimo celoten PCV 2 genom. Izdelavo začetnih oligonukleotidov smo naročili pri podjetju SIGMA (Sigma-Aldrich, ZDA). Delovne raztopine oligonukleotidnih začetnikov smo pripravili v koncentraciji 20 pmol/ μ l.

Za pomnoževanje nukleinskih kislin PCV 3 smo uporabili protokol opisan v Wen in sodelavci (2018). Tokrat smo uporabili štiri pare oligonukleotidnih začetnikov: PCV 3 – PCR1F in PCV 3 – PCR1R, PCV 3 – PCR2F in PCV 3 – PCR2R ter PCV 3 – PCR3F in PCV 3 – PCR3R so navedeni v Wen in sodelavci (2018). Oligonukleotidne začetnike PCV 3 – PCR4F in PCV 3 – PCR4R ter PCV 3 – PCR6F in PCV 3 – PCR6R pa smo skonstruirali sami. S pomnoževanjem s PCR smo dobili štiri prekrivajoče DNA fragmente, ki so skupaj tvorili celotno DNA zaporedje genoma PCV 3. Delovne raztopine oligonukleotidnih začetnikov smo pripravili v koncentraciji 20 pmol/ μ l.

Izdelavo oligonukleotidnih začetnikov smo naročili pri podjetju SIGMA (Sigma-Aldrich, ZDA). Pred prvim pomnoževanjem smo pripravili delovne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov.

Tabela 4: Oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili za sekvenciranje celotnih genomov PCV 2 in PCV 3.

Table 4: Primers used for the amplification of full PCV 2 and PCV 3 genomes.

Oligonukleotidni začetnik	Oligonukleotidno zaporedje	Mesto prileganja	Velikost produkta
PCV 2 – CBB1	5' – GCT GCC ACA TCG AGA A – 3'	289-305	1279 bp
PCV 2 – CBB2	5' – CGC ACC TTC GGA TAT AC – 3'	1584-1568	
PCV 2 – CBB3	5' – GCT CTC CAA CAA GGT ACT – 3'	437-420	811 bp
PCV 2 – CSZ2	5' – GGA GGA GTA GTT TAC ATA GGG G – 3'	853-835	
PCV 3 – PCR1F	5' – ATT ATG GAT GCT CCT CAT CGT G – 3'	66-87	553 bp
PCV 3 – PCR1R	5' – CAT CTT CTC CGC AAC TTC AGT C – 3'	597-618	
PCV 3 – PCR2F	5' – GAC TGA AGT TGC GGA GAA GAT G – 3'	597-619	789 bp
PCV 3 – PCR2R	5' – CGG CAC GAA AGA AGT TTG GAT T – 3'	1364-1254	
PCV 3 – PCR3F	5' – CCC ACA TGC GAG GGC GTT TAC C – 3'	1233-12	895 bp
PCV 3 – PCR3R	5' – CGA GGC CGC TTC ATC ATC CAC T – 3'	106-2127	
PCV 3 – PCR4F	5' – TCG GGA AAT CTG ACT GAA – 3'	579-596	405 bp
PCV 3 – PCR4R	5' – CCA CTC CTC CGG TAC AAC ATT A – 3'	962-983	
PCV 3 – PCR6F	5' – TAA TTT TGT GGC TAA GGT AT – 3'	929-948	329 bp
PCV 3 – PCR6F	5' – TGC GGG CAC AGG TAA AC – 3'	1241-1257	

3.2.6.2 Priprava mešanic za pomnoževanje celotnih genomov PCV 2 in PCV 3

Pri določanju prisotnosti nukleinskih kislin PCV 2 in PCV 3 smo uporabili komercialno predpripravljeno mešanico PCR SuperMix (Thermo Fischer Scientific, ZDA), pomnoževanje nukleinskih kislin smo izvajali na kalibriranem termopomnoževalniku T1 (Biometra, Nemčija). Komercialno mešanico PCR SuperMix in delovne raztopine posameznih oligonukleotidnih začetnikov smo odtopili, vorteksirali in kratko centrifugirali.

Za pomnoževanje PCV 2 ali PCV 3 s klasično metodo PCR smo pripravili reakcijsko mešanico v končnem volumni 25 µl. Mešanica je vsebovala:

- 20 µl PCR SuperMixa,
- 1 µl oligonukleotidnega začetnika (v koncentraciji 20 pmol/µl)
- 1 µl oligonukleotidnega začetnika (v koncentraciji 20 pmol/µl)
- 3 µl izolirane DNA preiskovanega vzorca

Pomnoževanje je potekalo na kalibriranem termopomnoževalniku T1 (Biometra, Nemčija):

- 1 cikel 10 minut pri temperaturi 95 °C
- 40 ciklov
 - o 30 sekund pri temperaturi 94 °C
 - o 1 minuta pri temperaturi 55 °C
 - o 1 minuta pri temperaturi 68 °C
- 1 cikel 7 minut pri temperaturi 68 °C
- končno hlajenje reakcijske mešanice na 4 °C

3.2.6.3 Dokaz produktov klasične metode PCR z elektroforezo v agaroznem gelu

Prisotnost produktov PCR za PCV 2 in PCV 3 smo dokazovali z elektroforezo v agaroznem gelu. Za ločevanje produktov PCR smo uporabili 1,8 % agarozni gel. V erlenmajerico smo zatehtali 1,8 g agaroze in dolili 100 ml TAE pufra. V mikrovalovni pečici smo raztopino segrevali do vrelišča, vmes pa jo večkrat premešali. Ko se je agarosa v gelu popolnoma raztopila, smo tekočino ohladili in jo prelili v pripravljeno elektroforezno kadičko. Če so se ob vlivljanju pojavili mehurčki, smo jih s papirnato brisačko odstranili, saj bi lahko motili proces elektroforeze. Dodali smo glavniček in ga pustili približno 15 minut, da se je gel strdil. Glavniček smo po 15 minutah previdno odstranili, da jamic v gelu nismo poškodovali.

Zmešali smo 10 µl posameznega vzorca z 2,5 µl barvila (DNA Loading Dye, Thermo Scientific, ZDA) in vzorce nanesti v posamezne jamice. V zadnjo jamico smo nanesti 2 µl markerja velikosti 100 baznih parov (GeneRuler 100 bp, Thermo Scientific, ZDA) pomešanega s 3 µl barvila (DNA Loading Dye, Thermo Scientific, ZDA). Elektroforezo smo vključili za približno 60 minut pri napetosti 115 V, ločevanje produktov smo nadzirali in spremljali potovanje barvila. Po koncu ločevanja smo gel prenesli v plastično posodo in ga prelili s 400 ml raztopine etidijevega bromida (0,5 µg/ml) ter ga pustili stati 15 minut. Raztopino etidijevega bromida smo odlili in gel sprali z vodo iz vodovoda. Pri tem smo pazili, da etidijev bromid ni prišel v stik s kožo ali drugimi deli telesa in da z njim nismo kontaminirali okolice, saj je snov kancerogena. Gel smo pregledali v UV transiluminatorju pri ultravijolični svetlobi in sliko gela dokumentirali z E-BOX VX2 (Vilber Lourmat, Nemčija) ter jo analizirali v računalniškem programu.

3.2.7 Določanje nukleotidnega zaporedja

Določanje nukleotidnega zaporedja smo izvedli direktno iz produktov vzorcev, ki smo jih dobili s klasično metodo PCR. Določanje nukleotidnega zaporedja so izvedli v podjetju MacroGen (Amsterdam, Nizozemska) z direktno metodo po Sangerju v obe smeri z uporabo ustreznih začetnih nukleotidov, kot je bilo predhodno opisano (Toplak, 2004).

3.2.7.1 Priprava vzorcev za sekvenciranje v podjetju MacroGen

Vzorci za sekvenciranje smo pošiljali v podjetje MacroGen (Amsterdam, Nizozemska). Za sekvenciranje smo uporabili 10 µl PCR produkta. Na sekvenciranje smo vzorce poslali po pošti, podatke pa vnesli v spletno aplikacijo. Po približno tednu dni smo prejeli rezultate sekvenciranja.

3.2.8 Analiza celotnih genomov s programom DNASTAR

Po sekvenciranju smo posamezna zaporedja uredili s komercialnim računalniškim programom za urejanje sekvenc DNASTAR (Lasergene, ZDA) z uporabo programom SeqMan, EditSeq in MegAlign.

3.2.8.1 Uporaba programa SeqMan

Sekvence smo naprej pregledali v priloženem .pdf dokumentu, da smo ocenili, ali je sekvenciranje uspelo. Izpise nukleotidnega zaporedja smo uredili v programu SeqMan, ki je eden izmed komercialnih programov DNASTAR (Lasergene, ZDA). V programu SeqMan smo poravnali oba izpisa nukleotidnega zaporedja, ki smo ju dobili s sekvenčno reakcijo za posamezni vzorec (vsak vzorec je imel dve zaporedju, po eno za vsak oligonukleotidni začetnik). V programu smo analizirali dokumente s končnico »abi«, ki vsebujejo signale v obliki zaporedja štirih nukleotidov za vsak posamezen vzorec. Slabo berljive začetne in končne dele, ki predstavljajo zaporedje oligonukleotidnega začetnika, smo izrezali. Obe zaporedji (angl. forward in reverse) smo natančno pregledali in preverili ujemanje posameznih baz nukleotidnega zaporedja po celotni dolžini sekvence. Ko smo urejanje zaključili, smo nukleotidno zaporedje prekopirali v program EditSeq.

3.2.8.2 Uporaba programa EditSeq

Zaporedje smo v programu EditSeq shranili v računalniku s končnico »seq«. Dobljena zaporedja smo primerjali z zaporedji v genski banki (GenBank), ki je dostopna na spletni strani strežnika NCBI (National Center for Biotechnology Information, ZDA). V programu EditSeq smo dobljeno sekvenco po potrebi tudi obrnili v »reverzno komplementarno«. Zaporedja, ki smo jih poprej uredili v programu SeqMan, smo v programu EditSeq sestavili v cele genome. Vse dobljene sekvence smo uredili tako, da se začnejo s specifičnim zaporedjem, ki predstavlja začetek replikacije virusnega genoma. Pri vseh sekvencah smo z ukazom »Find ORF« določili tri glavne odprte bralne okvirje (angl. open reading frame – ORF), njihova zaporedja smo prekopirali v novo datoteko in jih prevedli v aminokislinsko zaporedje, ter ga shranili na računalniku s končnico »pro«.

3.2.8.3 Uporaba programa MegAlign

V programu MegAlign smo naredili poravnavo nukleotidnih zaporedij s parametrom Clustal W in tako prikazali razlike v nukleotidih med posameznimi sekvencami. V tabelah smo prikazali

razlike med primerjanimi nukleotidnimi zaporedji celotnih genomov ter nukleotidnimi in aminokislinskimi zaporedji ORF.

3.2.9 Uporaba programa BLAST na spletnem strežniku NCBI

S pomočjo spletnega programa BLAST (Basic Local Alignment Tool) na internetnem strežniku NCBI (National Center for Biotechnology Information) smo urejena nukleotidna zaporedja primerjali z najbližjimi zaporedji PCV 2 in PCV 3, tako smo dobili potrditev ali se dobljena nukleotidna zaporedja ujemajo z nukleotidnimi zaporedji PCV 2 in PCV 3 in v kolikšnem odstotku se ujemajo z najbližjimi sevi PCV 2 in PCV 3. S pomočjo najbližje sekvence, ki smo jo dobili v programu BLAST smo v naši sekvenci v programu BLAST pregledali mesta, kjer so se pokazale razlike v nukleotidih. S pregledom literature smo poiskali referenčne seve posameznih podtipov PCV 2 in PCV 3 v bazi NCBI in jih vključili v filogenetsko primerjavo z našimi sevi.

3.2.10 Primerjava celotnih genomov s sevi v genski banki

V primerjavo smo vključili celotne genome posameznih sekvenciranih vzorcev v dolžini 1767 nt za PCV 2 in 2000 nt za PCV 3 in jih umestili v pripadajoč genotip. Tipizacijo smo izvedli za štiri slovenske seve PCV 2 in dva seva PCV 3. V genski banki smo za posamezen slovenski sev pregledali 100 najbližjih vzorcev, ki so bili ugotovljeni po svetu in v filogenetsko drevo vključili po en sev iz posamezne države.

3.2.11 Analiza celotnih genomov s programom MEGA

V filogenetsko analizo celotnih genomov ter analizo celotnih ORF 1, ORF 2 in ORF 3 regij virusnega genoma smo vključili slovenske seve PCV 2 in PCV 3 ki smo jim določili nukleotidno zaporedje celotnega genoma, referenčne seve PCV 2 in PCV 3 in najbližje seve objavljenih zaporedij iz genske banke, ki smo jih določili s pomočjo spletnega programa BLAST. Primerjalne analize nukleotidnih zaporedij smo izvedli s programom MEGA 6.06 (Tamura in sod., 2013). Z metodo samovzorčenja (angl. bootstrapping) smo ocenili zanesljivost filogenetskih dreves in vrednosti statistične podpore posameznih cepitev vpisali na vozlišča dreves, na katerih prikazujejo odstotek ponovljivosti posameznega vozlišča pri 1000 samovzorčenjih.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI PREGLEDA 131 VZORCEV POGINJENIH DOMAČIH IN DIVJIH PRAŠIČEV

Pregledali smo skupno 131 vzorcev, od tega 88 vzorcev domačih prašičev in 43 vzorcev divjih prašičev. Prisotnost nukleinske kisline PCV 2 smo dokazali pri 60 (68,2 %) domačih in 8 (18,6 %) divjih prašičih. Prisotnost PCV 3 smo dokazali pri 20 (22,7 %) domačih in 15 (34,9 %) divjih prašičih. Sočasno prisotnost PCV 2 in PCV 3 smo dokazali pri 14 (15,9 %) domačih in 8 (18,6 %) divjih prašičih.

Tabela 5: Rezultati testiranja 88 vzorcev domačih in 43 vzorcev divjih prašičev, ki smo jih vključili v testiranje z metodo PCR v realnem času.

Table 5: Results of 88 samples of domestic pigs and 43 samples of wild boar, which were tested by real-time PCR.

Vzorec	PCV-2	PCV-3	Vrsta	Starost	Občina
Vzorec 1	15,59	negativno	domači	ni podatka	Kamnik
Vzorec 2	34,25	negativno	domači	4 mesece	Kidričevo
Vzorec 3	23,65	negativno	domači	4 mesece	Pesnica
Vzorec 4	negativno	negativno	domači	18 tednov	Cerkvenjak
Vzorec 5	14,44	negativno	domači	3 mesece	Ljutomer
Vzorec 6	negativno	negativno	divji	ni podatka	Hrpelje-Kozina
Vzorec 7	negativno	27,18	divji	ni podatka	Koper
Vzorec 8	negativno	negativno	divji	ni podatka	Brda
Vzorec 9	19,33	26,3	divji	ni podatka	Renče-Vogrsko
Vzorec 10	negativno	negativno	divji	ni podatka	Braslovče
Vzorec 11	negativno	25,09	divji	ni podatka	Divača
Vzorec 12	28,57	negativno	domači	ni podatka	Murska Sobota
Vzorec 13	29,34	40	domači	ni podatka	Cankova

Vzorec	PCV-2	PCV-3	Vrsta	Starost	Občina
Vzorec 14	32,59	negativno	domači	12 tednov	Apače
Vzorec 15	negativno	31,39	domači	ni podatka	Ilirska Bistrica
Vzorec 16	27,28	27,48	domači	ni podatka	Litija
Vzorec 17	negativno	negativno	domači	4 mesece	Šentjur
Vzorec 18	24,75	negativno	domači	4 mesece	Zreče
Vzorec 19	negativno	negativno	domači	4 mesece	Laško
Vzorec 20	negativno	negativno	domači	5 mesecev	Laško
Vzorec 21	negativno	27,8	divji	ni podatka	Koper
Vzorec 22	33,32	negativno	domači	ni podatka	Naklo
Vzorec 23	negativno	negativno	domači	ni podatka	Dobrova-Polhov Gradec
Vzorec 24	28,24	negativno	domači	ni podatka	Kranj
Vzorec 25	25,52	25,43	domači	ni podatka	Ivančna gorica
Vzorec 26	negativno	negativno	divji	ni podatka	Lendava
Vzorec 27	negativno	negativno	divji	ni podatka	Hrpelje-Kozina
Vzorec 28	negativno	negativno	divji	ni podatka	Litija
Vzorec 29	negativno	negativno	divji	ni podatka	Hrastnik
Vzorec 30	negativno	negativno	divji	ni podatka	Hrastnik
Vzorec 31	negativno	negativno	divji	ni podatka	Brda
Vzorec 32	30,95	28,57	divji	ni podatka	Hrpelje-Kozina
Vzorec 33	negativno	negativno	divji	ni podatka	Črnomelj
Vzorec 34	negativno	25,65	divji	ni podatka	Laško
Vzorec 35	30,48	negativno	domači	5 mesecev	Hajdina

Vzorec	PCV-2	PCV-3	Vrsta	Starost	Občina
Vzorec 36	negativno	38,25	domači	12 tednov	Gorišnica
Vzorec 37	17,26	negativno	domači	12 tednov	Dornava
Vzorec 38	30,24	negativno	domači	2 meseca	Sveti Andraž v Slovenskih Goricah
Vzorec 39	20,26	negativno	domači	18 tednov	Benedikt
Vzorec 40	31,13	38,56	domači	7 tednov	Ljutomer
Vzorec 41	negativno	38,43	domači	6 tednov	Sveti Jurij ob Ščavnici
Vzorec 42	34,28	36,31	domači	2 meseca	Gornja Radgona
Vzorec 43	21,18	33,75	domači	18 tednov	Apače
Vzorec 44	31,48	32,53	domači	7 tednov	Rogašovci
Vzorec 45	21,66	negativno	domači	ni podatka	Trebnje
Vzorec 46	19,02	negativno	domači	ni podatka	Brezovica
Vzorec 47	24,23	negativno	domači	ni podatka	Medvode
Vzorec 48	negativno	negativno	divji	ni podatka	Brda
Vzorec 49	20,66	26,74	divji	ni podatka	Renče-Vogrsko
Vzorec 50	negativno	negativno	divji	ni podatka	Hrpolje-Kozina
Vzorec 51	negativno	negativno	divji	ni podatka	Dol pri Ljubljani
Vzorec 52	negativno	negativno	divji	ni podatka	Dol pri Ljubljani
Vzorec 53	negativno	negativno	divji	ni podatka	Dol pri Ljubljani
Vzorec 54	negativno	28,96	divji	ni podatka	Ljubljana
Vzorec 55	32,23	26,29	domači	ni podatka	Trebnje
Vzorec 56	27,35	negativno	domači	ni podatka	Medvode

Vzorec	PCV-2	PCV-3	Vrsta	Starost	Občina
Vzorec 57	24,22	negativno	domači	ni podatka	Medvode
Vzorec 58	negativno	negativno	divji	ni podatka	Dol pri Ljubljani
Vzorec 59	negativno	negativno	divji	ni podatka	Dol pri Ljubljani
Vzorec 60	negativno	negativno	divji	ni podatka	Dol pri Ljubljani
Vzorec 61	27,96	negativno	domači	ni podatka	Litija
Vzorec 62	negativno	negativno	domači	5 mesecev	Škofja Loka
Vzorec 63	negativno	negativno	domači	ni podatka	Krško
Vzorec 64	18,57	27,43	domači	ni podatka	Kočevje
Vzorec 65	27,19	negativno	domači	ni podatka	Kočevje
Vzorec 66	34,3	39	domači	ni podatka	Šenčur
Vzorec 67	25,94	negativno	domači	ni podatka	Šenčur
Vzorec 68	19,68	27,21	domači	ni podatka	Gorenja vas-Poljane
Vzorec 69	18,17	negativno	domači	4 mesece	Radenci
Vzorec 70	negativno	negativno	domači	2 meseca	Slovenska Bistrica
Vzorec 71	36,51	negativno	domači	3 mesece	Središče ob Dravi
Vzorec 72	21,85	negativno	domači	4 tedne	Markovci
Vzorec 73	19,57	negativno	domači	2 meseca	Gorišnica
Vzorec 74	31,91	negativno	domači	3 mesece	Starše
Vzorec 75	22	negativno	domači	3 mesece	Apače
Vzorec 76	18,01	negativno	domači	2 meseca	Sveti Jurij ob Ščavnici
Vzorec 77	30,43	30,2	domači	3 mesece	Apače
Vzorec 78	negativno	negativno	domači	ni podatka	Horjul

Vzorec	PCV-2	PCV-3	Vrsta	Starost	Občina
Vzorec 79	negativno	negativno	divji	ni podatka	Divača
Vzorec 80	negativno	negativno	divji	ni podatka	Divača
Vzorec 81	negativno	negativno	divji	ni podatka	Divača
Vzorec 82	negativno	negativno	divji	ni podatka	Šempeter-Vrtojba
Vzorec 83	13,52	25,16	divji	ni podatka	Ilirska Bistrica
Vzorec 84	33,64	30,67	divji	ni podatka	Koper
Vzorec 85	24,32	negativno	domači	ni podatka	Dobova
Vzorec 86	negativno	negativno	domači	ni podatka	Šentjernej
Vzorec 87	27,14	33,08	domači	ni podatka	Sevnica
Vzorec 88	22,91	25,25	divji	ni podatka	Koper
Vzorec 89	negativno	30,41	divji	ni podatka	Renče-vogrsko
Vzorec 90	negativno	negativno	divji	ni podatka	Postojna
Vzorec 91	negativno	negativno	domači	ni podatka	Brezovica
Vzorec 92	24,53	negativno	domači	ni podatka	Brezovica
Vzorec 93	24,55	negativno	domači	18 tednov	Odranci
Vzorec 94	negativno	negativno	domači	3 mesece	Ljutomer
Vzorec 95	24,13	negativno	domači	4 mesece	Apače
Vzorec 96	21,97	negativno	domači	ni podatka	Šmarje pri Jelšah
Vzorec 97	negativno	negativno	domači	ni podatka	Braslovče
Vzorec 98	20,85	negativno	domači	ni podatka	Solčava
Vzorec 99	negativno	37	divji	ni podatka	Koper
Vzorec 100	negativno	negativno	domači	ni podatka	Šmartno pri Litiji

Vzorec	PCV-2	PCV-3	Vrsta	Starost	Občina
Vzorec 101	28,931	negativno	domači	ni podatka	Moravče
Vzorec 102	negativno	negativno	domači	ni podatka	Braslovče
Vzorec 103	negativno	negativno	domači	2 meseca	Metlika
Vzorec 104	negativno	negativno	domači	ni podatka	Kozje
Vzorec 105	24,052	negativno	domači	ni podatka	Vitanje
Vzorec 106	negativno	31,206	domači	5 tednov	Moravske Toplice
Vzorec 107	24,407	negativno	domači	4 mesece	Radenci
Vzorec 108	17,561	negativno	domači	3 mesece	Sveti Jurij ob Ščavnici
Vzorec 109	33,39	negativno	domači	3 mesece	Križevci
Vzorec 110	41,855	negativno	domači	3 mesece	Gornja Radgona
Vzorec 111	38,514	35,338	domači	ni podatka	Pesnica
Vzorec 112	negativno	36,389	domači	ni podatka	Pesnica
Vzorec 113	negativno	negativno	divji	ni podatka	Murska Sobota
Vzorec 114	negativno	negativno	divji	ni podatka	Murska Sobota
Vzorec 115	negativno	negativno	divji	ni podatka	Nova gorica
Vzorec 116	19,5	18,64	divji	ni podatka	Koper
Vzorec 117	18,5	negativno	domači	18 tednov	Tišina
Vzorec 118	24,74	negativno	domači	3 mesece	Apače
Vzorec 119	negativno	negativno	domači	5 mesecev	Veržej
Vzorec 120	32,83	negativno	domači	8 tednov	Slovenska Bistrica
Vzorec 121	23,12	negativno	domači	3 mesece	Hajdina
Vzorec 122	negativno	negativno	domači	18 tednov	Juršinci

Vzorec	PCV-2	PCV-3	Vrsta	Starost	Občina
Vzorec 123	14,92	negativno	domači	2 meseca	Dornava
Vzorec 124	29,56	negativno	domači	5 mesecev	Hajdina
Vzorec 125	negativno	negativno	domači	7 tednov	Kidričevo
Vzorec 126	negativno	negativno	domači	ni podatka	Pivka
Vzorec 127	24,53	24,47	divji	ni podatka	Piran
Vzorec 128	negativno	negativno	divji	ni podatka	Hrpelje-Kozina
Vzorec 129	negativno	negativno	divji	ni podatka	Murska Sobota
Vzorec 130	negativno	negativno	domači	ni podatka	Ljutomer
Vzorec 131	negativno	25,25	domači	3 tedne	Murska Sobota

Tabela 6: Rezultati preiskav 131 vzorcev na PCV 2 in PCV 3 z metodo PCR v realnem času.

Table 6: Results of real time PCR of 131 samples for PCV 2 and PCV 3

Rezultat	Domači prašiči	Divji prašiči
PCV 2	60 (68,2 %)	8 (18,6 %)
PCV 3	20 (22,7 %)	15 (34,9 %)
PCV 2 in PCV 3	14 (15,9 %)	8 (18,6 %)
Negativno	22 (25,0 %)	28 (65,1 %)
Skupaj	88 (100 %)	43 (100 %)

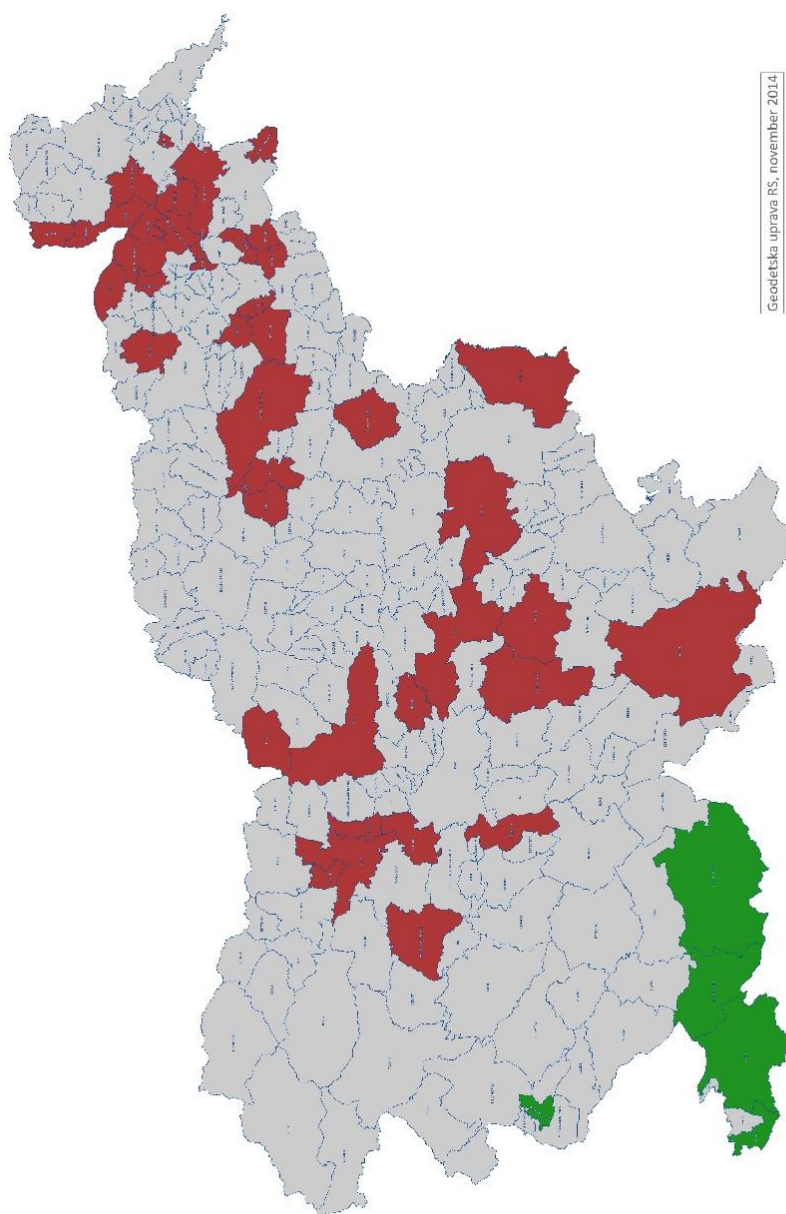
4.2 RAZŠIRJENOST PCV 2 IN PCV 3 MED DOMAČIMI IN DIVJIMI PRAŠIČI PO OBČINAH V SLOVENIJI

Ozemlje Republike Slovenije je upravno razdeljeno na 212 občin. Prisotnost PCV 2 pri domačih prašičih smo potrdili pri 60 preiskanih vzorcih v 40 slovenskih občinah. 6 pozitivnih vzorcev smo ugotovili v občini Apače, po 3 iz občin Hajdina in Medvode, po 2 iz občin Brezovica, Gornja Radgona, Kočevje, Litija, Ljutomer, Pesnica, Sveti Jurij ob Ščavnici, Šenčur in Trebnje, po 1 pozitivni vzorec pa smo ugotovili v občinah Brežice, Benedikt, Cankova, Dornava, Gorenja Vas – Poljane, Gorišnica, Ivančna Gorica, Kamnik, Kidričevo, Kranj, Križevci, Markovci, Moravče, Murska Sobota, Naklo, Odranci, Radenci, Rogašovci, Sevnica, Slovenska Bistrica, Solčava, Središče ob Dravi, Starše, Sveti Andraž v Slovenskih goricah, Šmarje pri Jelšah, Tišina, Vitanje in Zreče (Slika 3).

Pri divjih prašičih smo PCV 2 potrdili pri 8 preiskanih vzorcih v 5 slovenskih občinah, največ (3) v občini Koper, 2 v občini Renče – Vogrsko ter po 1 pozitiven vzorec v občinah Piran, Ilirska Bistrica in Hrpelje – Kozina (Slika 3).

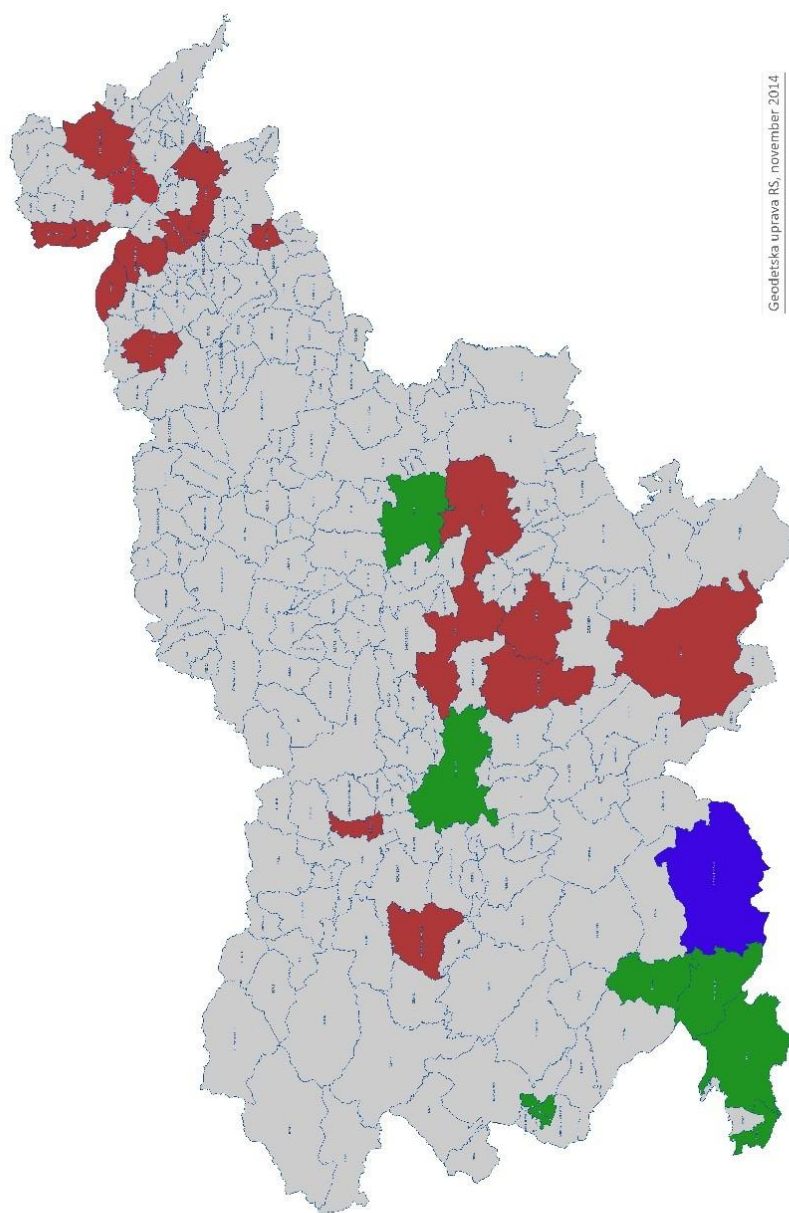
V 18 slovenskih občinah smo potrdili prisotnost PCV 3 pri 20 preiskanih domačih prašičih, po 2 pozitivna vzorca v občinah Apače in Pesnica ter po 1 pozitiven vzorec v občinah Cankova, Gorenja Vas – Poljane, Gorišnica, Gornja Radgona, Ilirska Bistrica, Ivančna Gorica, Kočevje, Litija, Ljutomer, Martjanci, Murska Sobota, Rogašovci, Sevnica, Sveti Jurij ob Ščavnici, Šenčur in Trebnje (Slika 4).

Prisotnost PCV 3 pri divjih prašičih smo ugotovili pri 15 preiskanih vzorcih v 8 občinah. 6 pozitivnih vzorcev smo ugotovili v občini Koper, 3 pozitivne vzorce v občini Renče – Vogrsko in po 1 pozitiven vzorec v občinah Divača, Hrpelje – Kozina, Ilirska Bistrica, Laško, Ljubljana in Piran (Slika 4).



Slika 3: Razširjenost PCV 2 v Sloveniji. Prikazane so občine v katerih smo potrdili prisotnost PCV 2 DNA pri domačih prašičih (rdeča) in divjih prašičih (zelena).

Figure 3: Prevalence of PCV 2 in Slovenia. Municipalities in which we confirmed the presence of PCV 2 DNA in domestic pigs (red) and wild boar (green) are shown.



Slika 4: Razširjenost PCV 3 v Sloveniji. Prikazane so občine v katerih smo potrdili prisotnost PCV 3 DNA pri domačih prašičih (rdeča) in divjih prašičih (zelena). V občini Ilirska Bistrica smo PCV 3 dokazali pri domačih in divjih prašičih, zato je prikazana z modro barvo.

Figure 4: Prevalence of PCV 3 in Slovenia. Municipalities in which we confirmed the presence of PCV 3 DNA in domestic pigs (red) and wild boar (green) are shown. In the Municipality of Ilirska Bistrica PCV 3 was confirmed in both domestic pig and wild boar and is therefore shown in blue.

4.3 DOLOČITEV ŠTEVILA KOPIJ PCV 2 IN PCV 3 V IZBRANIH VZORCIH

V odbranih pozitivnih vzorcih smo določili število kopij posameznega virusa, od 168,30 do 431.300.000 za PCV 2 in od 7,20 do 12.910 za PCV 3. Število kopij v posameznem preiskanem vzorcu je prikazano v Tabeli 7.

Tabela 7: Število kopij virusnih genomov PCV 2 in PCV 3 v preiskanih vzorcih.

Table 7: Number of copies of PCV 2 and PCV 3 viral genomes in tested samples.

Vzorec	PCV 2 (št. kopij / PCR)	PCV 3 (št. kopij / PCR)
Vzorec 31	1.032	1.768
Vzorec 16	9.124	3.765
Vzorec 40	1.476	7,20
Vzorec 25	871,3	4.932
Vzorec 42	168,3	4.932
Vzorec 43	1.072.000	103,2
Vzorec 49	1.374.000	5.251
Vzorec 13	4.013	0
Vzorec 44	953,1	187,9
Vzorec 55	6.738.000	3.388
Vzorec 37	20.360.000	0
Vzorec 38	2.606	0
Vzorec 1	14.920.000	0
Vzorec 5	36.040.000	0
Vzorec 39	2.192.000	0
Vzorec 83	431.300.000	12.910
Vzorec 3	62.680	0
Vzorec 24	7.866	0
Vzorec 71	77,92	0
Vzorec 84	305,1	586
Vzorec 17	0	339
Vzorec 36	0	0
Vzorec 77	343.000	0

Vzorec 11	0	9.887
Vzorec 68	3.583.000	2.988
Vzorec 54	0	1.225
Vzorec 99	0	12,63
Vzorec 7	0	3.131
Vzorec 87	22.030	199,7
Vzorec 89	0	789,1

4.4 POMNOŽEVANJE NUKLEINSKIH KISLIN PCV 2 IN PCV 3 ZA POTREBE SEKVENCIRANJA

Za določanje nukleotidnega zaporedja celotnih genomov smo odbrali 5 pozitivnih vzorcev na PCV 2 in 6 pozitivnih vzorcev na PCV 3 ter jih pomnožili še s klasično metodo PCR, gelska elektroforeza nam je služila zgolj kot potrditev, da smo s klasičnim PCR dobili produkte. Kandidatne vzorce smo odbrali na podlagi najnižjih vrednosti Ct določenih z metodo PCR v realnem času. Pri vse preiskanih vzorcih smo potrdili prisotnost iskanih nukleinskih kislin, vzorce pa smo na sekvenciranje pošiljali brez predhodnega čiščenja.

Tabela 8: Pozitivni vzorci, pri katerih smo dokazali nukleinsko kislino PCV 2 in jih odbrali za sekvenciranje.

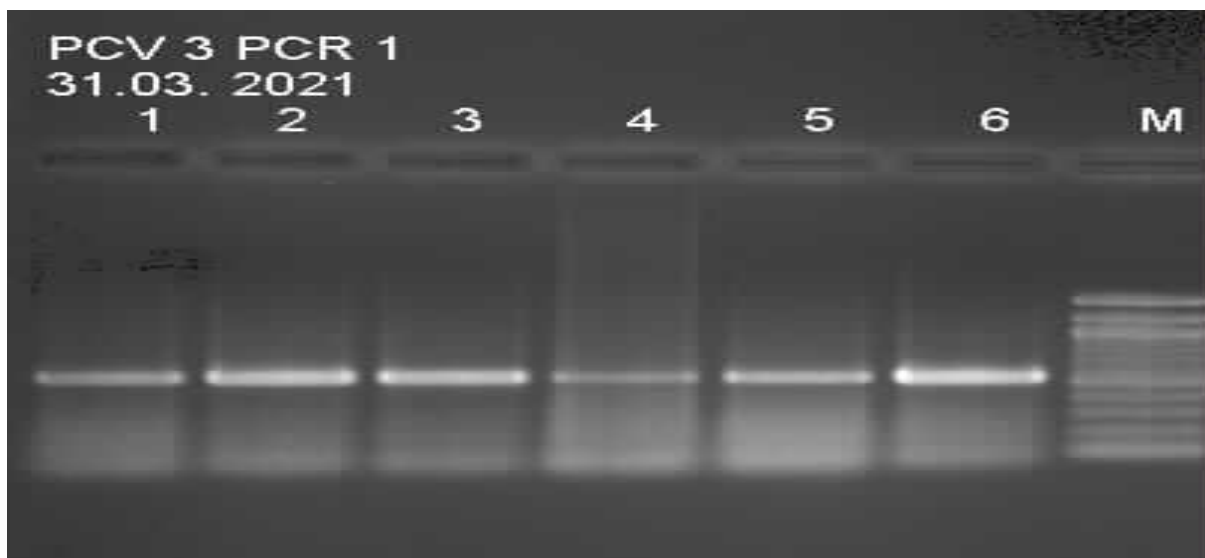
Table 8: Positive samples in which we detected the nucleid acid PCV 2 and chose for sequencing.

Vzorec	Vrsta prašiča	Občina	Ct vrednost	Produkt velikosti 1279 nt	Produkt velikosti 881 nt
Vzorec 1	Domači	Kamnik	15,59	da	da
Vzorec 5	Domači	Ljutomer	14,44	da	da
Vzorec 37	Domači	Dornava	17,26	da	da
Vzorec 46	Domači	Brezovica	19,02	da	da
Vzorec 9	Divji	Renče – Vogrsko	19,33	da	ne

Tabela 9: Pozitivni vzorci, pri katerih smo dokazali nukleinsko kislino PCV 3 in jih odbrali za sekvenciranje.

Table 9: Positive samples in which we detected the nucleic acid PCV 3 and chose for sequencing.

Vzorec	Vrsta prašiča	Občina	Ct vrednost	Produkt velikosti 553 nt	Produkt velikosti 405 nt	Produkt velikosti 329 nt	Produkt velikosti 895 nt
Vzorec 11	Divji	Divača	25,09	da	ne	ne	da
Vzorec 25	Domači	Ivančna Gorica	25,43	da	ne	ne	da
Vzorec 34	Divji	Laško	25,65	da	da	da	da
Vzorec 7	Divji	Koper	27,18	da	da	da	da
Vzorec 131	Domači	Murska Sobota	25,25	da	ne	ne	da



Slika 5: Prikaz produktov PCR v 1,8 % agaroznem gelu, 6 kandidatnih vzorcev za sekvenciranje.

Kolone s preiskovanimi vzorci: 1: vzorec 11, 2: vzorec 25, 3: vzorec 34, 4: vzorec 16, 5: vzorec 7, 6: vzorec 131, M: molekularni označevalec (100 bp).

Figure 5: PCR products in 1,8 % agarose gel, 6 candidate samples for sequencing.

Columns with tested samples: 1: sample 11, 2: sample 25, 3: sample 34, 4: sample 16, 5: sample 7, 6: sample 131, M: molecular marker (100 bp).

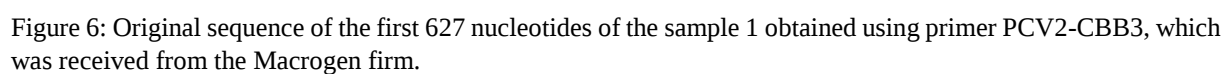
4.5 DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA ŠTIRIM POZITIVNIM VZORCEM PCV 2

Na sekvenciranje celotnega virusnega genoma PCV 2 smo poslali 4 vzorce domačih prašičev in 1 vzorec divjega prašiča, pri katerih smo s klasičnim PCR dokazali prisotnost PCV 2. Za sekvenciranje smo uporabili začetne oligonukleotide PCV2-CBB1, PCV-2 CBB2 in PCV-2 CBB3, PCV-2 CSZ1. Sekvenco celotnega genoma smo dobili tako, da smo v programu SeqMan poravnali komplementarni sekvenci obeh delov genoma. Obe konsenzusni sekvenci smo združili v programu EditSeq tako, da smo dobili zaporedje celega virusnega genoma PCV 2, dolžine 1.767 nt. Ker je cirkovirusni genom krožna molekula DNA, smo za začetek genoma določili zaporedje ori (angl. origin of replication), ki ga pri PCV 2 kodira zaporedje nukleotidov »AACGATTAC«

Tabela 10: Vzorci PCV 2, ki smo jim določili nukleotidno zaporedje celotnega genoma.

Table 10: PCV 2 samples of which the complete genome sequence was determined.

Vzorec	Ime vzorca v genski banki (GenBank)	Dolžina nukleotidnega zaporedja
Vzorec 1	PCV2-SLO1/2019	1.767
Vzorec 5	PCV2-SLO2/2019	1.767
Vzorec 37	PCV2-SLO3/2019	1.767
Vzorec 46	PCV2-SLO4/2019	1.767
Vzorec 9	sekvenciranje ni uspelo	/



4.6 DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA DVEH POZITIVNIH VZORCEV PCV 3

Na sekvenciranje celotnega virusnega genoma PCV 3 smo poslali dva vzorca domačih in 3 vzorce divjih prašičev, pri katerih smo s klasičnim PCR potrdili prisotnost PCV 3. Sekvenciranje smo izvedli v treh delih z uporabo oligonukleotidnih začetnikov PCV3-PCR1F, PCV3-PCR1R, PCV3-PCR2F, PCV3-PCR2R in PCV3-PCR3F, PCV3-PCR3R. Tudi tukaj smo v programu SeqMan poravnali obe komplementarni sekvenci za posamezni del genoma in sekvenc ter vse tri konsenzusne sekvence združili v programu EditSeq. Tako smo dobili celotne virusne genome PCV 3, dolžine 2.000 nt, ki smo jih prav tako začeli z zaporedjem ori, ki jo pri PCV 3 predstavlja nukleotidno zaporedje »TAGTATTAC«

Tabela 11: Vzorci PCV 3, ki smo jim določili nukleotidno zaporedje celotnega genoma.

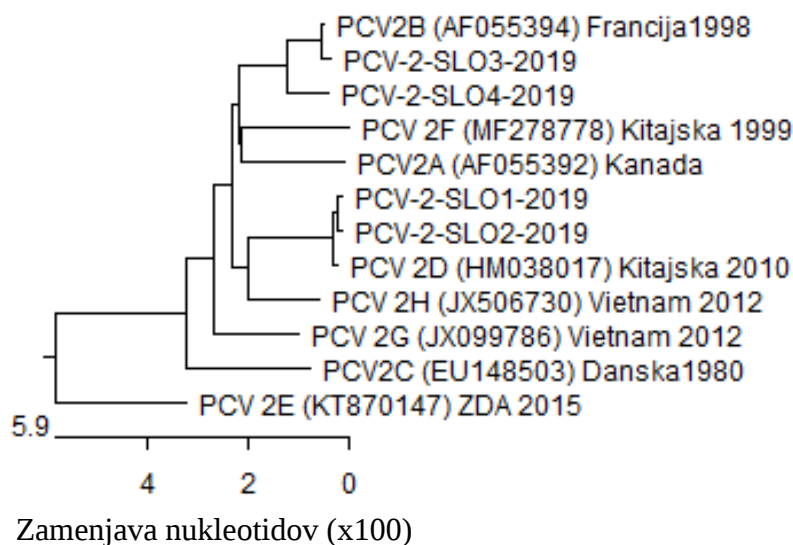
Table 11: PCV 3 samples of which the complete genome sequence was determined.

Vzorec	Ime vzorca v genski banki (GenBank)	Dolžina nukleotidnega zaporedja
Vzorec 11	sekvenciranje ni uspelo	/
Vzorec 25	sekvenciranje ni uspelo	/
Vzorec 34	PCV-3-SLO5/2019	2.000
Vzorec 7	PCV-3-SLO6/2019	2.000
Vzorec 131	sekvenciranje ni uspelo	/

4.7 MEDSEBOJNA PRIMERJAVA ZAPOREDIJ CELOTNIH GENOMOV PCV 2 IN PCV 3

Na prvem filogenetskem drevesu smo primerjali štiri seve PCV 2, ki smo jim določili nukleotidno zaporedje celotnega genoma pri domačih prašičih v Sloveniji, zraven pa smo vključili vse referenčne seve za posamezen genotip (Slika 7). S filogenetsko primerjavo smo ugotovili, da pozitivni vzorci spadajo v dve genetsko sorodni liniji. V prvo linijo sta uvrščena vzorca PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019, v drugo linijo vzorca PCV-2-SLO3/2019 in PCV-2-SLO4/2019. Vzorca iz prve linije imata 99,8 % medsebojne identičnosti zaporedja nukleotidov, vzorca iz druge linije pa 98,5 % identičnost zaporedja nukleotidov. Vzorec PCV-2-SLO4/2019 iz druge linije izkazuje 96,0 % identičnost nukleotidov z obema vzorcema iz prve linije, PCV-2-SLO3/2019 pa 96,1 in 96,2 % identičnost z vzorcema iz prve linije (Slika 8). Vzorca iz prve linije sta genetsko najbližje referenčnemu sevu PCV 2d (99,7 – 99,8 % identičnost nukleotidnega zaporedja), vzorca iz druge linije pa referenčnemu sevu PCV 2b (98,4 – 99,8 % identičnost nukleotidnega zaporedja) (Slika 7).

Na drugem filogenetskem drevesu smo primerjali dva slovenska seva PCV 3, ki smo jima določili nukleotidno zaporedje celotnega genoma, vključili pa smo tudi oba referenčna seva (Slika 9). Vzorca PCV-3-SLO5/2019 in PCV-3-SLO6/2019 imata 99,0 % medsebojno identičnost, najbližje pa sta referenčnemu sevu za genotip PCV 3a, s katerim s katerim imata 98,9 % identičnost nukleotidov. Z referenčnim sevom PCV 3 CN Hunan 2 2006 imata slovenska seva zgolj 91,3 % identičnost nukleotidov (Slika 10).



Slika 7: Filogenetsko drevo, izrisano s programom MegAlign (DNASTAR, Lasergene), prikazuje medsebojno primerjavo sorodnosti na podlagi primerjave 1.767 nukleotidov štirih slovenskih sevov PCV 2 in osmih referenčnih sekvenc, ki predstavljajo posamezne PCV 2 genotipe.

Figure 7: Phylogenetic tree, constructed using program MegAlign (DNASTAR, Lasergene), shows a comparison of 1.767 nucleotides for four Slovenian PCV 2 strains and eight reference strains, representing individual PCV 2 genotypes.

odstotek identičnosti

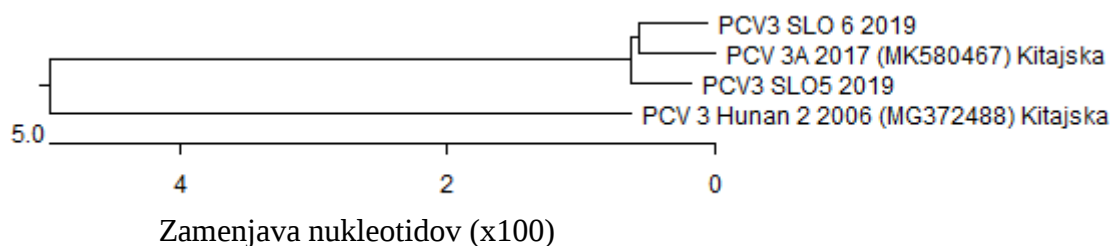
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1		99.8	96.1	96.0	95.3	96.2	94.6	99.8	92.5	95.5	96.5	96.8	1
2	0.2		96.2	96.0	95.4	96.3	94.7	99.7	92.4	95.5	96.5	96.7	2
3	4.0	4.0		98.5	96.2	99.8	95.4	96.2	91.7	96.1	95.8	96.7	3
4	4.1	4.1	1.5		96.2	98.4	95.1	96.1	92.4	96.2	96.2	96.5	4
5	4.9	4.8	3.9	4.0		96.4	95.0	95.4	91.7	95.9	96.0	96.4	5
6	3.9	3.8	0.2	1.7	3.7		95.5	96.3	91.9	96.3	96.0	96.8	6
7	5.9	5.9	5.2	5.5	5.5	4.9		94.7	92.9	95.2	95.0	95.2	7
8	0.2	0.3	4.0	4.0	4.8	3.8	5.9		92.6	95.6	96.6	96.8	8
9	7.8	7.8	9.0	8.3	8.8	8.8	7.8	7.7		92.0	93.4	92.0	9
10	4.6	4.7	4.0	4.0	4.2	3.8	5.1	4.5	8.4		95.7	96.0	10
11	3.6	3.6	4.3	3.9	4.1	4.1	5.4	3.5	6.9	4.6		95.8	11
12	3.3	3.4	3.4	3.6	3.7	3.3	5.2	3.2	8.4	4.1	4.4		12
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

razlika

PCV-2-SLO1-2019
 PCV-2-SLO2-2019
 PCV-2-SLO3-2019
 PCV-2-SLO4-2019
 PCV2A (AF055392) Kanada
 PCV2B (AF055394) Francija1998
 PCV2C (EU148503) Danska1980
 PCV 2D (HM038017) Kitajska 2010
 PCV 2E (KT870147) ZDA 2015
 PCV 2F (MF278778) Kitajska 1999
 PCV 2G (JX099786) Vietnam 2012
 PCV 2H (JX506730) Vietnam 2012

Slika 8: Prikaz identičnosti 1.767 nukleotidov v % za štiri slovenske seve in osem referenčnih sevov.

Figure 8: Percent of similarity between 1.767 nucleotides of four Slovenian PCV 2 strains and eight reference strains.



Slika 9: Filogenetsko drevo, izrisano s programom MegAlign (DNASTAR, Lasergene), prikazuje medsebojno primerjavo sorodnosti na podlagi primerjave 2.000 nukleotidov dveh slovenskih sevov PCV 2 in dveh referenčnih sekvenc, ki predstavljajo genotipa PCV 3.

Figure 9: Phylogenetic tree, constructed using program MegAlign (DNASTAR, Lasergene), shows a comparison of 2.000 nucleotides for two Slovenian PCV 3 strains and two reference strains, representing both PCV 3 genotypes.

odstotek identičnosti

		1	2	3	4	
razlika	1		99.0	98.9	91.3	1
	2	1.0		98.9	91.3	2
	3	1.1	1.1		91.2	3
	4	9.2	9.3	9.3		4
		1	2	3	4	

PCV3 SLO5 2019
 PCV3 SLO 6 2019
 PCV 3A 2017 (MK580467) Kitajska
 PCV 3 Hunan 2 2006 (MG372488) Kitajska

Slika 10: Prikaz identičnosti 2.000 nukleotidov v % za dva slovenska seva PCV 3 in dve referenčni sekvenci.

Figure 10: Percent of similarity between 2.000 nucleotides of two Slovenian PCV 3 strains and two reference strains.

4.8 PRIMERJAVA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ PCV 2 IN PCV 3 Z NAJBLEŽJIMI SEVI IZ GENSKE BANKE

Za namen izdelave filogenetske primerjave naših sevov in sevov iz tujine smo zaporedja celotnih genomov štirih pozitivnih vzorcev PCV 2 in dveh pozitivnih vzorcev PCV 3, ki smo jim določili nukleotidno zaporedje primerjali s sevi v genski banki. Pregledali smo 100 najbolj sorodnih sekvenc, za vsako ugotovili državo izvora in v filogenetsko primerjavo vključili po eno zaporedje iz vsake države. Pred izdelavo filogenetskega drevesa smo vsako sekvenco v programu EditSeq uredili tako, da se je začela z zaporedjem ori (angl. origin of replication). Na filogenetskem drevesu smo nato izvedli filogenetsko primerjavo zaporedjih celotnih genomov.

Pri izdelavi naše naloge smo sledili predlogu klasifikacije PCV 2, ki sta ga postavila Franco in Segales (2018). Pozitivni vzorci PCV 2 so se uvrstili v dva različna genotipa. Vzorca PCV-2-SLO3/2019 in PCV-2-SLO4/2019 sta se uvrstila v genotip PCV 2b, vzorca PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019 pa v genotip PCV 2d. V filogenetsko primerjavo smo vključili tudi številne seve iz tujine. V genotip PCV 2b so se poleg sevov PCV-2-SLO3/2019 in PCV-2-SLO4/2019 uvrstili tudi sevi iz Južne Koreje, Urugvaja, Ukrajine, Hrvaške, Kitajske, Nemčije, Japonske, Slovaške, Avstrije, Avstralije, Danske, Italije, Brazilije, Nizozemske, Srbije, Tajvana, Portugalske, Madžarske in en sev iz Karibov. V genotip PCV 2d so se poleg naših dveh vzorcev razvrstili še sevi iz Kitajske, Južne Koreje, Italije in ZDA (Slika 11).

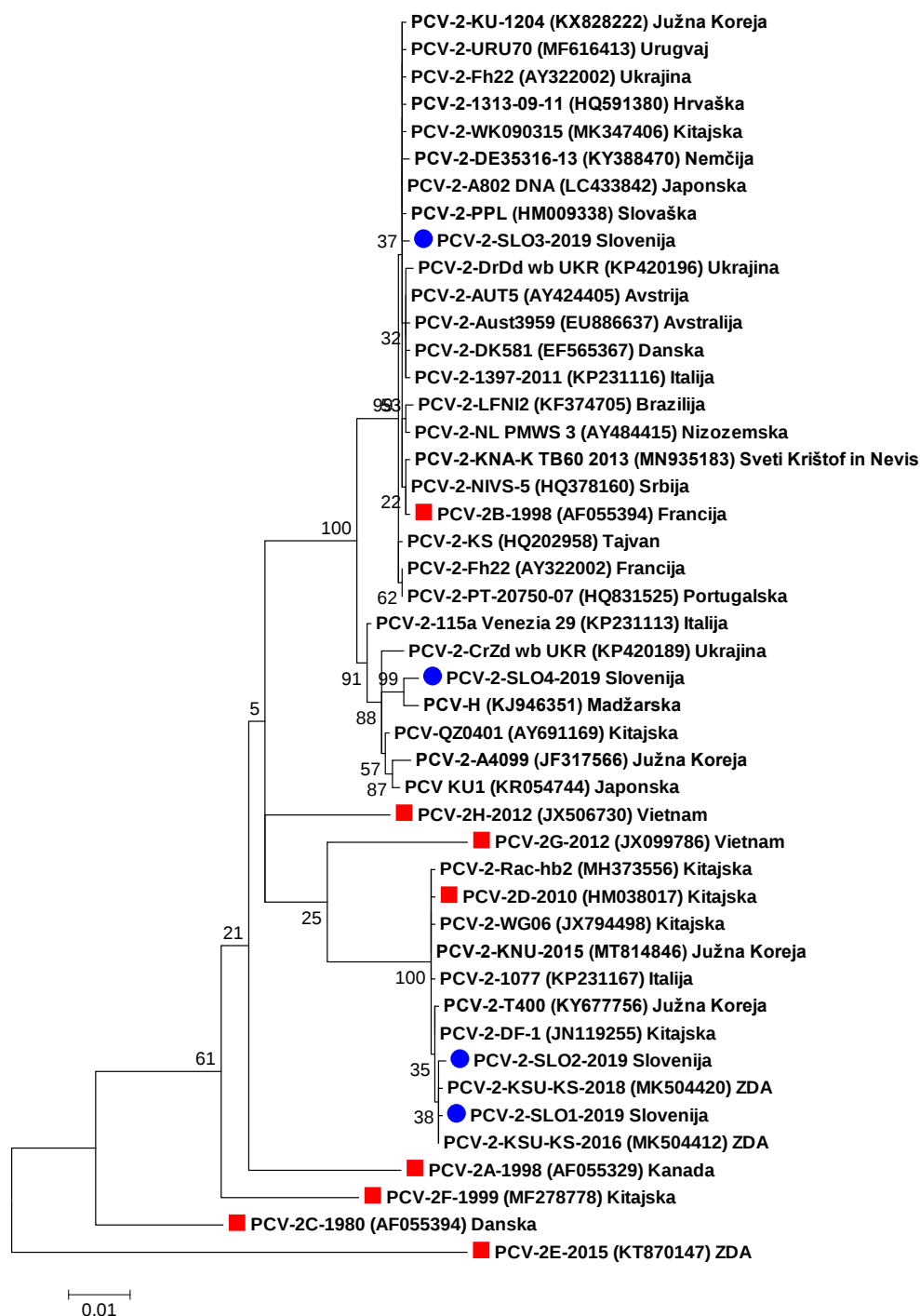
Naša seva PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019 imata z ostalimi sevi znotraj genotipa PCV 2d od 99,7 do 99,9 % identičnost zaporedja nukleotidov. Na filogenetskem sta najbližje sevu PCV-2-KSU-KS-2016 (MK504412) iz ZDA, s katerim imata 99,9 % identičnih nukleotidov.

Seva PCV-2-SLO3/2019 in PCV-2-SLO4/2019 imata drugimi sevi znotraj genotipa PCV 2b od 98,3 do 99,8 % identičnost zaporedja nukleotidov. PCV-2-SLO3/2019 je na filogenetskem drevesu najbližje sevu PCV-2-A802 DNA (LC433842) z Japonske, s katerim ima 99,9 % identičnost zaporedja nukleotidov, sev PCV-2-SLO4/2019 pa je najbližje sevu PCV-2-H (KJ946351) z Madžarske, s katerim ima 99,5 % identičnost zaporedja nukleotidov.

Slovenska seva PCV-3-SLO5/2019 in PCV-3-SLO6/2019 smo razvrstili glede na klasifikacijo, ki so jo predlagali Franco in sodelavci (2020). Naša pozitivna vzorca smo uvrstili v genotip PCV 3a. V navedeni genotip so se uvrstili tudi vsi ostali sevi iz ZDA, Danske, Nemčije,

Madžarske, Italije, Španije, Švedske, Rusije, Kitajske, Indije, Južne K-oreje, Tajvana, Brazilije, Kolumbije in Čila (Slika 13).

Seva PCV-3-SLO5/2019 in PCV-3-SLO6/2019 imata znotraj genotipa PCV 3a od 98,9 do 99,6 % identičnost nukleotidov s sevi iz tujine. Filogenetsko je sev PCV-3-SLO5/2019 je najbližje sevom PCV-3-95 (MK496293) iz ZDA, PCV-3-RU-TY17 (MG679916) iz Rusije, PCV-3-Chhattisgarh-SK1-2017 (MK934765) iz Indije, PCV-3-CN-Nanjing-2017 (MK580468) s Kitajske in PCV-3-COL-Valle-2018 (MT461292) iz Kolumbije, s katerimi ima 99,4 % identičnost zaporedja nukleotidov. Sev PCV-3-SLO6/2019 je najbližje sevu PCV-3-KSU-KS-2017-64 (MH603562) iz ZDA, s katerim ima 99,6 % identičnost zaporedja nukleotidov.



Slika 11: Filogenetska primerjava 1.767 nukleotidov štirih slovenskih sevov PCV 2 (označeni z modro) z najbližjimi sevi iz tujine. V filogenetsko drevo smo vključili tudi 8 referenčnih sevov za posamezen genotip PCV 2 (označeni z rdečo). Filogenetsko drevo je izdelano s programom MEGA.

Figure 11: Phylogenetic tree based on the comparison of 1,767 nucleotides of four Slovenian PCV 2 strains (marked with blue) with the nearest strains from abroad. Eight reference sequences for each PCV 2 genotype are also included (marked with red). Phylogenetic tree was constructed with MEGA program.



Slika 12: Filogenetska primerjava 2.000 nukleotidov dveh slovenskih sevov PCV 3 (označeni z modro) z najbližjimi sevi iz tujine. V filogenetsko drevo smo vključili tudi 2 referenčni sekvenci za posamezen genotip PCV 3 (označeni z rdečo). Filogenetsko drevo je izdelano s programom MEGA.

Figure 12: Phylogenetic tree based on the comparison of 2.000 nucleotides of two Slovenian PCV 3 strains (marked with blue) with the nearest strains from abroad. Two reference sequences for each PCV 3 genotype are also included (marked with red). Phylogenetic tree was constructed with MEGA program.

4.9 DOLOČITEV BRALNIH OKVIRJEV VIRUSOV PCV 2 IN PCV 3

V nukleotidnih zaporedjih vseh celotnih genomov PCV 2 in PCV 3 iz te študije smo določili tri bralne okvirje za ORF 1, ORF 2 in ORF 3 in jih primerjali med seboj.

4.9.1 Bralni okvir ORF 1

ORF 1 pri PCV 2 zajema 945 nukleotidov in se pri naših sevih začne na poziciji 58 ter konča na poziciji 1002. S primerjavo nukleotidnih zaporedij regij ORF 1 PCV 2 smo ugotovili visoko podobnost v nukleotidnem zaporedju bralnega okvirja med sevi. Najvišjo podobnost v nukleotidnem zaporedju ORF 1 smo ugotovili med sevoma PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019, ki je znašala 99,8 %, PCV-2-SLO4/2019 in PCV-2-SLO3/2019 sta si podobna v 97,9 %.

Regija ORF 1 PCV 2 obsega zaporedje 314 aminokislin. Najvišjo podobnost aminokislinskega zaporedja izkazujeta seva PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019, ki imata 99,7 % identičnost aminokislinskega zaporedja, PCV-2-SLO3/2019 in PCV-2-SLO4/2019 imata 99,0 % identičnostv aminokislinskem zaporedju. S PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019 si PCV-2-SLO3/2019 deli 98,4 in 98,7 % aminokislinskega zaporedja, PCV-2-SLO4/2019 pa 99,4 in 99,0 %.

Regija ORF 1 pri PCV 3 zajema 891 nukleotidov in se začne na poziciji 223 ter konča na poziciji 1113. Na 5' koncu se regija ORF 1 PCV3 začne z alternativnim GTC kodonom. Naša seva PCV-3-SLO5/2019 in PCV-3-SLO6/2019 imata v regiji ORF 1 99,6 % identičnost zaporedja nukleotidov.

Regija ORF 1 PCV 3 obsega zaporedje 296 aminokislin. Naša seva PCV-3-SLO5/2019 in PCV-3-SLO6/2019 si delita 99,3 % aminokislinskega zaporedja.

4.9.2 Bralni okvir ORF 2

ORF 2 je orientirana v obratni smeri kot ORF 1 in zajema različno število nukleotidov. Pri slovenskih sevih PCV 2 se vse ORF 2 regije končajo na poziciji 1741, začetne pozicije pa so drugačne. Pri PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019 se regija ORF 2 začne na poziciji 1037 in zajema 705 nukleotidov, pri sevih PCV-2-SLO3/2019 in PCV-2-SLO4/2019 se začne na poziciji 1040 in zajema 702 nukleotida. Nukleotidno zaporedje ORF 2 PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019 izkazuje najvišjo podobnost v 99,9 %, nukleotidno zaporedje ORF 2 regije PCV-2-SLO3/2019 in PCV-2-SLO4/2019 pa 99,1 %. ORF 2 PCV-2-SLO3/2019 ima s PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019 94,4 in 94,3 % identičnost nukleotidnega zaporedja, ORF 2 PCV-2-SLO4/2019 pa ima s PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019 93,9 in 93,7 % identičnost nukleotidnega zaporedja.

Regija ORF 2 zajema tudi različno število aminokislin, ki pri sevih PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019 zajema zaporedje 234 aminokislin, pri sevih PCV-2-SLO4/2019 in PCV-2-SLO3/2019 pa 233 aminokislin. Najvišjo podobnost aminokislinskega zaporedja ORF 2 izkazuje PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019, ki imata 99,6 % identičnost zaporedja aminokislin. PCV-2-SLO4/2019 in PCV-2-SLO3/2019 imata 97,9 % identičnost aminokislinskega zaporedja. ORF 2 regija PCV-2-SLO3/2019 ima 94,0 in 93,6 % identičnost aminokislinskega zaporedja s PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019, medtem ko ima PCV-2-SLO4/2019 s PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019 91,8 in 91,4 % identičnost zaporedja aminokislin.

Regija ORF 2 PCV 3 obsega 645 nukleotidov in je orientirana v obratni smeri kot regija ORF 1. Regija ORF 2 se začne na poziciji 1343 in konča na poziciji 1987. Slovenska seva PCV-3-SLO5/2019 in PCV-3-SLO6/2019 imata 98,3 % identičnost zaporedja nukleotidov.

Regija ORF 2 PCV 3 ima zaporedje 214 aminokislin. PCV-3-SLO5/2019 in PCV-3-SLO6/2019 imata 97,2 % medsebojno identičnost aminokislinskega zaporedja.

4.9.3 Bralni okvir ORF 3

Regija ORF 3 PCV 2 je orientirana v smeri 3' – 5'. Zajema 315 nukleotidov in se začne na poziciji 364 ter konča na poziciji 678. Med preiskanimi slovenskimi sevi PCV 2 najvišjo podobnost izkazuje ORF 2 regiji PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019, ki imata 100,0 % identičnost nukleotidnega zaporedja. PCV-2-SLO3/2019 in PCV-2-SLO4/2019 sta si podobna v 99,0 % nukleotidov. PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019 imata 98,1 % identičnost nukleotidnega zaporedja s PCV-2-SLO3/2019, s PCV-2-SLO4/2019 pa 98,7 % identičnost.

Regija ORF 3 obsega zaporedje 104 aminokislin. Odstotek podobnosti aminokislinskega zaporedja je najvišji med PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019 in znaša 100,0 %, med PCV-2-SLO3/2019 in PCV-2-SLO4/2019 pa 98,1 %. Identičnost aminokislinskega zaporedja ORF 3 PCV-2-SLO3/2019 s PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019 je 95,2 %, identičnost aminokislinskega zaporedja PCV-2-SLO4/2019 s PCV-2-SLO1/2019 in PCV-2-SLO2/2019 pa 96,2 %.

Regije ORF 3 pri PCV 3 nismo določili.

Na podlagi posameznih regij ORF pri PCV 2 in PCV 3 smo naredili filogenetsko primerjavo naših sevov z vzorci iz tujine. Filogenetska drevesa na podlagi ORF regij so prikazana v Prilogah 1 do 5.

V Prilogah 6 in 7 smo prikazali dolžine nukleotidov celotnih genomov in posameznih ORF regij ter dolžine aminokislin za posamezne proteine, ki jih regije kodirajo za vse naše seve PCV 2 in PCV 3 ter posamezne referenčne seve.

Nukleotidna zaporedja celotnih genomov štirih vzorcev PCV 2 in dveh vzorcev PCV 3 so prikazana v Prilogah 8 in 9.

5 RAZPRAVA

Prašičji cirkovirus 2 velja za enega najpomembnejših patogenov v prašičereji in povzroča velike ekonomske škode. Od prve potrditve virusa konec 90-ih let prejšnjega stoletja so države z dobro razvito prašičerejo vlagale velike napore v ugotavljanje in obvladovanje okužb in raziskave z namenom izboljšanja zdravstvenega stanja živali in zmanjšanja ekonomskih škod. Od leta 2015 poznamo tudi okužbe s PCV 3, od leta 2019 pa tudi PCV 4 in čeprav njun vpliv na patogenezo ni natančno razjasnjen, se države prav tako usmerjajo v njuno preučevanje. Namen naše raziskovalne naloge je bil ugotoviti prevalenco PCV 2 in PCV 3 med domačimi in divjimi prašiči v Sloveniji ter določiti in tipizirati nekatere celotne genome PCV 2 in PCV 3 iz posameznih pozitivnih vzorcev.

Z uporabo komercialnega kita Bio-T kit PCV2 & PCV 3 (Biosellal, Francija) za dokazovanje genoma PCV 2 in PCV 3 z metodo PCR v realnem času smo v tej študiji preiskali 131 vzorcev suspenzij organov domačih in divjih prašičev. Prvič smo prisotnost PCV 3 ugotovili pri divjem prašiču iz občine Koper (vzorec 7) 14. novembra 2019, pri domačem prašiču pa smo PCV 3 prvič potrdili 21. novembra 2019 pri prašiču, ki je izviral iz občine Cankova (vzorec 13). Ker pred tem v Sloveniji ni bilo poročil o prisotnosti PCV 3, smo na njegovo prisotnost opozorili slovensko veterinarsko javnost v članku z naslovom »Prvi dokaz prisotnosti okužb s PCV 3 pri domačih in divjih prašičih v Sloveniji«, objavljenem v Vestniku Veterinarske zbornice Slovenije (Šteferl in Toplak, 2020). Neodvisno od nas, vendar sočasno so Plut in sodelavci (2020) poročali o prisotnosti PCV 3 v rejah domačih prašičev v Sloveniji, kjer so z metodo PCR v realnem času ugotovili prisotnost nukleinske kisline PCV 3 v 73,5 % preiskanih vzorcev ustne tekočine, 23,5 % preiskanih iztrebkov in 13,1 % preiskanih serumskih vzorcih. S tem smo Slovenijo uvrstili na seznam številnih držav, ki so že poročale o pojavljanju PCV 3 v populaciji svojih prašičev. PCV 2 so pri domačih in divjih prašičih v Sloveniji z uporabo metode multiplex PCR prvič potrdili že leta 2002 (Toplak in sod., 2002, Toplak in sod., 2004). Študije o prisotnosti in prevalenci PCV 2 in PCV 3 v Sloveniji so maloštevilne, zato bi bilo v prihodnosti smiselno bolj natančno spremljati njuno prisotnost v slovenskih prašičjih čredah, hkrati pa bi morali biti pozorni na pojavljanje novega PCV 4, čigar vpliv na zdravje prašičev zaenkrat še ni razjasnjen.

V raziskovalni nalogi smo določali prevalenco PCV 2 in PCV 3 pri domačih in divjih prašičih v Sloveniji. V študiji smo preiskali skupaj 131 vzorcev, od tega 88 vzorcev domačih prašičev

in 43 vzorcev divjih prašičev iz 71 različnih slovenskih občin, kar je največja tovrstna študija. Prisotnost virusnega genoma PCV 2 smo ugotovili pri 68,2 % domačih prašičev. Rezultati nam kažejo na zelo visoko prevalenco okužb s PCV 2 pri domačih prašičih v Sloveniji. Iz tega lahko upravičeno zatrdimo, da je PCV 2 med slovenskimi prašiči endemično prisoten. O visoki prevalenci okužb s PCV 2 med domačimi prašiči poročajo tudi iz drugih držav. Na Kitajskem je metaanaliza med letoma 2015 in 2019 ugotovila 46,0 % prevalenco PCV 2 (Liu in sod., 2019). V isti študiji avtorji ugotavljajo tudi, da je prevalenca PCV 2 med domačimi prašiči vztrajno naraščala in je pred letom 2015 znašala 32,3 %, med letoma 2015 in 2017 je znašala 42,3 %, po letu 2017 pa je narasla že na 51,9 %. V naši bližini Reiner in sodelavci (2010) poročajo o 100 % prevalenci PCV 2 med domačimi prašiči v Nemčiji, podobno se domneva tudi za domače prašiče v Avstriji (Weissenbacher-Lang in sod., 2020). Pri divjih prašičih smo prisotnost genoma PCV 2 ugotovili v 18,6 %. Poročila o prevalenci PCV 2 med divjimi prašiči se razlikujejo. Reiner in sodelavci (2010) so z metodo nested PCR genom PCV 2 ugotovili v 63,1 % preiskovanih divjih prašičih v Nemčiji, z metodo PCR v realnem času pa v zgolj 45,4 %, dočim so raziskovalci iz Južne Koreje poročali o precej nizki prevalenci PCV 2 med divjimi prašiči, ki je znašala samo 4,98 % (An in sod., 2014).

Prisotnost virusnega genoma PCV 3 smo potrdili pri 22,7 % domačih prašičev. Podoben odstotek PCV 3 pozitivnih domačih prašičev so ugotovili na Kitajskem med letoma 2016 in 2019, kjer so potrdili 29,3 % prevalenco (Ha in sod., 2020) ter na ameriškem srednjem zahodu, kjer so med letoma 2016 in 2018 ugotovili 28,4 % prevalenco PCV 3 (Wang in sod., 2020). Pri 34,9 % preiskanih vzorcev slovenskih divjih prašičev smo ugotovili prisotnost nukleinske kisline PCV 3. Višji odstotek pozitivnih divjih prašičev sovпада s trditvijo nekaterih avtorjev, da le ti predstavljajo naravni rezervoar PCV 3 (Franzo in sod., 2018; Klaumann in sod., 2019).

Ker lahko s komercialnim kitom Bio-T kit PCV2 & PCV 3 (Biosellal, Francija) hkrati ugotavljamo prisotnost PCV 2 in PCV 3 v istem vzorcu, smo ugotavljali tudi, koliko slovenskih prašičev je hkrati okuženih z obema patogenoma. Sočasno okužbo s PCV 2 in PCV 3 smo ugotovili v 15,9 % preiskanih domačih prašičih in v 18,6 % preiskanih divjih prašičih. Poročila o prevalenci sočasnih okužb se razlikujejo in se gibajo od 1,26 do 61,54 % (Ouyang in sod., 2019a). Zanimivo je, da smo pri vseh divjih prašičih, pozitivnih na PCV 2, dokazali tudi sočasno okužbo s PCV 3. Naši rezultati nakazujejo na to, da so sočasne okužbe s PCV 2 in PCV3 pri naših domačih in divjih prašičih kar pogoste.

V naši nalogi smo se odločili razširjenost PCV 2 in PCV 3 tudi geografsko prikazati. Večina tujih avtorjev pri poročanju o geografski razširjenosti uporablja regije ali zvezne dežele posameznih držav. V Sloveniji je 12 statističnih regij, ki so glede na celotno ozemlje precej velike, iz tega razloga se nam predstavljanje rezultatov razširjenosti PCV 2 in PCV 3 po regijah ni zdelo smiselno, ker ne bi odražalo realne slike. Zaradi čim natančnejšega prikaza smo se odločili, da bomo razširjenost PCV 2 in PCV 3 prikazali po občinah, ki so bolj številčne od regij in obsegajo manjšo površino. To je hkrati tudi prvi geografski prikaz razširjenosti PCV 2 in PCV 3 pri domačih in divjih prašičih v Sloveniji. Od skupno 212 slovenskih občin smo prisotnost PCV 2 pri domačih prašičih potrdili v 40 občinah. PCV 2 je dobro zastopan v osrednji, jugovzhodni in vzhodni Sloveniji, predvsem v Podravju in Pomurju, kjer se tudi sicer tradicionalno vzredi največ prašičev. Največ pozitivnih prašičev smo ugotovili v občini Apače. V zahodni Sloveniji, z izjemo občin Gorenja vas – Poljane, nismo ugotovili okužb s PCV 2, kar pa nikakor ne pomeni, da je ta del Slovenije prost PCV 2. Prisotnost PCV 3 pri domačih prašičih smo ugotovili v 18 občinah, razširjenost pa je v grobem podobna tisti pri PCV 2. Največ pozitivnih prašičev smo tudi v tem primeru ugotovili v pomursko-podravskem območju, sledi pa jima jugovzhodni del Slovenije. Glede na naše rezultate lahko zaključimo, da sta PCV 2 in PCV 3 dobro razširjena v rejah domačih prašičev v Sloveniji.

Razširjenost PCV 2 in PCV 3 smo prikazali tudi pri slovenskih divjih prašičih. PCV 2 smo dokazali v petih, PCV 3 pa v osmih občinah. V obeh primerih so skoraj vsi naši pozitivni vzorci omenjeni na jugozahodno Slovenijo oziroma Primorsko regijo. Največ PCV 2 in PCV 3 pozitivnih vzorcev prihaja iz občine Koper, le dva pozitivna vzorca smo potrdili izven Primorske in sicer v občinah Ljubljana in Laško. Populacija divjega prašiča je v Sloveniji najštevilčnejša prav na Primorskem, v večjem številu pa jih najdemo tudi na Kočevskem, Zasavju, delih Štajerske in v Prekmurju. Podatek o razširjenosti PCV 2 in PCV 3 je pomemben predvsem z epizootiološkega vidika, saj lahko divji prašiči predstavljajo vir okužb za domače prašiče. Predvsem to velja za PCV 3, divji prašiči namreč najverjetneje pomenijo rezervoar PCV 3 v naravi.

Pri 30 naključno izbranih vzorcih domačih in divjih prašičih smo določili število kopij virusnega genoma PCV 2 in PCV 3. Pri vzorcih, pozitivnih na PCV 2 smo ugotovili, da se število kopij med vzorci močno razlikuje. Najnižjo število kopij smo ugotovili pri domačem prašiču iz Gornje Radgone (vzorec 42), kjer smo ugotovili 168,3 kopije virusnega genoma PCV 2. Ugotovili smo kar nekaj močno pozitivnih vzorcev, ki so vsebovali preko milijon kopij

virusnega genoma PCV 2, največje število kopij pri domačem prašiču smo ugotovili pri prašiču iz občine Ljutomer (vzorec 5), pri katerem smo dokazali 36.040.000 kopij, pri divjem prašiču pa smo največje število kopij virusnega genoma ugotovili pri vzorcu 83, ki zelo močno odstopa od ostalih preiskanih vzorcev. V tem primeru gre za vzorec divjega prašiča iz občine Ilirska Bistrica, pri katerem smo dokazali kar 431.300.000 kopij virusnega genoma PCV 2. Do danes so številne študije ugotovile, da je večje število virusnih genomov povezano s pojavom klinične bolezni pri obolelih prašičih. Brunborg in sodelavci (2004) so leta 2003 določali število virusnih kopij v tkivnih vzorcih in vzorcih seruma prašičev na dveh prašičjih farmah na Norveškem, kjer so se pojavili klinični znaki PMWS. Število kopij pri zdravih prašičih so primerjali s številom kopij pri bolnih prašičih, pri čemer so ugotovili očitno razliko. Pri nobenem od zdravih prašičev število kopij virusnega genoma PCV 2 ni preseglo 10^6 / ml seruma ali 500 ng tkiva, medtem, ko je pri vseh prašičih s kliničnimi znaki PMWS število kopij virusnega genoma preseglo 10^7 / ml seruma ali 500 ng tkiva. Glede na to, da je PCV 2 prisoten v večini rej prašičev, bi lahko na podlagi ugotavljanja virusnega bremena ločevali zdrave od bolnih prašičev. Olvera in sodelavci (2004) ugotavljajo, da večje virusno breme pomeni tudi težje klinične znake PMWS. Segales in sodelavci (2005) so preiskovali traheo-bronhialne, tonzilarne, nazalne, fekalne in urinske brise pri domačih prašičih, ki so jih razdelili v tri kategorije: v kategorijo A so uvrstili prašiče s kliničnimi znaki PMWS, v kategorijo B so uvrstili subklinično okužene prašiče, v kategorijo C pa zdrave prašiče. Pri klinično bolnih prašičih (kategorija A) so ugotovili statistično značilno večje število kopij virusnega genoma, kot pri prašičih brez PMWS (kategoriji B in C). Pri prašičih s kliničnimi znaki PDNS pa so opazili nižje količine virusnega genoma PCV 2, kar pomeni, da kljub temu, da PCV 2 igra vlogo pri patogenezi PDNS, sama količina virusa nima bistvenega pomena (Olvera in sod., 2004). Iz naših vzorcev smo pričakovano ugotovili, da se število kopij virusnega genoma med prašiči razlikuje in da nekaj vzorcev močno odstopa od ostalih, vendar pa zgolj na podlagi naših rezultatov ne moremo povezati števila kopij virusnega genoma z morebitno boleznijo pri posamezni živali. Podatkov o kliničnem stanju in poteku bolezni poginjenih prašičev namreč nimamo, prav tako nimamo podatkov o posamezni reji. Menim, da bi bilo smiselno opraviti pregled stanja cirkoviroze v rejah, kjer smo ugotovili prašiče z velikim številom kopij virusnega genoma v vzorcih in po potrebi izvesti sanacijo.

Pri pozitivnih vzorcih na PCV 3 smo v primerjavi s PCV 2 ugotovili precej manjša števila kopij virusnega genoma, od 7,20 pa do 12.910. Ker patogeneza PCV 3 še ni popolnoma razjasnjena,

ne obstajajo študije, ki bi količino virusa povezala s kakršnokoli klinično sliko. Zanimivo pa je, da tudi v tem primeru po številu kopij virusnega genoma izstopa vzorec 83, pri katerem smo ugotovili tudi veliko število kopij PCV 2.

Za potrebe določanja celotnih genomov smo na sekvenciranje poslali pet vzorcev PCV 2 in pet vzorcev PCV 3. Sekvenciranje je uspelo pri štirih vzorcih PCV 2, pri PCV 3 pa smo nukleotidno zaporedje celotnega genoma določili v samo dveh. Pri enem vzorcu PCV 2 in treh vzorcih PCV 3 smo dobili samo delno zaporedje genoma, zato smo se odločili, da jih v raziskovalno nalogo ne vključimo. Za pomnoževanje genoma PCV 3 smo uporabili protokol, ki so ga opisali Wen in sodelavci (2018). Po pomnoževanju produktov za PCR 2 nismo dobili. Zato smo namesto oligonukleotidnih začetnikov PCR 2F in PCR 2R skonstruirali štiri nove oligonukleotidne začetnike in tako določili ta manjkajoči del genoma. Za cirkoviruse je značilna krožna molekula DNA, zato se sekvence PCV 2 in PCV 3, ki so dostopni v genski banki ne začenjajo na isti poziciji, kar pa bi lahko povzročalo zmedo pri raziskovalcih. Mi smo slovenske seve vedno začenjali na isti poziciji, to je z zaporedjem ori (angl. origin of replication), ki predstavlja začetek pomnoževanja in je značilno za posamezen cirkovirus pri prašičih (Cheung, 2006; Palinski in sod., 2016; Zhang in sod., 2020). V izogib zmedi pri raziskovanju menim, da bi morali v bodoče raziskovalci doseči konsenz glede objavljane sekvenc prašičjih cirkovirusov v gensko banko, predvsem z upoštevanjem zaporedja ori.

V literaturi najdemo številne predloge klasifikacij PCV 2 in PCV 3 v različne genotipe. Sprva so na podlagi filogenetskih primerjav ORF 2 regije virusnega genoma PCV 2 razdelili v tri genotipe: PCV 2a, PCV 2b in PCV 2c (Segales in sod., 2008). Število novoodkritih genotipov se je sčasoma povečevalo z določitvijo genotipa PCV 2d na Kitajskem (Guo in sod., 2010), genotipa PCV 2e v Združenih državah Amerike (Davies in sod., 2016) in genotipa PCV 2f na Kitajskem (Bao in sod., 2018). Najnovejša klasifikacija PCV 2 določa osem genotipov, od PCV 2a do PCV 2h (Franzo in Segales, 2018).

Čeprav je PCV 3 v čredah prašičev prisoten šele nekaj let, je v bilo do danes predlaganih kar nekaj klasifikacij. Seve PCV 3 so Fu in sodelavci (2017) razdelili v tri genotipe, PCV 3a, PCV 3b in PCV 3c, nekateri raziskovalci pa v dva genotipa, PCV 3a in PCV 3b (Li in sod., 2018; Franco, 2018; Fux in sod., 2018). V želji po vzpostavitvi enotne klasifikacije, so Franco in sodelavci (2020) predlagali zgolj en genotip, PCV 3a, dve sekvenci pa so uvrstili v ločeno klado, ki zaenkrat še ni poimenovana. V naši raziskovalni nalogi smo se odločili, da PCV 2 in

PCV 3 razvrstimo v genotipe na podlagi najnovejših predlaganih klasifikacij (Franzo in Segales, 2018; Franzo in sod., 2020).

Z določitvijo prvih štirih celotnih genomov pri štirih sevih PCV 2 iz Slovenije smo ugotovili, da se naši sevi uvrščajo v dva genotipa. Slovenska seva PCV-2-SLO1-2019 in PCV-2-SLO2-2019 smo uvrstili v genotip PCV 2d, seva PCV-2-SLO3-2019 in PCV-2-SLO4-2019 dva pa v genotip PCV 2b. V genotip PCV 2b se poleg dveh slovenskih sevov uvrščajo tudi sevi, ki so bili ugotovljeni v Južni Koreji, Urugvaju, Ukrajini, na Hrvaškem, na Kitajskem, v Nemčiji, na Japonskem, na Slovaškem, v Avstriji, v Avstraliji, na Danskem, v Italiji, v Braziliji, na Nizozemskem, na Karibih, v Srbiji, v Franciji in na Tajvanu. Med sevi znotraj genotipa PCV 2b ugotavljamo visoko homolognost nukleotidnega zaporedja, od 98,3 do 99,9 %. V genotip PCV 2d smo poleg naših sevov uvrstili še seve, ugotovljene na Kitajskem, v Italiji, v Južni Koreji in v Združenih državah Amerike. Homolognost nukleotidnega zaporedja znotraj tega genotipa je v tem primeru še višja kot pri PCV 2b in znaša od 99,7 do 99,9 %. Visoka homolognost slovenskih sevov PCV 2 s sevi iz tujine nam nakazuje, da so sevi, ki so prisotni v Sloveniji, sorodni tistim, o katerih poročajo izven naših meja. Pred leti je med prašiči v Sloveniji prevladoval genotip PCV 2b (Toplak in sod., 2012), od takrat pa ni bilo izvedenih študij, ki bi določale kateri genotip prevladuje. Med letoma 2010 in 2015 je PCV 2b kot prevladujoči genotip izpodrinil genotip PCV 2d (Franzo in Segales, 2018), kar je bila verjetno posledica masovnega cepljenja prašičev proti cirkovirozi. Da bi ugotovili, kateri PCV 2 genotip prevladuje danes v Sloveniji, bi morali tipizirati precej več sevov iz različnih rej iz različnih delov Slovenije, kar bi bilo smiselno ugotavljati v eni izmed prihodnjih študij.

Z določitvijo prvih dveh celotnih genomov PCV 3 iz Slovenije smo seva PCV-3-SLO5-2019 in PCV-3-SLO6-2019 uvrstili v genotip PCV 3a. V obeh primerih gre za seva, ki smo ju ugotovili pri divjih prašičih. Poleg slovenskih sevov smo v genotip PCV 3a uvrstili tudi seve iz Rusije, Južne Koreje, Indije, Nemčije, Združenih držav Amerike, Španije, Brazilije, Danske, Kolumbije, Tajvana, Kitajske, Madžarske, Čila, Italije in Švedske. Znotraj genotipa PCV 3a smo ugotovili 98,9 do 99,9 % homolognost nukleotidnih zaporedij. Sev PCV-3 Hunan 2-2006 (MG372488) smo uporabili kot referenčno sekvenco za ločeno klado, ki zaenkrat še ni priznana kot ločen genotip, saj vsebuje samo dva do zdaj poznana seva (Franzo in sod., 2020), s sevi, ki smo jih uvrstili v genotip PCV 3a pa si deli od 91,1 do 91,6 % identičnost nukleotidov. Tudi v primeru slovenskih sevov PCV 3 smo ugotovili, da so ti zelo podobni tistim, ki se pojavljajo pri prašičih v tujini.

Vsem štirim našim sevom PCV 2 smo določili nukleotidno in aminokislinsko zaporedje treh glavnih odprtih bralnih okvirjev (ORF) ter jih na podlagi nukleotidnega zaporedja na filogenetskem drevesu primerjali s homolognimi bralnimi okvirji sevov iz tujine (Priloge 1 do 3). Med primerjanimi ORF 1 smo ugotovili 96,9 do 100 %, med primerjanimi ORF 2 od 82,5 do 100 % in med primerjanimi ORF 3 97,1 do 100 % identičnosti nukleotidnega zaporedja. Filogenetsko drevo za regijo ORF 2 je precej podobno filogenetskemu drevesu celotnih genomov PCV 2, zato se za tipizacijo sevov PCV 2 lahko uporablja samo nukleotidno zaporedje te regije (Franz in Segales, 2018). Tipizacija na podlagi nukleotidnega zaporedja regije ORF 2 predstavlja bolj enostavno in manj zamudno metodo razvrščanja sevov PCV 2 v pripadajoč genotip, zato bi bilo v prihodnosti smiselno izvesti tovrstno tipizacijo večjega števila sevov, da bi ugotovili, kateri genotip prevladuje pri prašičih v Sloveniji.

Tudi našima sevoma PCV 3 smo določili nukleotidno in aminokislinsko zaporedje dveh glavnih regij ORF 1 in ORF 2 in ju na podlagi nukleotidnega zaporedja primerjali s sevi iz tujine (Priloge 4 in 5). Primerjane ORF 1 regije so pokazale 99,3 do 100 %, primerjane ORF 2 regije pa od 98,0 do 100 % identičnosti nukleotidnega zaporedja. Močno odstopanje smo ugotovili pri PCV-3 Hunan 2-2006 (MG372488), ki z ostalimi sevi izkazuje od 93,3 do 94,6 % homolognost v regiji ORF 1, ter od 86,8 do 87,9 % homolognost v regiji ORF 2. Zaradi velike homolognosti sta obe filogenetski drevesi za ORF 1 in ORF 2 zelo podobni filogenetskemu drevesu celih genomov PCV 3. Regije ORF 3 pri PCV 3 v naši nalogi nismo določali, saj bralni okvir te kodirajoče regije še ni natančno določen. Pri regiji ORF 3 tudi start kodon ni poznan. Alternativni iniciacijski kodon, ki kodira aminokislino sarin (TCG) bi rezultiral v proteinu z 231 aminokislinami, drugi kodon, ki kodira aminokislino metionin (ATG) pa bi rezultiral v proteinu s 177 aminokislinami (Palinski in sod., 2016).

Dolžine nukleotidnih zaporedij celotnih genomov ter nukleotidna in aminokislinska zaporedja vseh treh odprtih bralnih okvirjev slovenskih sevov PCV 2 in PCV 3 in referenčnih sevov posameznega genotipa smo zaradi lažje preglednosti prikazali v dveh tabelah, ki sta prikazani na koncu naloge (Priloge 6 in 7).

Zaključimo lahko, da smo cilje, ki smo si jih zastavili v raziskavi, v celoti izpolnili. Z metodo PCR v realnem času smo ugotovili in prikazali razširjenost PCV 2 in PCV 3 med domačimi in divjimi prašiči v Sloveniji, določili smo prva nukleotidna zaporedja celotnih genomov PCV 2 in PCV 3, kar nam sicer ni uspelo pri vseh izbranih vzorcih, najverjetneje zaradi premajhnega

števila kopij v pozitivnih vzorcih. Dobljena nukleotidna zaporedja naših sevov smo primerjali z najbližjimi vzorci v genski banki in jih tudi ustrezno tipizirali. Prav tako smo pri izbranih vzorcih uspešno določili število kopij virusnih genomov PCV 2 in PCV 3. Naša raziskovalna naloga po dolgem času predstavlja prvo temeljitejšo študijo o prisotnosti PCV 2 v Sloveniji, hkrati pa je ena prvih, v kateri poročamo o prisotnosti PCV 3.

Cirkoviroza je ena ekonomsko najpomembnejših bolezni v rejah prašičev, zato bi jo mogli tudi v Sloveniji spremljati bolj podrobno. V razpravi smo izpostavili nekaj izhodišč, katerim bi se bilo v prihodnosti smiselno posvetiti. Naše raziskave s tem delom ne zaključujemo, pač pa jo bomo nadaljevali in po možnosti še poglobili, njene rezultate pa imamo namen objaviti v ugledni znanstveni reviji.

6 SKLEPI

- V Sloveniji smo prvič ugotavljali in uspešno dokazali prisotnost nukleinske kisline PCV 3 pri domačih in divjih prašičih.
- Z metodo PCR v realnem času za dokazovanje prisotnosti nukleinskih kislin PCV 2 in PCV 3 smo preiskali 88 vzorcev poginjenih domačih in 43 divjih prašičev. Prisotnost PCV 2 smo ugotovili pri 68,2 % domačih in 18,6 % divjih prašičih, PCV 3 pa pri 22,7 % domačih in 34,9 % divjih prašičih.
- Razširjenost PCV 2 in PCV 3 smo geografsko prikazali po Sloveniji, z razdelitvijo po slovenskih občinah. PCV 2 in PCV 3 sta pri domačih prašičih dobro razširjena v vzhodni in jugovzhodni regiji, pri divjih pa smo večino pozitivnih vzorcev PCV 2 in PCV 3 ugotovili na Primorskem.
- Sočasno okužbo s PCV 2 in PCV 3 smo ugotovili pri 15,9 % domačih in 18,6 % divjih prašičih. Vsi divji prašiči, pozitivni na PCV 2 so bili pozitivni tudi na PCV 3.
- 30 pozitivnim vzorcem smo s kvantitativno metodo PCR v realnem času določili število kopij virusih genomov PCV 2 in PCV 3. Ugotovili smo, da se število kopij med PCV 2 pozitivnimi vzorci močno razlikuje. Ugotovljeno število kopij PCV 2 se je pri pozitivnih vzorcih gibalo med 168,3 in 431.300.000, število kopij PCV 3 pa med 7,20 in 12.910.
- Štirim pozitivnim vzorcem PCV 2 in dvema pozitivnima vzorcema PCV 3 smo uspešno določili nukleotidno zaporedje celotnega genoma v dolžini 1.767 oziroma 2.000 nt.
- Vseh šest sevov smo tipizirali na podlagi primerjave nukleotidnega zaporedja celotnega genoma. Dva seva PCV 2 smo uvrstili v genotip PCV 2b, druga dva seva PCV 2 v genotip PCV 2d. Oba seva PCV 3 smo uvrstili v genotip PCV 3a.
- Med tipiziranimi slovenskimi sevi PCV 2 smo ugotovili 96,0 do 99,8 % identičnost zaporedja nukleotidov, med sevoma PCV 3 pa 99,0 %. Znotraj genotipa PCV 2b smo ugotovili 98,3 do 99,8 % homolognost slovenskih sevov s sevi iz tujine, znotraj genotipa PCV 2b pa 99,7 do 99,9 %. Slovenska seva, ki smo ju uvrstili v genotip PCV 3a, sta s sevi iz tujine imela od 98,9 do 99,6 % identičnosti zaporedja nukleotidov.

7 ZAHVALE

Najlepše se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Ivanu Toplaku, dr. vet. med., za vse nasvete, pomoč, čas in dobro mero potrpežljivosti, ki mi jih je namenil tekom izdelave te raziskovalne naloge. Dragoceno znanje in izkušnje, ki sem jih pridobil pod njegovim okriljem, mi bodo nedvomno koristili na moji karierni poti.

Iskreno se zahvaljujem tudi dr. Danijeli Rihtarič dr. vet. med., Lauri Šimenc, dr. vet. med., Patriciji Tandari, Nataliji Novak in Poloni Žagar za vso pomoč in dobro voljo pri delu v laboratoriju. Hvala tudi prof. dr. Petru Hostniku, dr. vet. med., za prijetne pogovore na hodniku Enote za virologijo.

Hvala izr. prof. dr. Marini Štukelj, dr. vet. med in asist. Janu Plutu, dr. vet. med., za posredovano literaturo in podatke ter mag. Giti Grecc Smole za pomoč pri navajanju literature.

Zahvala gre tudi družini, sošolcem in prijateljem, ki so me spodbujali in z zanimanjem spremljali moje raziskovalno delo ter Urški, ki mi je ves čas stala ob strani.

8 LITERATURA

- Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10(1): 3–10
- An DJ, Lim SI, Kim YK, et al. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 in the Korean wild boar population. *Vet Microbiol* 2014; 169(3/4): 147–53.
- Baekbo P, Kristensen CS, Larsen LE. Porcine circovirus diseases: a review of PMWS. *Transbound Emerg Dis* 2012; 59 (Suppl 1): 60–7.
- Bao F, Mi S, Luo Q, et al. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV2f. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65(2): 432–40.
- Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A, Ictv Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Circoviridae. *J Gen Virol* 2017; 98(8): 1997–8.
- Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods* 2004; 122(2): 171–8.
- Chae C. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: efficacy and clinical application. *Vet J* 2012; 194(2): 151–7.
- Cheung AK. Rolling-circle replication of an animal circovirus genome in a theta-replicating bacterial plasmid in *Escherichia coli*. *J Virol* 2006; 80(17): 8686–94.
- Cheung AK. Specific functions of the Rep and Rep' proteins of porcine circovirus during copy-release and rolling-circle DNA replication. *Virology* 2015; 481: 43–50.
- Cockerill FR. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 1112–20.
- Cortey M, Segalés J. Low levels of diversity among genomes of Porcine circovirus type 1 (PCV1) points to differential adaptive selection between Porcine circoviruses. *Virology* 2012; 422(2): 161–4.
- Cságola A, Kecskeméti S, Kardos G, Kiss I, Tuboly T. Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Arch Virol* 2006; 151(3): 495–507.

Davies B, Wang X, Dvorak CM, Marthaler D, Murtaugh MP. Diagnostic phylogenetics reveals a new Porcine circovirus 2 cluster. *Virus Res* 2016; 217: 32–7.

Deng J, Li X, Zheng D, et al. Establishment and application of an indirect ELISA for porcine circovirus 3. *Arch Virol* 2018; 163(2): 479–482.

Dennehy PH. Rotavirus infection: A disease of the past? *Infect Dis Clin North Am* 2015; 29(4): 617–35.

Denner J, Mankertz A. Porcine circoviruses and xenotransplantation. *Viruses* 2017; 9(4): e83 (13 str.).
doi: 10.3390/v9040083

Drolet R, Thubault S, D'Allaire S, et al. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): an overview of the disease. *Swine Health Prod* 1999; 7(6): 283–5.

Ellis J, Hassard L, Clark E, et al. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J* 1998; 39(1): 44–51.

Esona MD, Mijatovic-Rustempasic S, Yen C, et al. Detection of PCV-2 DNA in stool samples from infants vaccinated with RotaTeq®. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10(1): 25–32.

FAOSTAT. Live animals. Rome : Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 2020.

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize> (20.6.2021)

Fenaux M, Halbur PG, Gill M, Toth TE, Meng XJ. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J Clin Microbiol* 2000; 38(7): 2494–503.

Franzo G, Delwart E, Fux R, et al. Genotyping porcine circovirus 3 (PCV-3) nowadays: does it make sense? *Viruses* 2020;12(3): e265 (13 str.)
doi: 10.3390/v12030265

Franzo G, Legnardi M, Hjulsager CK, et al. Full-genome sequencing of porcine circovirus 3 field strains from Denmark, Italy and Spain demonstrates a high within-Europe genetic heterogeneity. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65(3): 602–6.

Franzo G, Segalés J. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *PLoS One* 2018; 13(12): e0208585 (12 str.)
doi: 10.1371/journal.pone.0208585

Fu X, Fang B, Ma J, et al. Insights into the epidemic characteristics and evolutionary history of the novel porcine circovirus type 3 in southern China. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65(2): e296–303
doi: 10.1111/tbed.12752

Fux R, Söckler C, Link EK, et al. Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains. *Virol J* 2018; 15(1): e25 (9 str.)
doi: 10.1186/s12985-018-0929-3

Gilliland SM, Forrest L, Carre H, et al. Investigation of porcine circovirus contamination in human vaccines. *Biologicals* 2012; 40(4): 270–7.

Grilj U. Zagotavljanje samooskrbe s prašičjim mesom v Sloveniji: zaključna seminarska naloga. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Filozofska fakulteta, 2016.

Guo LJ, Lu YH, Wei YW, Huang LP, Liu CM. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virol J* 2010; 7: e273 (12 str.)
doi: 10.1186/1743-422X-7-273

Ha Z, Li J, Xie C, et al. Prevalence, pathogenesis, and evolution of porcine circovirus type 3 in China from 2016 to 2019. *Vet Microbiol* 2020; 247: e108756.
doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108756

Harding J, Clark E, Strokappe J, Willson P, Ellis J. Postweaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. *J Swine Health Prod* 1998; 6: 249–54.

Harms PA, Sorden SD, Halbur PG, et al. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* 2001; 38(5): 528–39.

He J, Cao J, Zhou N, Jin Y, Wu J, Zhou J. Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2. *J Virol* 2013; 87(3): 1420–9.

Jacobsen B, Krueger L, Seeliger F, Bruegmann M, Segalés J, Baumgaertner W. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microbiol* 2009; 138(1/2): 27–33.

Jiang H, Wang D, Wang J, et al. Induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in piglets by infection with porcine circovirus type 3. *J Virol* 2019; 93(4): e02045–18 (16 str.) doi: 10.1128/JVI.02045-18

Kedkovid R, Woonwong Y, Arunorat J, et al. Porcine circovirus type 3 (PCV3) infection in grower pigs from a Thai farm suffering from porcine respiratory disease complex (PRDC). *Vet Microbiol* 2018; 215: 71–6.

Klaumann F, Correa-Fiz F, Franzo G, Sibila M, Núñez JI, Segalés J. Current knowledge on porcine circovirus 3 (PCV-3): a novel virus with a yet unknown impact on the swine industry. *Front Vet Sci* 2018; 5: e315 (13 str.) doi: 10.3389/fvets.2018.00315

Klaumann F, Dias-Alves A, Cabezón O, et al. Porcine circovirus 3 is highly prevalent in serum and tissues and may persistently infect wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Transbound Emerg Dis* 2019; 66(1): 91–101.

Krüger L, Längin M, Reichart B, et al. Transmission of porcine circovirus 3 (PCV3) by xenotransplantation of pig hearts into baboons. *Viruses* 2019; 11(7): e650 (11 str.) doi: 10.3390/v11070650

Li G, Wang H, Wang S, et al. Insights into the genetic and host adaptability of emerging porcine circovirus 3. *Virulence* 2018; 9(1): 1301–13.

Li G, Wang H, Wang S, et al. Insights into the genetic and host adaptability of emerging porcine circovirus 3. *Virulence* 2018; 9(1): 1301–13.

Li L, Kapoor A, Slikas B, et al. Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *J Virol* 2010;84 (4): 1674-82.

Liu Y, Gong QL, Nie LB, et al. Prevalence of porcine circovirus 2 throughout China in 2015-2019: a systematic review and meta-analysis. *Microb Pathog* 2020; 149:e104490
doi: 10.1016/j.micpath.2020.104490

Lőrincz M, Cságola A, Farkas SL, Székely C, Tuboly T. First detection and analysis of a fish circovirus. *J Gen Virol* 2011; 92(Pt 8): 1817–21.

Lőrincz M, Dán A, Láng M et al. Novel circovirus in European catfish (*Silurus glanis*). *Arch Virol* 2012; 157(6): 1173–6.

Lu T, Yang B, Wang R, Qin C. Xenotransplantation: current status in preclinical research. *Front Immunol* 2020; 10: e3060 (19 str.)
doi: 10.3389/fimmu.2019.03060

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1292–305.

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 190–212.

MacLachlan NJ, Dubovi EJ, eds. *Fenner's veterinary virology*. 4th ed. Amsterdam : Elsevier, 2011 : 239–42.

Martens JM, Stokes HS, Berg ML, et al. Beak and feather disease virus (BFDV) prevalence, load and excretion in seven species of wild caught common Australian parrots. *PLoS One* 2020; 15(7): e0235406 (16 str.)
doi: 10.1371/journal.pone.0235406

McClenahan SD, Krause PR, Uhlenhaut C. Molecular and infectivity studies of porcine circovirus in vaccines. *Vaccine* 2011; 29(29/30): 4745–53.

Meng XJ. Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu Rev Anim Biosci* 2013; 1: 43–64.

MKGP. Prašičereja. Ljubljana : Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS, 2020
<https://www.gov.si teme/prasicereja/> (12. 12. 2020)

O'Dea M. Pathogenesis and detection of porcine circovirus type 2 in the Australian pig herds. Perth: Murdoch University 2008. Doktorska disertacija.

Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Domingo M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting

syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. J Virol Methods 2004; 117(1): 75–80.

Opriessnig T, Karuppannan AK, Castro AMMG, Xiao CT. Porcine circoviruses: current status, knowledge gaps and challenges. Virus Res 2020;286: e198044. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198044

Opriessnig T, Langohr I. Current state of knowledge on porcine circovirus type 2-associated lesions. Vet Pathol 2013; 50(1): 23–38.

Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. J Vet Diagn Invest 2007; 19(6): 591–615.

Opriessnig T, Thacker EL, Yu S, Fenaux M, Meng XJ, Halbur PG. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. Vet Pathol 2004; 41(6): 624–40.

Ouyang T, Niu G, Liu X, Zhang X, Zhang Y, Ren L. Recent progress on porcine circovirus type 3. Infect Genet Evol 2019a; 73: 227–33.

Ouyang T, Zhang X, Liu X, Ren L. Co-infection of swine with porcine circovirus type 2 and other swine viruses. Viruses 2019b; 11(2): 185 (14 str.) doi: 10.3390/v11020185

Palinski R, Piñeyro P, Shang P et al. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. J Virol 2016; 91(1): e01879–16. doi: 10.1128/JVI.01879-16

Patterson AR, Opriessnig T. Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). Anim Health Res Rev 2010; 11(2): 217–34.

Plut J, Jamnikar-Ciglenecki U, Golinar-Oven I, Knific T, Stukelj M. A molecular survey and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 3 using oral fluid, faeces and serum. BMC Vet Res 2020;16(1): 281 (9 str.) doi: 10.1186/s12917-020-02489-y

Reiner G, Bronnert B, Hohloch C, et al. Qualitative and quantitative distribution of PCV2 in wild boars and domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol* 2010; 145(1/2): 1–8.

Remick DG, Kunkel SL, Holbrook EA, Hansos CA. Theory and application of the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: 49–57.

Rosario K, Breitbart M, Harrach B et al. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus *Cyclovirus* and removal of the genus *Gyrovirus*. *Arch Virol* 2017;162(5): 1447–63.

Rosario K, Duffy S, Breitbart M. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. *Arch Virol* 2012; 157(10): 1851-71.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487–91.

Segalés J, Allan GM, Domingo M. Porcine circoviruses. In: Zimmerman JJ, ed. *Diseases of swine*. 10th ed. Ames, Iowa : Wiley-Blackwell, 2012: 405–17.

Segalés J, Calsamiglia M, Olvera A, Sibila M, Badiella L, Domingo M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* 2005; 111(3/4): 223-9

Segalés J, Olvera A, Grau-Roma L, et al. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec* 2008; 162(26): 867-8.

Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res* 2012; 164(1/2): 10-9.

SURS. Kmetijska gospodarstva po velikostnih razredih števila prašičev, po statističnih regijah, Slovenija, 2000, 2010. Ljubljana : Statistični urad RS, 2021
<https://pxweb.stat.si/SiStatData/pxweb/sl/Data/Data/15P1103S.px/table/tableViewLayout2/>
(12. 12. 2020)

Šalehar A. Prispevki k zgodovini razvoja reje in pasem prašičev v Sloveniji. Slovenj Gradec : Kmetijska založba, 2013: (142 str.)

Šteferl T, Toplak I. Prvi dokaz prisotnosti okužb s cirkovirusom 3 (PCV 3) pri domačih in divjih prašičih. *Vestn Vet Zb Slov* 2020; 15(2): 110–3.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **2013**; 30: 2725–29.

Templeton NS. The polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1992; 1: 58–72.

Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch MA. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 1982; 295(5844): 64–6.

Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Orig A* 1974; 226(2): 153–67.

Toplak I, Grom J, Hostnik P, Barlič-Maganja D. Detection and differentiation of porcine circovirus types 1 and 2 in Slovenia using “multiplex PCR”. In: 3rd Slovenian veterinary congress. Portorož 2002: 43.

Toplak I, Grom J, Hostnik P, Barlic-Maganja D. Phylogenetic analysis of type 2 porcine circoviruses identified in wild boar in Slovenia. *Vet Rec* 2004; 155(6): 178–80.

Toplak I, Lazić S, Lupulović D, et al. Study of the genetic variability of porcine circovirus type 2 detected in Serbia and Slovenia. *Acta Vet Hung* 2012; 60(3): 409–20.

Toplak I, Štukelj M, Zabavnik Piano J, Hostnik P, Grom J, Valenčak Z. Študija o pojavnosti prašičjega reproduktivnega in respiratornega sindroma (PRRS) v Sloveniji v letu 2010. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, Nacionalni veterinarski inštitut; 2010 (40 str.)

Toplak I. Molekularna epidemiologija bovine virusne diareje (BVD) v slovenskih plemenskih rejah govedi. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2004. Doktorska disertacija.

Victoria JG, Wang C, Jones MS, et al. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *J Virol* 2010; 84(12): 6033–40.

Wang Y, Noll L, Lu N, et al. Genetic diversity and prevalence of porcine circovirus type 3 (PCV3) and type 2 (PCV2) in the Midwest of the USA during 2016–2018. *Transbound Emerg Dis* 2020; 67(3): 1284–94.

Weissenbacher-Lang C, Kristen T, Mendel V, Brunthaler R, Schwarz L, Weissenböck H. Porcine circovirus type 2 (PCV2) genotyping in Austrian pigs in the years 2002 to 2017. *BMC Vet Res* 2020; 16(1): e198 (8 str.)
doi: 10.1186/s12917-020-02413-4

Wen S, Sun W, Li Z, et al. The detection of porcine circovirus 3 in Guangxi, China. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65(1): 27–31.

Woźniak A, Miłek D, Bąska P, Stadejek T. Does porcine circovirus type 3 (PCV3) interfere with porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccine efficacy? *Transbound Emerg Dis* 2019; 66(4): 1454–61.

Xiao CT, Halbur PG, Opriessnig T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *J Gen Virol* 2015; 96(Pt 7): 1830–41.

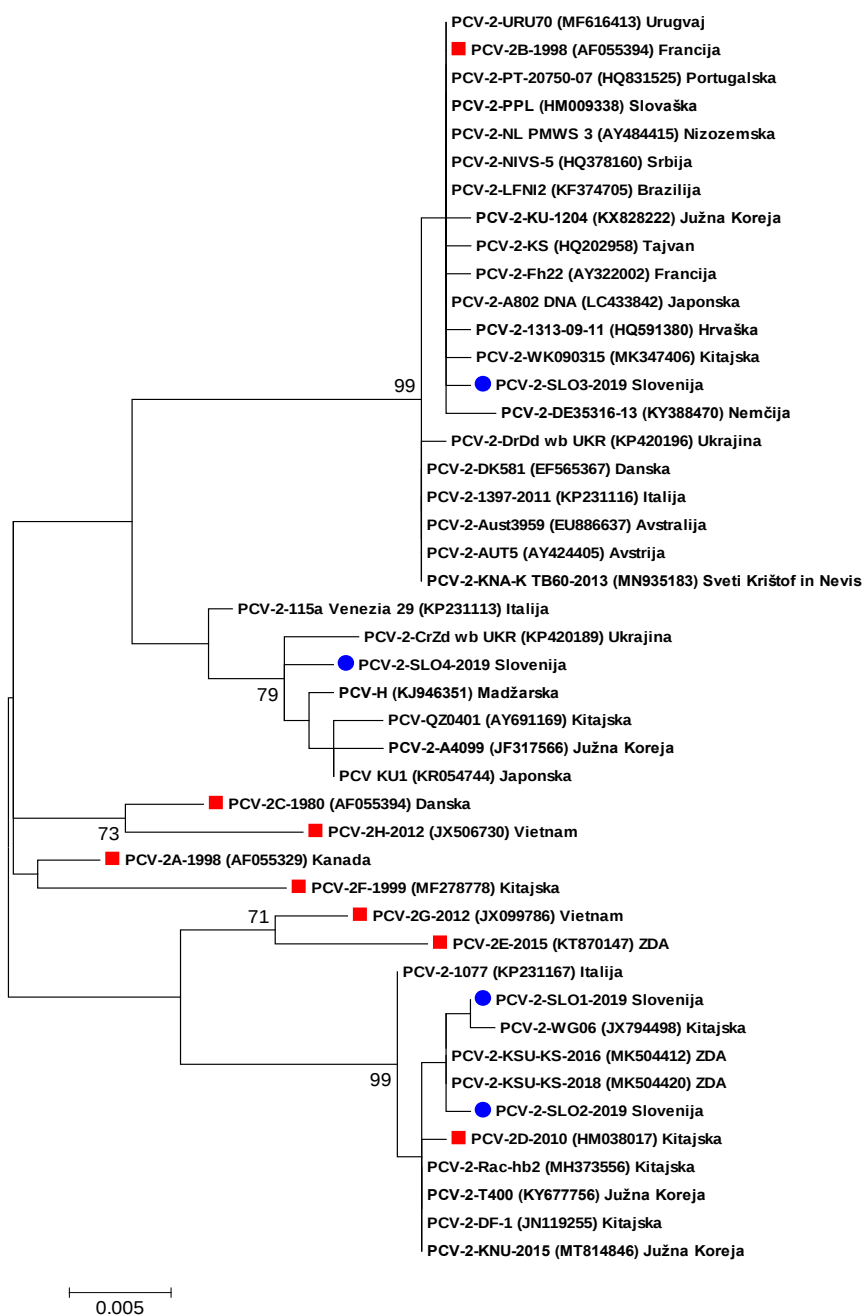
Zhang HH, Hu WQ, Li JY, et al. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as porcine circovirus 4, Hunan province, China. *Transbound Emerg Dis* 2020; 67(3): 1057–61.

Zou Y, Zhang N, Zhang J, et al. Molecular detection and sequence analysis of porcine circovirus type 3 in sow sera from farms with prolonged histories of reproductive problems in Hunan, China. *Arch Virol* 2018; 163(10): 2841–47.

9 PRILOGE

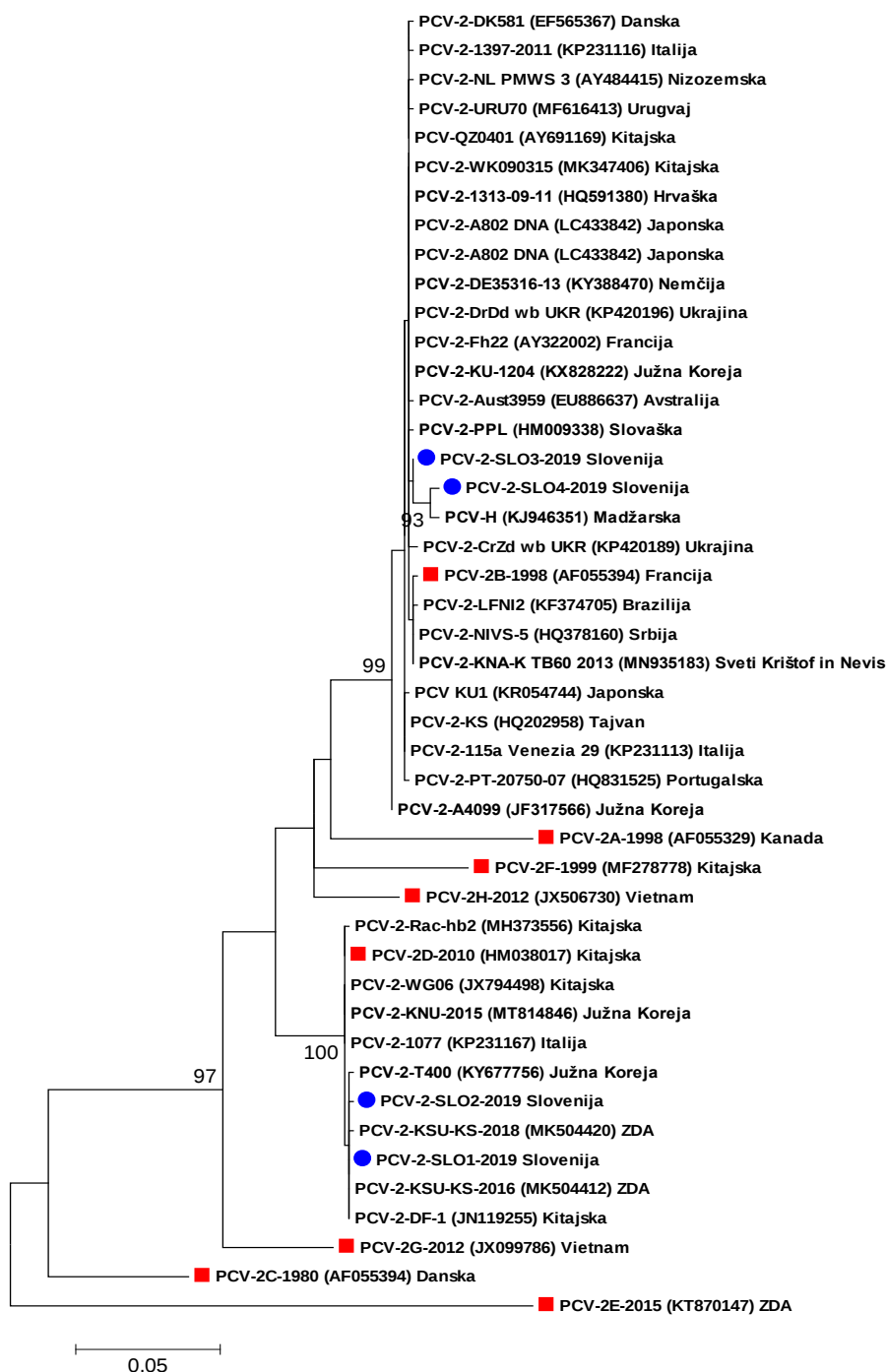
Priloga 1: Filogenetska primerjava 945 nukleotidov regije ORF 1 štirih slovenskih sevov PCV 2 (označeni z modro) z najbližjimi sevi iz tujine. V filogenetsko drevo smo vključili regije ORF 1 osmih referenčnih sekvenc za posamezen genotip PCV 2 (označeni z rdečo). Filogenetsko drevo je izdelano s programom MEGA.

Supplement 1: Phylogenetic tree based on the comparison of 945 nucleotides of ORF 1 region of four Slovenian PCV 2 strains (marked with blue) with the nearest strains from abroad. ORF 1 regions of eight reference sequences for each PCV 2 genotype are also included (marked with red). Phylogenetic tree was constructed with MEGA program.



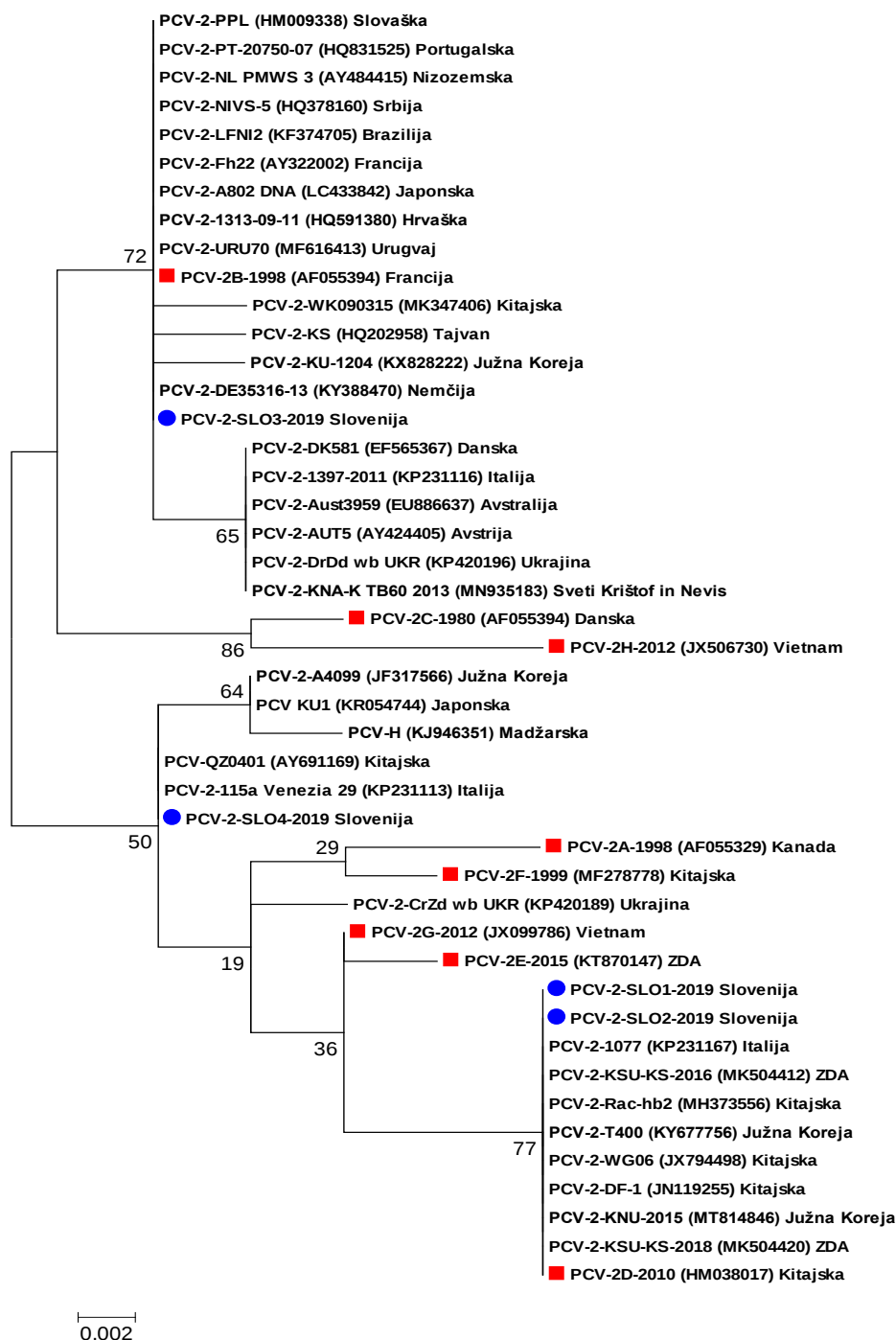
Priloga 2: Filogenetska primerjava 702 do 705 nukleotidov regije ORF 2 štirih slovenskih sevov PCV 2 (označeni z modro) z najbližjimi sevi iz tujine. V filogenetsko drevo smo vključili regije ORF 2 osmih referenčnih sekvenc za posamezen genotip PCV 2 (označeni z rdečo). Filogenetsko drevo je izdelano s programom MEGA.

Supplement 2: Phylogenetic tree based on the comparison of 702 to 705 nucleotides of ORF 2 region of four Slovenian PCV 2 strains (marked with blue) with the nearest strains from abroad. ORF 2 regions of eight reference sequences for each PCV 2 genotype are also included (marked with red). Phylogenetic tree was constructed with MEGA program.



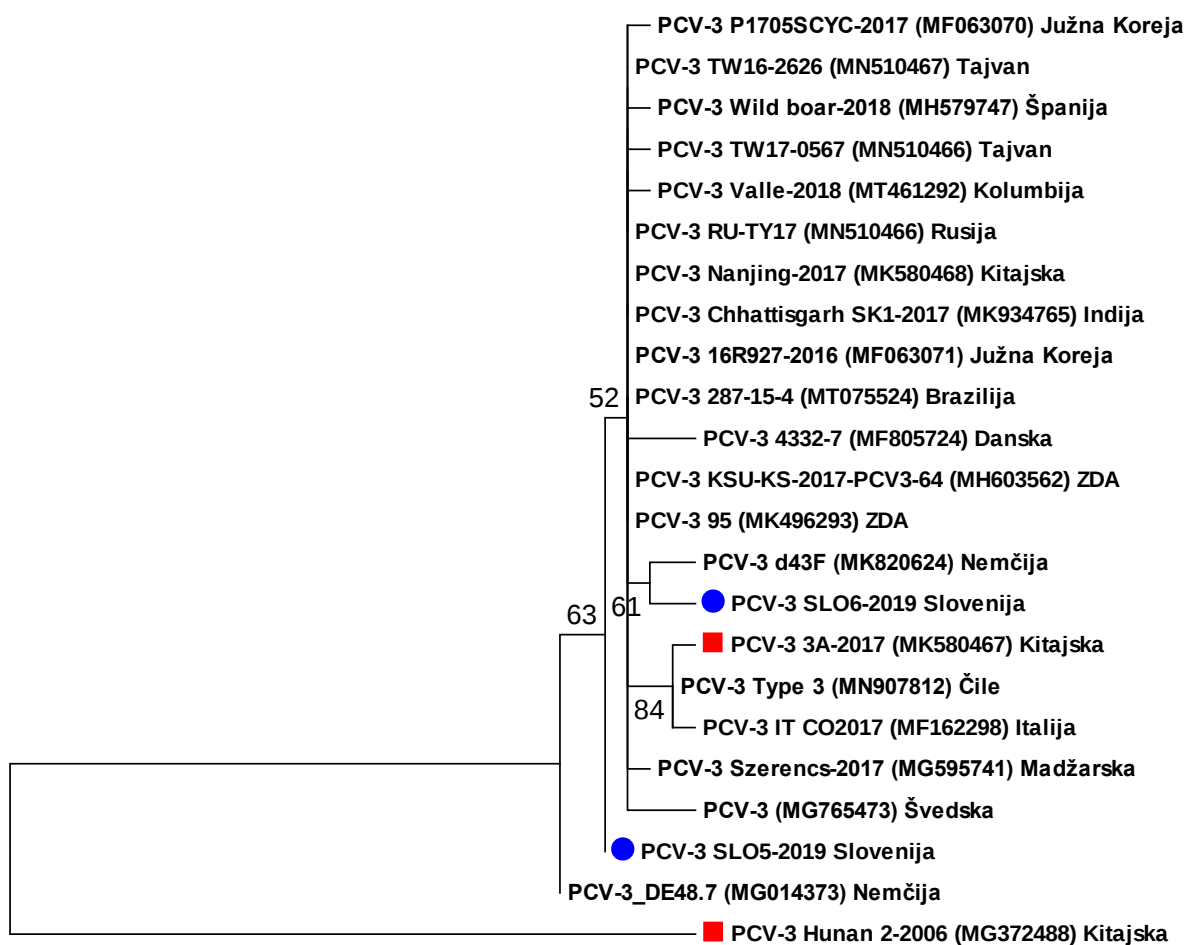
Priloga 3: Filogenetska primerjava 315 nukleotidov regije ORF 3 štirih slovenskih sevov PCV 2 (označeni z modro) z najbližjimi sevi iz tujine. V filogenetsko drevo smo vključili regije ORF 3 osmih referenčnih sekvenc za posamezen genotip PCV 2 (označeni z rdečo). Filogenetsko drevo je izdelano s programom MEGA.

Supplement 3: Phylogenetic tree based on the comparison of 315 nucleotides of ORF 3 region of four Slovenian PCV 2 strains (marked with blue) with the nearest strains from abroad. ORF 3 regions of eight reference sequences for each PCV 2 genotype are also included (marked with red). Phylogenetic tree was constructed with MEGA program.



Priloga 4: Filogenetska primerjava 891 nukleotidov regije ORF 1 dveh slovenskih sevov PCV 3 (označeni z modro) z najbližjimi sevi iz tujine. V filogenetsko drevo smo vključili regije ORF 1 dveh referenčnih sekvenc za posamezen genotip PCV 3 (označeni z rdečo). Filogenetsko drevo je izdelano s programom MEGA.

Supplement 4: Phylogenetic tree based on the comparison of 981 nucleotides of ORF 1 region of two Slovenian PCV 3 strains (marked with blue) with the nearest strains from abroad. ORF 1 regions of two reference sequences for each PCV 3 genotype are also included (marked with red). Phylogenetic tree was constructed with MEGA program.



Priloga 5: Filogenetska primerjava 645 nukleotidov regije ORF 2 dveh slovenskih sevov PCV 3 (označeni z modro) z najbližjimi sevi iz tujine. V filogenetsko drevo smo vključili regije ORF 2 dveh referenčnih sekvenc za posamezen genotip PCV 3 (označeni z rdečo). Filogenetsko drevo je izdelano s programom MEGA.

Supplement 5: Phylogenetic tree based on the comparison of 645 nucleotides of ORF 2 region of two Slovenian PCV 3 strains (marked with blue) with the nearest strains from abroad. ORF 2 regions of two reference sequences for each PCV 3 genotype are also included (marked with red). Phylogenetic tree was constructed with MEGA program.



Priloga 6: Dolžine genomov, odprtih bralnih okvirjev in kodiranih proteinov slovenskih sevov PCV 2 in referenčnih sevov.

Supplement 6: Lengths of genomes, open reading frames and coded proteins of Slovenian PCV 2 strains and reference strains.

PCV 2	Genom ^a	ORF 1 ^a	ORF 2 ^a	ORF 3 ^a	Rep protein ^b	Cap protein ^b	Apoptotski protein ^b
PCV-2-SLO1-2019	1767	945	705	315	314	234	104
PCV-2-SLO2-2019	1767	945	705	315	314	234	104
PCV-2-SLO3-2019	1767	945	702	315	314	233	104
PCV-2-SLO4-2019	1767	945	702	315	314	233	104
PCV-2A-1998	1768	945	702	315	314	233	104
PCV-2B-1998	1767	945	702	315	314	233	104
PCV-2C-1980	1767	945	705	315	314	234	104
PCV-2D-2010	1767	945	705	315	314	234	104
PCV-2E-2015	1777	945	717	315	314	238	104
PCV-2F-1999	1767	945	705	315	314	234	104
PCV-2G-2012	1767	945	705	315	314	234	104
PCV-2H-2012	1767	945	705	315	314	234	104

^a število nukleotidov, ^a number of nucleotides

^b število aminokislin, ^b number of aminoacids

Priloga 7: Pregled dolžin genomov, odprtih bralnih okvirjev in kodiranih proteinov slovenskih sevov PCV 3 in referenčnih sevov.

Supplement 7: Lengths of genomes, open reading frames and coded proteins of Slovenian PCV 3 strains and reference strains.

PCV 3	Genom ^a	ORF 1 ^a	ORF 2 ^a	Rep protein ^b	Cap protein ^b
PCV-3-SLO5-2019	2000	891	645	296	214
PCV-3-SLO6-2019	2000	891	645	296	214
PCV-3-3A-2017	2000	891	645	296	214
PCV-3-Hunan 2-2006	2000	891	645	296	214

^a število nukleotidov, ^a number of nucleotides

^b število aminokislin, ^b number of aminoacids

Priloga 8: Prikaz nukleotidnega zaporedja štirih celotnih genomov PCV 2, ki smo jih določili v okviru izvedene raziskovalne naloge.

Supplement 8: Complete genome nucleotide sequences of four Slovenian PCV 2 strains, determined in this study.

Prašičji cirkovirus 2 sev PCV 2 - SLO 1/2019, celotni genom, 1.767 nt

```
>AAGTATTACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGC
AACATGCCCAGCAAGAAGAGTGGAAGAAGCGGACCCCAACCACATAAAAGGTG
GGTGTTCACGCTGAATAATCCTTCCGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGAGC
TCCCAATCTCCCTATTTGATTATTTTATTGTTGGCGAGGAAGGTAATGAGGAGGG
CCGAACACCCACCTACAGGGGTTTCGCTAATTTTGTGAAGAAGCAAACCTTTTAAT
AAAGTGAAGTGGTATTTTGGTGCCCGCTGCCACGTCGAGAAAGCGAAAGGAACA
GATCAGCAGAATAAAGAATATTGTAGTAAAGAAGGCAACTTACTGATAGAATGT
GGAGCTCCTAGATCTCAAGGACAACGGAGTGACCTCTCTACTGCTGTGAGTACCT
TGTTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCTGTAAACGTTTGT
CAGAAATTTCCGCGGGGCTGGCTGAACTTTTGAAAGTGAGCGGGAAAATGCAGAA
GCGTGATTGGAAGACGAATGTACACGTCATTGTGGGGCCACCTGGGTGTGGCAA
AAGCAAATGGGCTGCTAATTTTGCAGACCCGGAAACCACATACTGGAAACCACCT
AGAAACAAGTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACT
TTTATGGCTGGCTGCCGTGGGATGATCTACTGAGACTCTGTGATCGATATCCTTTG
ACTGTTGAGACTAAAGGTGGAAGTGTACCTTTTTTGGCCCGCAGTATTCTGATTAC
CAGCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACTCCTCAACTGCTGTCCAGCTGTAGAA
GCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAAAT
CCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTCGTCACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCC
ATATGAAATAAATTACTGAGTCTTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTTTATTATTCAC
TTAGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAAATTCTCTGAATTGTACATACATGG
TTATACGGATATTGTAGTCCTGGTTCGTATATACTGTTTTTCGAACGCAGTGCCGAGG
CCTACATGGTCTACATTTCCAGTAGTTTGTAGTCTCAGCCAGAGTTGATTTCTTTT
GTTATTGGGTTGGAAGTAATCGATTGTCCCATCAAGGACAGGTTTCGGGGTAAAG
TACCGGGAGTGGTAGGAGAAGGGCTGGGTTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTT
ACATAGGGGTCATAGGTTAGGGCATTGGCCTTTGTTACAAAGTTATCATCTAGAA
TAACAGCAGTGGAGCCCACTCCCTGTCACCCTGGGTGATTGGGGAGCAGGGCCA
GAATTCAACCTTAACCTTCCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGGCACAGTGAGGGGG
TTTGAGCCCCCTCCTGGGGGAAGAAAATCATTAAATATTAAATCTCATCATGTCCA
CATTCCAGGAGGGCGTTCTGACTGTGGTTTTCTTGACAGTATAACCGATGGTGCG
GGAGAGGCGGGTGTTGAAGATGCCATTTTCTTCTCCAGCGGTAACGGTGCGGG
GGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGG
GCGGTGTCTTCGTCTGCGGAAACGCCTCCTTGATACGTCATCGCTGAAAACGAA
AGAAGTGCGCTGT
```

Prašičji cirkovirus 2 sev PCV 2 - SLO 2/2019, celotni genom, 1.767 nt

```
>AAGTATTACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGC
AACATGCCCAGCAAGAAGAGTGGAAGAAGCGGACCCCAACCACATAAAAGGTG
GGTGTTCACGCTGAATAATCCTTCCGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGAGCT
CCCAATCTCCCTATTTGATTATTTTATTGTTGGCGAGGAAGGTAATGAGGAGGGC
CGAACACCCACCTACAGGGGTTGCTAATTTTGTGAAGAAGCAAACCTTTTAATA
AAGTGAAGTGGTATTTGGGTGCCCCTGACCCTGCGAGAAAGCGAAAGGAACAG
ATCAGCAGAATAAAGAATATTGCAGTAAAGAAGGCAACTTACTGATAGAATGTG
GAGCTCCTAGATCTCAAGGACAACGGAGTGACCTCTCTACTGCTGTGAGTACCTT
GTTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCTGTAAACGTTTGTG
AGAAATTTCCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAGTGAGCGGGAAAATGCAGAAG
CGTGATTGGAAGACGAATGTACACGTCATTGTGGGGCCACCTGGGTGTGGCAAA
AGCAAATGGGCTGCTAATTTTGCAGACCCGGAACACATACTGGAAACACCTA
GAAACAAGTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTT
TTATGGCTGGCTGCCGTGGGATGATCTACTGAGACTCTGTGATCGATATCCTTTGA
CTGTTGAGACTAAAGGTGGAAGTGTACCTTTTTTGGCCCGCAGTATTCTGATTACC
AGCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACTCCTCAACTGCTGTCCCAGCTGTAGAAG
CTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAATCC
ACGGAGGAAGGGGGGCCAGTTCGTCACCTTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCAT
ATGAAATAAATTACTGAGTCTTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTTTATTATCACTT
AGGCTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAAATTCTCTGAATTGTACATACATGGTT
ATACGGATATTGTAGTCCTGGTCGTATATACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGC
CTACATGGTCTACATTTCCAGTAGTTTGTAGTCTCAGCCAGAGTTGATTTCTTTTG
TTATTGGGTTGGAAGTAATCGATTGTCCCATCAAGGACAGGTTTCGGGGTAAAGT
ACCGGGAGTGGTAGGAGAAGGGCTGGGTTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTA
CATAGGGGTCATAGGTTAGGGCATTGGCCTTTGTTACAAAGTTATCATCTAGAAT
AACAGCAGTGGAGCCCACTCCCCTGTCACCCTGGGTGATTGGGGAGCAGGGCCA
GAATTCAACCTTAACCTTCCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGGCACAGTGAGGGGG
TTTGAGCCCCCTCCTGGGGGAAGAAAATCATTAAATATTAAATCTCATCATGTCCA
CATTCCAGGAGGGCGTTCTGACTGTGGTTTTCTTGACAGTATAACCGATGGTGCG
GGAGAGGCGGGTGTTGAAGATGCCATTTTCTCTCCAGCGGTAACGGTGGCGG
GGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGG
GCGGTGTCTTCGTCTGCGGAAACGCCTCCTTGGATACGTCATCGCTGAAAACGAA
AGAAGTGCGCTGT
```

Prašičji cirkovirus 2 sev PCV 2 - SLO 3/2019, celotni genom, 1.767 nt

```
>AAGTATTACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGC
AACATGCCCAGCAAGAAGAATGGAAGAAGCGGACCCCAACCCCATAAAAGGTGG
GTGTTCACTCTGAATAATCCTTCCGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGATCTTC
CAATATCCCTATTTGACTATTTTATTGTTGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACG
AACACCTCACCTCCAGGGGTTTCGCTAATTTTGTGAAGAAGCAGACTTTTAATAAA
GTGAAGTGTTATTTGGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAAAGCGAAAGGAACAGAT
CAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAGGCAACTTACTGATGGAGTGTGGA
GCTCCTAGATCTCAGGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTACCTTGT
TGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCCCTGTAACGTTTGTCAG
AAATTTCCGCGGGGCTGGCTGAACCTTTTGAAAGTGAGCGGGAAAATGCAGAAGCG
TGATTGGAAGACTAATGTACACGTCATTGTGGGGCCACCTGGGTGTGGTAAAAGC
AAATGGGCTGCTAATTTTGCAGACCCGGAACACATACTGGAAACCACCTAGA
AACAAAGTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTTTT
ATGGCTGGCTGCCCTGGGATGATCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGAC
TGTAGAGACTAAAGGTGGAACCTGTACCTTTTTTGGCCCGCAGTATTCTGATTACC
AGCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACTCCTCAACTGCTGTCCCAGCTGTAGAAG
CTCTTTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAAATCC
ACGGAGGAAGGGGGGCCAGTTCGTCACCCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCAT
ATGAAATAAATTACTGAGTCTTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTTTATTATTCATTA
AGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAAATTCTCTGAATTGTACATACATGGTT
ACACGGATATTGTATTCCTGGTCGTATATACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGC
CTACGTGGTCTACATTTCCAGCAGTTTGTAGTCTCAGCCACAGCTGATTTCTTTTG
TTGTTTGGTTGGAAGTAATCAATAGTGGAATCTAGGACAGGTTTGGGGGTAAAGT
AGCGGGAGTGGTAGGAGAAGGGCTGGGTTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTA
CATAGGGGTCATAGGTGAGGGCTGTGGCCTTTGTTACAAAGTTATCATCTAGAAT
AACAGCACTGGAGCCCCTCCCTGTACCCCTGGGTGATCGGGGAGCAGGGCCA
GAATTCAACCTTAACCTTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGGCACAGAGCGGGGG
TTTGAGCCCCCTCCTGGGGGAAGAAAGTCATTAATATTGAATCTCATCATGTCCA
CCGCCAGGAGGGCGTTTTGACTGTGGTTCGCTTGATAGTATATCCGAAGGTGCG
GGAGAGGCGGGTGTTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTAACGGTGGCGG
GGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGG
GCGGTGTCTTCGTCTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCATATCTGAAAACGAA
AGAAGTGCGCTGT
```

Prašičji cirkovirus 2 sev PCV 2 - SLO 4/2019, celotni genom, 1.767 nt

```
>AAGTATTACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGC
AACATGCCCAGCAAAAAGAATGGAAGAAGCGGACCCCAACCACACAAAAGGTG
GGTGTTCACGCTGAATAATCCTTCCGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGAGCT
TCCAATCTCCCTTTTTGATTATTTTATTGTTGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGAC
GAACACCCACCTCCAGGGGTTTCGCCAATTTTGTGAAGAAGCAAACATTTAATAA
AGTGAAATGGTATTTTCGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAAAGCGAAAGGAACTGA
TCAGCAGAATAAAGAATATTGCAGTAAAGAAGGTAACCTTACTGATTGAATGTGG
AGCTCCTAGATCTCAAGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTACCTTG
TTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCTGTAAACGTTTGTCA
GAAATTTCCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAAGTGAGCGGGAAAATGCAGAAGC
GTGATTGGAAGACTAATGTACACGTCATTGTGGGGCCACCTGGGTGTGGTAAAAG
CAAATGGGCTGCTAATTTTGCAGACCCGGAAACCACATACTGGAAACCACCTAGA
AACAAAGTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTTTT
ATGGCTGGCTGCCCTGGGATGATCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGAC
TGTAGAGACTAAAGGTGGAACGTACCTTTTTTGGCCCGCAGTATTCTGATTACC
AGCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACTCCTCAACTGCTGTCCCAGCTGTAGAAG
CTCTTTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAATCC
ACGGAGGAAGGGGGGCCAGTTCGTCACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCAT
ATGAAATAAATTACTGAGTCTTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTTTATTATTCATTA
AGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAAATTCTCTGAATTGTACATACAGGGTT
ACACGGATATTGTATTCCTGGTCGTTTATACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCC
TACGTGGTCTACATTTCCAGCAGTTTGTAGTCTCATCCACAGCTGATTTCTTTTGT
TTTTGGTTGGAAGTAATCAATAGTGGAATCTAGGACAGGTTTGGGGGTAAAGTAG
CGGGAGTGGTAGGAGAAGGGCTGGGTTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACA
TAGGGGTCATAGGTGAGGGCTGTGGCCTTTGGTACAAAGTTATCATCTAGAATAA
CAGCACTGGAGCCCACTCCCCTGTCACCCTGGGTGATCGGGGAGCAGGGGCCAGA
ATTCAACCTTAACCTTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGGCACAGAGCGGGGGTTT
GAGCCCCCTCCTGGGGGAAGAAAGTCATTAATATTGAATCTCATCATGTCCACCG
CCCAGGAGGGCGTTTTGACTGTGGTTCGCTTGATAGTATATCCGAAGGTGCGGGA
GAGGCGGGTGTGAAGATGCCATTTTTCCTTCTCCAGCGGTAACGGTGGCGGGGG
TGGACGAGCCAGGGGCGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGGGCGG
TGTCTTCGTGTGCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCATAGCTGAAAACGAAAGAA
GTGCGCTGT
```

Priloga 9: Prikaz nukleotidnega zaporedja dveh celotnih genomov PCV 3, ki smo ju določili v okviru izvedene raziskovalne naloge.

Supplement 9: Complete genome nucleotide sequences of two Slovenian PCV 3 strains, determined in this study.

Prašičji cirkovirus 3 sev PCV 3 - SLO 5/2019, celotni genom, 2.000 nt

```
>TAGTATTACCCGGCACCTCGGAACCCGGATCCACGGAGGTCTGTAGGGAGAAAA
AGTGGTATCCCATATGATGCTCCGCACCGTGTGAGTGGATATACCGGGCAGTG
GATGATGAAGCGGCCTCGTGTTTTGATGCCGCAGGACGGGGACTGGATAACTGA
TTTTTTGTGGTGCTACGAGTGTCTGAAGATAAGGACTTTTATTGTCATCCTATTC
TAGGTCCGGAGGGGAAAGCCCGAAACACAGGTGGTGTTTTACGATAAACAACCTGG
ACCCCGACCGAGTGGGAATCTATTGTGGAGTGTGGAGGCAGTATAGCGAGATAC
CTTATTATCGGCCAAAGAGGTTGGAAAAAGCGGTACCCACACTTGCAAGGGTAC
GTGAATTTCAAGAACAAAAGGCGACTCAGCTCGGTGAAGCGCTTACCCGGATTG
GTCGGGCCCATCTGGAGCCGGCGAGGGGGAGCCACAAAGAGGCCAGCGAGTATT
GCAAGAAAGAGGGGGATTACCTCGAGATTGGCGAAGATTCTCTTCGGGTACCA
GATCGGATCTTCAAGCAGCAGCTCGGATTCTGACGGAGACGTCGGGAAATCTGAC
TGAAGTTGCGGAGAAGATGCCTGCAGTATTTATACGCTATGGGCGGGGTTTTCGT
GATTTTTGCGGGGTGATGGGGTTGGGTAAACCGCGTGATTTTAAACTGAAGTTT
ATGTTTTTATTGGTCCTCCAGGATGCGGGAAAACGCGGGAAGCTTGTGCGGATGC
GGCTGCGCGGGAATTGCAGTTGTATTTCAAGCCACGGGGGCCTTGGTGGGATGGT
TATAATGGGGAGGGTGCTGTTATTCTGGATGATTTTTATGGGTGGGTTCCATTTGA
TGAATTGCTGAGAATTGGGGACAGGTACCCTCTGAGGGTTCCTGTTAAGGGTGGG
TTTGTTAATTTTGTGGCTAAGGTATTATATATTACTAGTAATGTTGTACCGGAGGA
GTGGTATTTCATCGGAGAATATTCGTGAAAGTTGGAGGCCTTGTTTAGGAGGTTT
ACTAAGGTTGTCTGTTGGGGGGAGGGGGGGGTAAAGAAAGACATGGAGACAGTG
TATCCAATAAACTATTGATTTTATTCGCACTTGTGTACAATTATTGCGTTGGGGTG
GGGGTATTTATTGGGTGGGTGGGTGGGCAGCCCCCTAGCCACGGCTTGTGCCCC
CACCGAAGCATGTGGGGGATGGGGTCCCCACATGCGAGGGCGTTTACCTGTGCC
GCACCCGAAGCGCAGCGGGAGCGCGCGCGAGGGGACACGGCTTGTGCCCACCGG
AGGGGTCAGATTTATATTTATTTTCACTTAGAGAACGGACTTGTAACGAATCCAA
ACTTCTTTGGTGCCGTAGAAGTCTGTCAATCCAGTTTTTTCTGGGACATATATGCT
CCAAAGCAGTGCTCCCCATTGAACGGTGGGGTCATATGTGTTGAGCCATGGGGTG
GGTCTGGAGAAAAAGAAGAGGCTTTGTCCTGGGTGAGAGCTGGTAGTTCCCGCC
AGAAATGGTTTGGGGGTGAAGTAACGGCTGTGTTTTTTTTTAGAAGTCATAACTTT
ACGAGTGGAACTTTCCGCATAAGGGTCGTCTTGAGCCAAGTGTGTTGTGGTCCAG
GCGCCGTCTAGATCTATGGCTGTGTGCCCGAACATAGTTTTTTGTTTGCTGAGCCGG
AGAAATTACAGGGCTGAGTGTAACCTTTCATCTTTAGTATCTTGTAATATTCAAAGT
TAATTGCAGTTTCCCATTCGTTTAGGCGGGTAATGAAGTGGTTGGCGTGCCAGGG
CTTATTATTCTGAGGGGTTCCAACGGAAATGACGTTTCATGGTGGAGTATTTCTTTG
TGTAAGTATGTGCCAGCTGTGGGCCTCCTAATGAATAGTCTTCTTCTGGCATAGCGC
CTTCTGTGGCGTCGTCGTCTTCTTGGGCGGGGTCTTCTTCTGAATATAGCTCTGTG
TCTCATTTTGGTGCCGGGC
```

Prašičji cirkovirus 3 sev PCV 3 - SLO 6/2019, celotni genom, 2.000 nt

```
>TAGTATTACCCGGCACCTCGGAACCCGGATCCACGGAGGTCTGTAGGGAGAAAA
AGTGGTATCCCATTTATGGATGCTCCTCATCGTGTGAGTGGATATACCGGGCAGTG
GATGATGAAGCGGCCTCGTGTGTTTATGATGCCGCAGGACGGGGACTGGATAACTGA
GTTTTTGTGGTGCTACGAGTGTCTGAAGATAAGGACTTTTATTGTCATCCTATTC
TAGGTCCGGAGGGGAAAGCCCGAAACACAGGTGGTGTGTTTACGATAAACAACCTGG
ACCCCGACCGAGTGGGAATCTATTGTGGAGTGTGGAGGCAGTATAGCGAGATAC
CTTATTATCGGCAAAGAGGTTGGAAAAAGCGGTACCCACACTTGCAAGGGTAC
GTGAATTTCAAGAACAAAAGGCGACTCAGCTCGGTGAAGCGCTTACCCGGATTTG
GTCGGGCCCCTCTGGAGGCGGCGAGGGGGAGCCACAAAGAGGCCAGCGAGTATT
GCAAGAAAGAGGGGGATTACCTCGAGATTGGCGAAGATTCTCTTCGGGTACCA
GATCGGATCTTCAGGAAGCAGCTCGGATTCTGACGGAGACGTCGGGAAATCTGA
CTGAAGTTGCGGAGAAGATGCCTGCAGTATTTATACGCTATGGGCGGGGTTTGCG
TGATTTTTGCGGGGTGATGGGGTTGGGTAAACCGCGTGATTTTAAACTGAAGTT
TATGTTTTTATTGGTCTCCAGGATGCGGGAAAACGCGGGAAGCTTGTGCGGATG
CGGCTGCGCGGGAATTGCAGTTGTATTTCAAGCCACGGGGGCCTTGGTGGGATGG
TTATAATGGGGAGGGTGCTGTTATTCTGGATGATTTTTATGGGTGGGTTCATTG
ATGAATTGCTGAGAATTGGGGACAGGTACCCTCTGAGGGTTCCTGTAAAGGGTGG
GTTTGTTAATTTTGTGGCTAAGGTATTATATATTACTAGTAATGTTGTACCGGAGG
AGTGGTATTCATCGGAGAATATTCGTGGAAAGTTGGAGGCCTTGTTTAGGAGGTT
CACTAAGGTTGTTTGTGGGGGGAGGGGGGGGTAAAGAAAGACATGGAGACAGT
GTATCCAATAAACTATTGATTTTATTTGCACTTGTGTTCAATTATTGCGTTGGGGT
GGGGGTATTTATTGGTTGGGTGGGTGGGCAGCCCCCTAGCCACGGCTTGTGCCCC
CCACCGAAGCATGTGGGGGATGGGGTCCCCACATGCGAGGGCGTTTACCTGTGCC
CGCACCCGAAGCGCAGCGGGAGCGCGCGAGGGGACACGGCTTGTGCGCCACCG
GAGGGGTCAGATTTATATTTATTTTCACTTAGAGAACGGACTTGTAACGAATCCA
AACTTCTTTGGTGCCGTAGAAGTCTGTCAATTCCAGTTTTTTCCGGGACATAAATGC
TCCAAAGCAGTGCTCCCCATTGAACGGTGGGGTCATATGTGTTGAGCCATGGGGT
GGGTCTGGAGAAAAAGAAGAGGCTTTGTCCTGGGTGAGCGGTGGTAGTTCCCGC
CAGAATTGTTTGGGGGTGAAGTAACGGCTGTGTTTTTTTTTAGAAGTCATAACTT
TACGAGTGGAACTTTCCGCATAAGGGTCGTCTTGGAGCCAAGTGTTTGTGGTCCA
GGCGCCGTCTAGATCTATGGCTGTGTGCCCGTACATAGTTTTTGTGTTGCTGAGCTG
GAGAAATTACAGGGCTGAGTGTAACCTTTCATCTTTAGTATCTTATAATATTTCAA
GCTAATTGCAGTTTCCCATTCGTTTAGGCGGGTAATGAAGTGGTTGGCGTGCCAG
GGCTTATTATTCTGAGGGGTCCAACGGAAATGACGTTTCATGGTGGAGTATTTCTT
TGTGTAGTATGTGCCAGCTGTGGGCCTCCTAATGAATAGTTTTCTTCTGGCATAGC
GCCTTCTGTGGCGTCGTCTCTCTTGGGCGGGGTCTTCTTCTGAATATAGCTCTG
TGTCTCATTTTGGTGCCGGGC
```