

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**DOLOČITEV IN PRIMERJAVA NUKLEOTIDNEGA
ZAPOREDJA VIRUSOV PRAŠIČJEGA
REPRODUKCIJSKEGA IN RESPIRATORNEGA
SINDROMA V REGIJI ORF5 VIRUSNEGA GENOMA**

**DETERMINATION AND COMPARISON OF THE
NUCLEOTIDE SEQUENCE OF PORCINE
REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME
VIRUSES IN ORF5 REGION OF THE VIRAL GENOME**

Matic Leder

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 636.4.09:616.98:57.083.2:57.088:575.86(043.2)

**DOLOČITEV IN PRIMERJAVA NUKLEOTIDNEGA
ZAPOREDJA VIRUSOV PRAŠIČJEGA
REPRODUKCIJSKEGA IN RESPIRATORNEGA SINDROMA
V REGIJI ORF5 VIRUSNEGA GENOMA**

**DETERMINATION AND COMPARISON OF THE
NUCLEOTIDE SEQUENCE OF PORCINE REPRODUCTIVE
AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUSES IN ORF5
REGION OF THE VIRAL GENOME**

Matic Leder

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

Ljubljana, 2019

POVZETEK

Ključne besede: prašič, bolezni – virologija; arterivirusne infekcije – diagnostika; PRRSV virus prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma – izolacija – klasifikacija – genetika; virusna, RNA; reverzna transkriptaza, verižna reakcija s polimerazo – metode; zaporedje aminokislin; zaporedja baz; filogenija; prašiči; Slovenija

V izvedeni raziskavi ugotavljanja genetske raznolikosti slovenskih sevov virusa prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma (angl. porcine reproductive and respiratory syndrome virus – PRRSV) v regiji odprtega bralnega okvirja 5 (angl. open reading frame 5 – ORF5) smo uporabili 127 PRRSV pozitivnih vzorcev domačih prašičev, zbranih od leta 2009 do 2018. Za pomnoževanje celotne regije ORF5 genoma PRRSV smo uporabili dve klasični metodi reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (angl. reverse transcription-polymerase chain reaction – RT-PCR). Oseminšestdesetim vzorcem pozitivnim na PRRSV iz 56 različnih slovenskih rej smo določili nukleotidno (nt) zaporedje v dolžini 606 nt in jih primerjali med seboj ter s sevi iz genske banke. Izdelali smo filogenetska drevesa in tipizirane seve razdelili po najnovejši klasifikaciji PRRSV v klade (1, 1A, 1B, 1G, 3B, 3C in 3D). Primerjava nt in aminokislinskega (ak) zaporedja je pokazala, da v slovenskih rejah krožijo zelo različni sevi PRRSV, ki so se v posamezne reje verjetno vnesli preko vnosa živih prašičev iz tujine, prav tako pa smo v enem primeru jasno dokazali širjenje PRRSV med slovenskimi rejami prašičev. Raziskava je prva tovrstna študija v Sloveniji, ki je zajela večje število vzorcev pozitivnih na PRRSV.

SUMMARY

Keywords: Swine diseases – virology; arteriviridae infections – diagnosis; PRRSV porcine reproductive and respiratory syndrome virus – isolation – classification – genetics; RNA, viral; polymerase chain reaction – methods; amino acid sequence; base sequence; phylogeny; swine; Slovenia

PRRSV positive samples of organs collected from 127 domestic pigs between 2009 and 2018 were used in the conducted research on the genetic diversity of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strains in the open reading frame 5 region (ORF5) of viral genome. Two classical reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) methods were used for the amplification of complete ORF5 region of the PRRSV genome. The nucleotide sequence in the length of 606 nucleotides were successfully determined for sixty-eight positive PRRSV samples from 56 different Slovenian herds and compared with each other and with those available in the gene bank. The genotyped strains were divided according to the phylogenetic trees and the latest classification of PRRSV into the clades (1, 1A, 1B, 1G, 3B, 3C in 3D). A comparison of the nucleotide and amino acid sequences showed that very different strains of PRRSV are circulating in Slovene positive herds, which were probably introduced into individual breeds via trade of live pigs from abroad. The spread of the virus among Slovene pig farms was clearly demonstrated for one PRRSV strain. This is the first study of Slovenian PRRSV strains based on large number of positive samples.

KAZALO

1	UVOD	1
1.1	Opredelitev problema	3
1.2	Cilj raziskovanja	3
1.3	Delovne hipoteze	3
2	PREGLED LITERATURE	4
2.1	Pregled zgodovinskih podatkov o pojavljanju virusa PRRS	4
2.1.1	Prve ugotovitve PRRS pri domačem prašiču	4
2.2	Genom PRRSV	5
2.3	Klasifikacija virusa PRRSV znotraj družine Arteriviridae	7
2.4	Epidemiologija virusa PRRSV	7
2.5	Patogeneza, klinična slika in patomorfološki znaki okužbe s PRRSV	8
2.6	Diagnostične metode	9
2.6.1	Klinična diagnostika	9
2.6.2	Serološka diagnostika	9
2.6.3	Virološka diagnostika	10
2.6.3.1	Verižna reakcija s polimerazo in ugnezdene verižna reakcija s polimerazo ..	10
2.7	Genotipizacija PRRSV	12
2.8	Rekombinacija pri PRRSV	13
2.9	Pregled stanja v Sloveniji	14
3	MATERIALI IN METODE	15
3.1	Materiali	15
3.1.1	Odvzem organov poginjenih prašičev pozitivnih na PRRSV	15
3.2	Metode	15
3.2.1	Izvedba postopkov v prostorih laboratorija za molekularno virologijo	15
3.2.2	Izolacija nukleinskih kislin	16
3.2.2.1	Izolacija nukleinskih kislin s komercialnim kompletom QIAamp Viral RNA Kit	16
3.2.3	Dokazovanje nukleinskih kislin PRRSV s klasično metodo RT-PCR	17
3.2.3.1	Izbira in priprava začetnih oligonukleotidov za izvedbo klasične metode RT-PCR in ugnezdene PCR	17
3.2.3.2	Priprava reakcijske mešanice za pomnoževanje kratkih odsekov genoma PRRSV s klasično metodo RT-PCR (PCR 1)	18
3.2.3.3	Priprava reakcijske mešanice za pomnoževanje kratkih odsekov genoma PRRS z notranjimi začetnimi nukleotidi (ugnezdene PCR, PCR 2)	20
3.2.3.4	Dokazovanje produktov ugnezdene PCR z elektroforezo v agaroznem gelu.	20
3.2.4	Določanje nukleotidnega zaporedja	22
3.2.4.1	Priprava vzorcev za sekvenciranje v podjetju MacroGen	22
3.2.5	Obdelava izpiskov sekvenčnih reakcij s programom DNASTAR	22

3.2.5.1	Uporaba programa SeqMan	22
3.2.5.2	Uporaba programa EditSeq.....	23
3.2.5.3	Uporaba programa MegAlign in programa MEGA6.....	23
3.2.6	Uporaba programa BLAST preko spletnega strežnika NCBI	24
3.2.7	Primerjava s sevi v genski banki in tipizacija sevov PRRSV ugotovljenih v Sloveniji	24
3.2.8	Pošiljanje sekvenc 68 sevov PRRSV v gensko banko	24
4	REZULTATI	25
4.1	Izbor sevov PRRSV za genetsko karakterizacijo.....	25
4.1.1	Pomnoževanje nukleinskih kislin PRRSV s klasično metodo RT-PCR	25
4.2	Določitev nukleotidnega zaporedja 68 sevov PRRSV iz Slovenije.....	26
4.3	Genetska raznolikost sevov PRRSV v ORF5, ugotovljenih v Sloveniji	33
4.4	Razvrstitev nukleotidnih zaporedij 68 sevov PRRSV iz Slovenije znotraj najnovejše klasifikacije.....	35
4.4.1	Primerjava evropskih sevov PRRSV iz različnih klad genotipa 1 (1, 1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F) po najnovejši klasifikaciji PRRSV	35
4.4.2	Razvrstitev 68 sevov PRRSV iz Slovenije v klade	36
4.5	Medsebojna primerjava aminokislinskih zaporedij 68 sevov PRRSV iz Slovenije.....	43
4.6	Primerjava nukleotidnih zaporedij 68 sevov PRRSV z najbližjimi sevi iz genske banke	44
4.7	Primerjava pozitivnih vzorcev PRRSV znotraj iste reje	52
4.8	Dostopnost podatkov o 68 sekvencah slovenskih vzorcev PRRSV v genski banki (GenBank).....	52
5	RAZPRAVA	53
6	SKLEPI	60
7	ZAHVALA.....	61
8	LITERATURA	62

KAZALO TABEL

Tabela 1: Veljavna taksonomija družine <i>Arteriviridae</i> (povzeto po International Committee on Taxonomy of viruses – ICTV, 2018).....	7
Tabela 2: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje odseka PRRSV v regiji ORF5 gena za strukturni protein GP5..	18
Tabela 3: Prikaz 68 sekvenc sevov PRRSV iz 56 rej prašičev, pri katerih smo določili nt zaporedje v celotnem ORF5. Navedeno je ime, datum vzorčenja, občina in najbližji sev v genski banki (primerjava na dan 1. junij 2019) ter št. pod katero je sev dostopen v genski banki..	27
Tabela 4: Občine, v katerih smo v rejah prašičev pozitivnih na PRRSV določili nt zaporedje v celotni regiji ORF5 virusnega genoma PRRSV.	34
Tabela 5: Prikaz identičnosti v zaporedju nt med referenčnim sevom PRRSV Lelystad (M96262) in predstavniki posamezne klade. Navedeno je tudi število slovenskih sevov, ki spadajo v posamezno klado (iz te študije).....	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematska predstavitev genoma PRRSV, ki vsebuje devet ORF (povzeto po The University of Maryland, ZDA). https://vetmed.umd.edu/research/porcine-reproductive-and-respiratory-syndrome	6
Slika 2: Shematska predstavitev klasifikacije PRRSV v klade 1, 1A-1G, 2, 3A-3G (Balka in sod., 2018).	13
Slika 3: Rezultati pregleda 127 vzorcev, pri katerih smo dokazovali nukleinsko kislino PRRSV v regiji ORF5 z metodo RT-PCR.	25
Slika 4: Prikaz vzorcev v 1,8 % agaroznem gelu. Pričakovana velikost produkta pri pozitivnih vzorcih je 662 nt (vzorci v kolonah 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16). Kolone s preiskovanimi vzorci od 1 do 22, 23: negativna kontrola, 24: pozitivna kontrola, M: molekularni označevalec (z naraščajočo lestvico fragmentov po 100 bp)..	26
Slika 5: Sken originalnega izpisa zaporedja prvih 620 nt za vzorec 190A/2016 (oznaka vzorca za sekvenciranje je bila P6) dobljen z začetnim oligonukleotidom EUORF5B.....	32
Slika 6: Filogenetsko drevo (program MegAlign, DNASTAR, Lasergene) prikazuje 606 nt ORF5 z 12 predstavniki klad (1, 1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F, povzeto po Balka in sod., 2018) in 68 slovenskimi sevi PRRSV ter 19 najbližjimi tujimi sevi PRRS iz genske banke. Merilo prikazano pod filogenetskim drevesom odraža nt razlike med sevi PRRSV v odstotkih.	37
Slika 7: Filogenetsko drevo (program MEGA6) prikazuje 606 nt ORF5 skupaj s predstavniki klad (1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F, povzeto po Balka in sod., 2018), 68 slovenskimi sevi PRRSV ter 19 najbližjimi tujimi sevi PRRSV iz genske banke, vzorci so označeni z rdečimi krogi.	39
Slika 8: Filogenetsko drevo (program MegAlign, DNASTAR, Lasergene) prikazuje medsebojno sorodnost 12 predstavnikov klad (1, 1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F) na podlagi primerjave 606 nt regije ORF5 genoma PRRSV. Merilo prikazano pod filogenetskim drevesom odraža nt razlike med sevi PRRSV v odstotkih.	42
Slika 9: Prikaz odstotkov medsebojne identičnosti in razlik v regiji ORF5 genoma PRRSV, na podlagi primerjave 606 nt za predstavnike klad (1, 1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F).....	42
Slika 10: Filogenetsko drevo (program MegAlign DNASTAR, Lasergene) prikazuje primerjavo 606 nt ORF5 za 41 sevov PRRS iz klade 1B, skupaj s sevom Lelystad, ki spada v klado 1F in predstavnikom klade 1B iz Poljske. Merilo prikazano pod filogenetskim drevesom odraža nt razlike med sevi PRRSV v odstotkih.	45
Slika 11: Medsebojna primerjava identičnosti zaporedja 606 nt, prikazana v % za nekatere slovenske seve iz klade 1B, skupaj s predstavnikom iz klade 1B in referenčnim sevom Lelystad. Tabela je izrisana s programom MegAlign (DNASTAR, Lasergene).....	46
Slika 12: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno ORF5 PRRS v letu 2010. Barva kroga predstavlja določeno klado.	47

Slika 13: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno ORF5 PRRS v letu 2011. Barva krogca predstavlja določeno klado.	47
Slika 14: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno ORF5 PRRS v letu 2012. Barva krogca predstavlja določeno klado.	48
Slika 15: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno ORF5 PRRS v letu 2013. Barva krogca predstavlja določeno klado.	48
Slika 16: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno ORF5 PRRS v letu 2014. Barva krogca predstavlja določeno klado.	49
Slika 17: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno ORF5 PRRS v letu 2015. Barva krogca predstavlja določeno klado.	49
Slika 18: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno ORF5 PRRS v letu 2016. Barva krogca predstavlja določeno klado.	50
Slika 19: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno ORF5 PRRS v letu 2017. Barva krogca predstavlja določeno klado.	50
Slika 20: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno ORF5 PRRS v letu 2018. Barva krogca predstavlja določeno klado.	51

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

ak	aminokislina
BLAST	osnovno spletno orodje za primerjavo sekvenc
cDNA	komplementarna molekula DNA
dATP	deoksiadenozin-trifosfat
dCTP	deoksicitidin-trifosfat
dGTP	deoksigvanozin-trifosfat
dTTP	deoksitimidin-trifosfat
DN-aza	encim deoksiribonukleaza, ki razgrajuje DNA
DNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
ELISA	encimsko imunski test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)
GP	glikoprotein
HP-PRRSV	visoko patogen sev PRRSV (highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus)
NCBI	National Center for Biotechnology Information, ZDA
nsp2	nestrukturni protein 2
nt	nukleotid
ORF	odprti bralni okvir (open reading frame)
PAM	pljučni alveolarni makrofagi
PCR	verižna reakcija s polimerazo (Polymerase Chain Reaction)
PK-15	celična kultura PK-15
RNA	ribonukleinska kislina (ribonucleic acid)
RN-aza	encim ribonukleaza, ki razgrajuje RNA
PRRS	prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom

PRRSV	virus prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma (porcine reproductive and respiratory syndrome virus)
RT	encim reverzna transkriptaza
RT-PCR	reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (reverse transcription polymerase chain reaction)
UTR	nekodirajoča regija (untranslated region)
ZDA	Združene države Amerike

1 UVOD

Praščereja je pomembna panoga v svetovnem gospodarstvu, ki naj bi v letu 2018 proizvedla približno 8,5 milijona ton svinjine. Evropska unija je največji svetovni izvoznik praščjega mesa, ki letno znaša okoli 3 milijone ton, zato je praščereja pomembna gospodarska panoga v evropskem prostoru (MKGP RS, 2009).

V Sloveniji ima praščereja dolgoletno tradicijo, vendar pa proizvodnja praščev predstavlja samo okoli 8% k celotni vrednosti živinoreje. Kljub dokaj visoki letni porabi svinjskega mesa na prebivalca, ta naj bi leta 2016 znašala 40,5 kg, je delež samooskrbe pri nas izjemno nizek, samo okoli 35%, zato je Slovenija pomemben neto uvoznik (MKGP RS, 2009). Prav nizke odkupne cene svinjskega mesa, ki silijo kmete k uvozu cenejših praščev iz tujine in pa neizvajanje karantene, sta dva izmed glavnih razlogov za vnos povzročiteljev različnih bolezni v našo državo. Ker je Slovenija dežela, kjer imamo tradicionalno večinoma manjše reje in so veliki rejci prej redkost kot pravilo, je bila ravno virusna bolezen, poimenovana praščji reprodukcijski in respiratorni sindrom (PRRS) eden od pomembnejših dejavnikov, ki je vplivala na današnje slabo stanje praščereje pri nas in bo ob neustrezni preventivi imela pomembno ekonomsko vlogo tudi v prihodnje.

PRRS je virusna bolezen, ki v praščereji povzroča veliko ekonomsko škodo, saj prizadene vse kategorije praščev, od sesnih pujskov do tekačev in pitancev, prav tako vpliva na reprodukcijske parametre odraslih živali in na število abortusov ter mrtvorojenih praščev. Klinični znaki se kažejo z visoko telesno temperaturo, kašljem, pljučnico in poginom. Posledice okužbe se kažejo kot upočasnjena rast, slabša konverzija krme, povečana umrljivost živali, manjšem skupnem številu živih praščev in višjimi stroški na kilogram vzrejenega praščjega mesa (Zimmerman JJ in sod., 2012; Toplak, 2015).

Da bi lažje razumeli vpliv bolezni na ekonomiko praščereje, navajamo primer farme s 650 plemenskimi svinjami, kjer se je povprečno število prasitev zmanjšalo iz 2,68 na 2,17, letno pa so prodali 659 manj praščev. Neto dobiček rejca, na zdravo svinjo naj bi se gibal okoli 182 €, ob izbruhu PRRS pa naj bi bil ta negativen in to kar -88 €, kar nanese 271 € razlike. Na farmi, usmerjeni izključno v vzrejanje, pa naj bi neto dobiček z 22 € padel na 10 € na prašča, torej kar 12 € razlike na prašča. Podatki se nanašajo na države Evropske unije, ki so trenutno v zgornji tretjini po produktivnosti v praščjereji, to so Belgija, Danska, Francija, Irska, Nemčija in Velika Britanija. (DiPietre in Mulberry, 2017).

Članice Evropske unije so zavezane k prostemu pretoku blaga in storitev, zaradi globalizacije in prostega trga, pa smo tako soočeni tudi s potencialnimi vsakodnevnimi vnosi bolnih praščev, okuženih s PRRSV, v Slovenijo. Ker je virus pri nas že prisoten, se le ta širi tudi znotraj Slovenije. Ti dejavniki torej ustvarjajo pogoje, ki poleg širjenja različnih sevov virusa, omogočajo tudi rekombinacijo le tega, kar ima za posledico ustvarjanje novih sevov, ki so si

med seboj bolj ali manj sorodni. Poleg vsega naštetega, pa je tudi PRRSV sam po sebi genetsko zelo spremenljiv, kar spet omogoča nastanek novih sevov.

Sevi virusa so izjemno raznoliki, zato mora biti vakcinalni sev čim bolj homologen sevu, ki kroži v populaciji prašičev. Le tako lahko zagotovimo, da bo cepljenje zaščitilo živali pred okužbo. Vendar je cepljenje le eden od ukrepov, ki jih lahko izvedemo v okuženi reji. Za boljši nadzor bolezni PRRS v Sloveniji je nujno, da se pridobivajo najnovejši podatki o genetski raznolikosti sevov PRRSV pri nas, kot tudi da se spremlja širjenje virusa. Tako lahko ugotovimo, ali je določen sev endemično prisoten ali pa je bil vnesen v državo šele pred kratkim. V tujini se molekularno-epidemiološke raziskave osredotočajo predvsem na regijo ORF5 virusnega genoma, za katero je tudi največ podatkov v genski banki. Pri nas imamo večino podatkov tipiziranih slovenskih sevov PRRSV za regijo ORF7 (Toplak, 2015), medtem ko imamo za regijo ORF5 le podatke za sedem tipiziranih virusov PRRS, ki so bili objavljeni leta 2018 (Balka in sod., 2018). To dejstvo je prispevalo k odločitvi za bolj obsežno proučevanje virusov PRRS tudi v regiji ORF5, kar nam bo omogočilo tudi primerjavo s sevi PRRSV, ki so prisotni v evropskih in drugih državah po svetu.

1.1 Opredelitev problema

Tipizacija slovenskih sevov PRRSV je do sedaj temeljila na regiji ORF7 virusnega genoma (Toplak, 2015). Vendar pa se večina molekularno-epidemioloških študij v svetu usmerja v proučevanje regije ORF5 (Balka in sod., 2018). Zato smo se odločili, da slovenskim sevom PRRSV določimo tudi nt zaporedja regije ORF5 in jih primerjamo med seboj kot tudi s sekvencami sevov PRRSV, ki so prisotni v drugih državah. Tipizacija sevov PRRSV, ugotovljenih na območju Slovenije, je pomembna tako za spremljanje epizootiološkega stanja in bolezni PRRSV pri prašičih v Sloveniji kot tudi za spremljanje širjenja PRRSV v regionalnem in širšem mednarodnem prostoru.

1.2 Cilj raziskovanja

Z določitvijo nt zaporedja regije ORF5 želimo ugotoviti, kateri sevi PRRSV so prisotni v Sloveniji. Poskušali bomo ugotoviti njihov izvor in poti širjenja v slovenskem prostoru. PRRSV bomo dokazovali v organih poginulih prašičev, ki smo jih zbrali med leti od 2009 do 2018. Celotni odsek regije ORF5 bomo pomnoževali s klasično metodo RT-PCR, produktu pa bomo nato določili nt zaporedje. Dobljena zaporedja bomo primerjali z zaporedji v genski banki in na podlagi pridobljenih podatkov o nt in ak zaporedju v regiji ORF5 izdelali filogenetske primerjave.

1.3 Delovne hipoteze

1. Sevi PRRSV, ki jih najdemo v Sloveniji, so genetsko heterogeni.
2. Tipizirani sevi PRRSV so genetsko zelo sorodni (> 95,0 %) s sevi iz genske banke.
3. Isti sev PRRSV lahko najdemo v večjem številu okuženih rej, kar dokazuje neposredno povezavo za prenos virusa med njimi.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Pregled zgodovinskih podatkov o pojavljanju virusa PRRS

Bolezen PRRS so prvič zaznali v Združenih državah Amerike (ZDA) leta 1980 in jo zaradi zelo raznolikih znakov okužbe poimenovali misteriozna bolezen prašičev. Leta 1990 so pri prašičih v Nemčiji odkrili podobne klinične spremembe, ter jo poimenovali epidemični abortivni in respiratorni sindrom oziroma bolezen modrih uhljev, angl. "blue-ear pig disease", po značilnem cianotičnem obarvanju ušes bolnih prašičev. Po odkritju virusnega povzročitelja bolezni je bolezen poimenovana s kratico PRRS (Cavanagh, 1997; Lunney in sod., 2010; Kappes in Faaberg, 2015).

Pri mladih prašičih so opazili respiratorne klinične znake, medtem ko so pri brejih svinjah opisali predvsem reprodukcijske težave, ki so se kazale v obliki abortusov oziroma v rojstvu mumificiranih in mrtvorojenih mladičev (Lunney in sod., 2010; Kappes in Faaberg, 2015).

Čeprav so klinični znaki, fenotip in organizacija genoma pri PRRSV, ki so jih ugotovili v ZDA in v Evropi podobni, pa so med evropskimi izolati (poimenovanimi genotip 1) in ameriški izolati (poimenovanimi genotip 2) odkrili kar 40,0 % razliko v celotnem nt zaporedju virusnega genoma, kar je nakazovalo na to, da se je PRRSV na vsaki celini razvijal že daljše obdobje ločeno, ne da bi zaznali okužbe pri prašičih (Kappes in Faaberg, 2015). Molekularne raziskave nakazujejo, da sta se oba genotipa razvila iz istega prednika, okoli 10 do 100 let pred dejansko zaznavo te bolezni. Obstaja tudi verjetnost, da je virus v preteklosti okuževal drugega gostitelja. Tako izvor PRRSV ostaja neznanka, namreč do danes še niso odkrili vektorja, ki bi bolezen lahko prenašal (Kappes in Faaberg, 2015).

2.1.1 Prve ugotovitve PRRS pri domačem prašiču

Referenčni sev genotipa 1, Lelystad virus, so prvi odkrili nizozemski raziskovalci iz Centralnega raziskovalnega inštituta v Lelystadu leta 1991, kjer so kot povzročitelja bolezni opisali majhen RNA virus z ovojnico. Podoben virus so istočasno odkrili v ZDA in ga poimenovali VR-2332, ki danes predstavlja referenčni sev za genotip 2. Leto kasneje so enak sev PRRSV odkrili še v Kanadi. Virus so uvrstili v rod *Arterivirus*, družino *Arteriviridae* (Lunney in sod., 2010).

V Evropi se je bolezen najprej pojavila v Nemčiji, leta 1990, potem pa na Nizozemskem, v Španiji, Belgiji in Veliki Britaniji. V večini evropskih držav je bolezen danes endemično prisotna (Lunney in sod., 2010).

V Sloveniji smo bili do leta 2004 prosti bolezni in vse pregledane živali so bile brez protiteles proti PRRSV (Valenčak in sod., 2004). Po vstopu v Evropsko unijo se je sprostil trg s prašiči in bolezen se je z bolnimi prašiči hitro vnesla v naše reje. Prvič smo PRRSV v Sloveniji dokazali z metodo RT-PCR leta 2009, v študiji leta 2010 pa so PRRSV dokazali v 45,2 % od 210 pregledanih vzorcev (Toplak in sod., 2010).

Poleti leta 1996 so v ZDA v zveznih državah Iowa, Minnesota, Illinois, Severna Carolina, Colorado, Missouri, Nebraska in drugod poročali o abortusih pri 10,0 – 50,0 % čred, v obdobju 3-6 tednov, s povišanim poginom svinj, živali so bile anoreksične in so imele povišano telesno temperaturo (Halbur in Bush, 1996).

Na Kitajskem so od aprila 2006, v provinci Jiangxi, na nekaterih prašičjih farmah poročali o izbruhu bolezni neznane etiologije, za katero so bili značilni visoka telesna temperatura in povišani pogini vseh starostnih kategorij. Obolevnost je bila 50-100 %, mortalnost pa 20,0 – 100,0 %. V naslednjih mesecih se je bolezen hitro razširila po celi državi. Ostali klinični znaki so bili še anoreksija in modra obarvanost ušes. Kasneje so se pojavile še driska in spremembe, ki so bile posledica sekundarnih okužb. Iz vzorcev srca, ledvic, pljuč, vranice in limfnih vozlov so izolirali visoko patogen sev PRRSV (angl. highly pathogen – HP-PRRSV) in z metodo RT-PCR dokazali PRRSV v 48 od 50 vzorcev (Tong in sod., 2007).

V ZDA se je pomladi leta 2007 pojavil PRRSV sev 1-18-2, ki je povzročil velike pogine in hude reprodukcijske motnje v čredah prašičev v severnem in osrednjem delu ZDA. Virus se je genetsko razlikoval od kitajskega seva iz leta 2006 in ostalih opisanih sevov PRRSV. Opravili so popolno sekvenciranje genoma tega seva 1-18-2, kot še 20 drugih podobno virulentnih virusov in pri vseh so odkrili delecije v regiji za nestrukturni protein 2 (nsp2) (Murtaugh, 2009). Vendar so kitajski raziskovalci kasneje dokazali, da spremembe v regiji nsp2 verjetno niso krive za nastanek zelo patogenih sevov PRRSV (Zhou L in sod., 2009).

2.2 Genom PRRSV

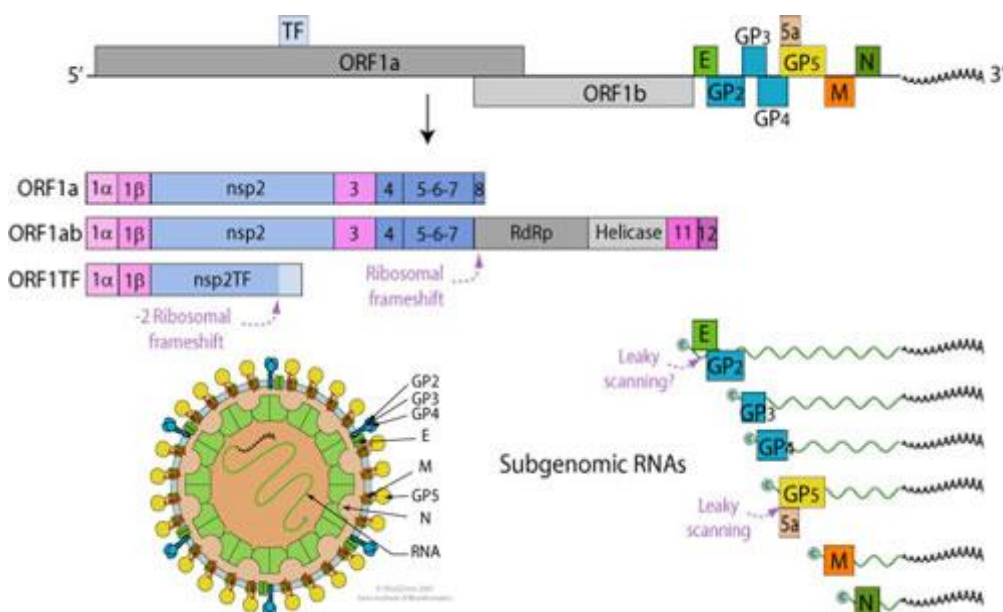
PRRSV spada med manjše viruse z ovojnico, s premerom 45-55 nm in nukleokapsido premera 30-35 nm (Cavanagh, 1997).

Genom PRRSV predstavlja enoverižna pozitivna molekula RNA. Dolžina genoma variira med 14.900 in 15.500 baz, ki kodirajo nestrukturne in strukturne proteine (Slika 1). Genom virusa vsebuje devet ORF, ki se med seboj prekrivajo (Cavanagh, 1997). Na 5' koncu se nahaja nekodirajoča regija (angl. untranslated region –UTR) dolžine 217-222 baz, na 3' koncu pa UTR, dolžine 188-191 baz (Halbur in Bush, 1996).

5' UTR sledita regiji ORF1a in 1b, ki predstavljata tri četrtine genoma PRRSV in kodirata dva poliproteina (1a in 1b), iz njiju pa nastane 14 nestrukturnih proteinov, ki so pomembni za

samo razmnoževanje in sestavljanje virusa. Ostali del genoma kodira osem strukturnih proteinov v kodirajočih regijah ORF2a in 2b, ORF3, ORF4, ORF5 in ORF5a, ORF6, ORF7, ORF8. Glikoproteine membrane (gp 2-5) kodirajo regije ORF2-5, neglikoziliran protein membrane (M) kodira ORF6, protein nukleokapside (N) pa ORF7. Neglikoziliran protein E (envelope) kodira regija ORF2b, protein ORF5a pa kodira regija ORF5a (Kimman in sod., 2009).

Regija ORF5 kodira strukturni protein GP5, ki je glavni protein ovojnice in naj bi bil udeležen pri pritrjevanju in penetraciji virusa v celico. GP5 vsebuje glavni nevtralizacijski epitetop, na katerega se vežejo protitelesa (Fang in sod., 2006).



Slika 1: Shematska predstavitev genoma PRRSV, ki vsebuje devet ORF (The University of Maryland, ZDA). <https://vetmed.umd.edu/research/porcine-reproductive-and-respiratory-syndrome>.

Figure 1: Schematic presentation of PRRSV genom which contains nine ORF (The University of Maryland, USA). <https://vetmed.umd.edu/research/porcine-reproductive-and-respiratory-syndrome>.

2.3 Klasifikacija virusa PRRSV znotraj družine Arteriviridae

PRRSV spada v red *Nidovirales*, družino *Arteriviridae*. V red *Nidovirales* spadata še družini *Coronaviridae* in *Roniviridae*. Virusi iz te družine so si med seboj podobni po načinu razmnoževanja in prepisovanja ter po organizaciji genoma, razlikujejo pa se po velikosti in obliki viriona, tropizmu za določene celice ter okužujejo različne živalske vrste (Halbur in Bush, 1996).

Klasifikacija znotraj družine *Arteriviridae* je težavna, saj so bili virusi, ki spadajo vanjo, odkriti pred razvojem današnjih molekularnih tehnik. Danes je vanjo uvrščenih pet virusov (Tabela 1), zraven PRRSV še t.i. Simian haemorrhagic fever virus (SHFV), Lactate-dehydrogenase elevating virus (LDV), Wobbly possum disease virus (WPDV), ter virus konjskega arteritisa (EAV). Vsak od njih je patogen za eno živalsko vrsto (Halbur in Bush, 1996; Kuhn in sod, 2016). Viruse med seboj ločimo na podlagi razlik v regiji ORF1a in 1b in primerjavi celotnih zaporedij genoma virusov (Kuhn in sod, 2016).

Tabela 1: Taksonomija družine *Arteriviridae* (povzeto po International Committee on Taxonomy of viruses – ICTV, 2018).

Table 1: Taxonomy of family *Arteriviridae* (taken from the International Committee on Taxonomy of viruses – ICTV, 2018).

Veljavna taksonomija družine <i>Arteriviridae</i>	Vrsta živali, za katero je virus patogen
virus PRRS	Prašič
Simian haemorrhagic fever virus (SHFV)	Afriški primati
Lactate-dehydrogenase elevating virus (LDV)	Miši
Wobbly possum disease virus (WPDV)	Oposum
virus konjskega arteritisa (EAV)	Konj

2.4 Epidemiologija virusa PRRSV

Bolezen se je po odkritju na Nizozemskem razširila po evropskih državah. Države kot so Švica, Švedska in Norveška so z natančnim izvajanjem preventivnih ukrepov uspele omejiti izbruhe bolezni in so ostale proste bolezni. Do vstopa v Evropsko unijo je tudi Slovenija uživala status države proste bolezni (Valenčak in sod., 2004), po letu 2004 pa so rejci z ukinjanjem karanten in uvažanjem okuženih prašičev, ter z neupoštevanjem preventivnih ukrepov bolezni odprli vrata (Toplak in sod., 2010). Virus smo v Sloveniji prvič uradno dokazali leta 2009 (Toplak in sod., 2010; Toplak in sod., 2012).

2.5 Patogeneza, klinična slika in patomorfološki znaki okužbe s PRRSV

PRRS poteka v akutni ali v endemični obliki (Suarez, 2000). Po vstopu v organizem se virus pomnožuje v pljučnih alveolarnih makrofagih in nato preko limfe potuje v druga tkiva, kot so možgani, srce, ledvica (Van Reeth, 1997).

Akutna faza traja 7-10 dni, lahko tudi več kot 2 tedna (Done in Paton, 1995). Kaže se kot neješčnost, ki se pojavlja pri vseh kategorijah in traja 3-7 dni. Pri sesnih pujskih je pogin lahko večji od 54 % (Taylor, 2006). Opazimo tudi povišano telesno temperaturo, povišano frekvenco dihanja, limfopenijo, po koži se pojavljajo hiperemična ali cianotična območja (Done in Paton, 1995). Pri svinjah naraste število abortusov, pregonitev, podaljša se obdobje do nove ovulacije, poveča se odstotek svinj z agalaksijo (Hooper in sod., 1992), pogin je večji za 1,0 – 4,0 % oziroma do 30,0 % pri okužbah z zelo virulentnimi sevi (Zhou in Yang, 2010). Merjasci imajo zmanjšan libido in slabšo kvaliteto semena (Schulze M in sod., 2013). Pri sesnih pujskih lahko opazimo respiratorne motnje, razkrečenost, tresavico, veslanje (Loula, 1991), edem čela, anemijo, trombocitopenijo, krvavitve po telesu, meningitise in poliartritise (Hopper in sod., 1992). Pri tekačih in pitancih v akutnem obdobju naletimo na neješčnost, apatijo, hiperemijo kože, oteženo dihanje brez kašlja, naježenost ščetin, slabšo konverzijo krme in slabši dnevni prirast, izrazitejše sekundarne okužbe.

Pri brejih svinjah se prva znamenja bolezni pojavijo med 2. in 7. dnevom po okužbi, virus doseže tudi reprodukcijske organe in preide skozi placento. Okužba v zadnji tretjini brejosti povzroči poškodbo placent in popkovine, kar povzroči rojstvo mrtvorojenih in slabotnih pujskov (Prieto in sod., 2000; Choen in sod., 2001). V akutni fazi je pogin sesnih pujskov lahko večji od 60,0 % (Prieto in sod., 2000; Choen in sod., 2001). Pri tekačih pa se v akutni fazi pogin poveča za 12,0 – 20,0 % (Loula, 1991). Merjasci pomembno prispevajo k širjenju virusa, saj so ga dokazali v semenu še 92 dni po okužbi (Christoper-Henings, 2000). Virus se razmnožuje v epiteliju zarodnih celic semenovoda in v makrofagih intersticija testisov (Sur in sod., 1997).

Akutna faza bolezni pogosto preide v endemično obliko. Viremiji sledi kronična okužba limfatičnega tkiva, ki lahko traja nekaj mesecev. Bolezen se kaže z rednim ali občasnimi izbruhi značilnega akutnega PRRS (Stevenson in sod., 1993). Klinična znamenja opazimo predvsem pri mladica in merjascih, ki so jih predstavili na okuženo farmo, kot tudi pri tistih svinjah, ki jim je padel titer protiteles (Stevenson in sod., 1993).

Klinična slika variira, saj bolezen lahko poteka asimptomatično ali pa z bolj ali manj zaznavnimi znamenji bolezni. Tipičnih kliničnih znakov za PRRS ni (Stevenson in sod., 1993).

V endemični obliki opazamo pri svinjah reprodukcijske motnje, pri merjascih pa slabšo kvaliteto semena (Zimmerman in sod., 1997). Pri sesnih pujskih se bolezen zaradi maternalnih protiteles običajno ne pojavi, razen kadar mladice ali svinjam pade titer protiteles (Steveneson in sod., 1993). Pri tekačih in pitancih pa opazimo respiratorne motnje, slabši prirast, pogin je 12,0 – 20,0 % (Loula, 1991; Stevenson in sod., 1993).

Patomorfološke spremembe se kažejo v obliki intersticijske pljučnice, ki se pojavi 3 do 28 dni po okužbi in je najbolj izražena 10 do 14 dni po okužbi (Mengeling in Lager, 2000). Pri poginjenih svinjah pogosto opazimo edem pljuč, nefritis in cistitis (Hopper in sod., 1992). Bezgavke so sive in povečane (Mengeling in Lager, 2000). Na plodovih opazimo edem okrog ledvic, edem ligamenta vranice, edem mezenterija, ascites, hidrotoraks in krvavitve po popkovnici (Lager in Halbur, 1996).

2.6 Diagnostične metode

Diagnostika PRRS temelji na subjektivnih informacijah: zgodovini pojavljanja bolezni v reji, kliničnih znakih, makroskopskih in mikroskopskih spremembah ter na objektivnih informacijah: proizvodni rezultati, dokaz virusa, dokaz protiteles (Zimmerman in sod. 2015).

2.6.1 Klinična diagnostika

Na podlagi kliničnih znakov lahko postavimo le sum na PRRS, saj pogosto ni tipičnih kliničnih znakov in pri patoanatomskem pregledu ne najdemo značilnih sprememb. Dokončna potrditev bolezni temelji na laboratorijski diagnostiki (Donadeu in sod., 1999; Toplak in sod., 2010; Zimmerman in sod., 2015).

2.6.2 Serološka diagnostika

Protitelesa lahko dokažemo v serumu, mesnem soku in ustni tekočini. Uporablja se metoda encimsko imunskega testa (angl. enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA), indirektni imunoperoksidazni test na makrofagih, indirektni imunofluorescenčni test in pa virus nevtralizacijski test (Toplak in sod., 2010; Štukelj, 2013).

2.6.3 Virološka diagnostika

Virus lahko dokažemo z metodama imunohistokemije, poznamo imunofluorescenčni test in imunoperoksidazni test. Kot vzorec se lahko uporabijo pljuča, srce, ledvica, bezgavke, vranica, timus in tonzile. Virus lahko tudi izoliramo na celičnih kulturah iz pljučnih alveolarnih makrofagov (PAM). Za vzorec lahko poleg naštetih organov uporabimo tudi serum. Virusno nukleinsko kislino lahko dokažemo z metodo RT-PCR ali metodo RT-PCR v realnem času ter nato določimo nt zaporedje (Donadeu in sod., 1999; Toplak in sod., 2012; Zimmerman in sod. 2015).

2.6.3.1 Verižna reakcija s polimerazo in ugnezdjena verižna reakcija s polimerazo

Pri metodi RT-PCR *in vitro* s pomočjo encima reverzna transkriptaza (RT) prepíšemo virusno RNA v komplementarno molekulo DNA (angl. complementary DNA –cDNA), nato pa pomnožimo željen del genoma po principih metode PCR. RT-PCR lahko poteka enostopenjsko ali dvostopenjsko. Pri enostopenjski potečeta transkripcija z encimom RT in PCR reakcija v istem postopku, medtem ko pri dvostopenjski najprej poteče prepis iz RNA v cDNA, nato pa v ločenem postopku opravimo še PCR reakcijo (Saiki in sod., 1985; Thermofisher Scientific, 2019).

V metodi PCR, s 25-40 ponovitvami treh temperaturnih ciklusov, dosežemo zadostno količino produkta PCR kratkega odseka virusne DNA, da lahko v nadaljevanju določimo ali je v vzorcu prisotna tarčna nukleinska kislina ali ne. Najprej naredimo izolacijo celokupne RNA. Nato pa pripravimo reakcijsko mešanico, ki mora poleg encima RT vsebovati še primeren pufer, temperaturno obstojno od DNA odvisno polimerazo DNA, osnovne gradbene elemente nukleinskih kislin deoksiribonukleotid trifosfate (dATP, dTTP, dCTP in dGTP), vodo in pa oba nukleotidna začetnika, ki sta komplementarna regiji genoma, ki ga želimo pomnožiti. Reakcijski mešanici dodamo izolirano RNA, nato sledi pomnoževanje v avtomatskem pomnoževalniku, ki omogoča natančno vzdrževanje določene temperature in hitro prehajanje (v nekaj sekundah) iz enega temperaturnega območja v drugega (Saiki in sod., 1985; Donadeu in sod., 1999, Kitchin in sod., 1993).

V pomnoževalniku najprej poteče prepis RNA v cDNA pri temperaturi 50 °C. Pri 95 °C poteče denaturacija DNA. Sledi vezava začetnih oligonukleotidov, ki poteka pri temperaturi med 45 in 75 °C, na koncu pa sledi sinteza nove komplementarne DNA v območju med levim in desnim začetnim oligonukleotidom, pri temperaturi med 52 °C in 75 °C (Saiki in sod., 1985; Donadeu M in sod., 1999; Toplak, 2015).

V procesu denaturacije pride do razdvojitve DNA v dve enoverižni molekuli DNA. V naslednji stopnji se začetni oligonukleotidi spojijo s komplementarnim delom tarčnega odseka DNA. Sledi podaljševanje začetnih oligonukleotidov oziroma sinteza nove komplementarne verige DNA v smeri 5' - 3' s pomočjo temperaturno obstojne polimeraze DNA. Ko poteče zadnji cikel, reakcijo ustavimo z ohladitvijo reakcijske mešanice na 4 °C (Saiki in sod., 1985).

2.7 Genotipizacija PRRSV

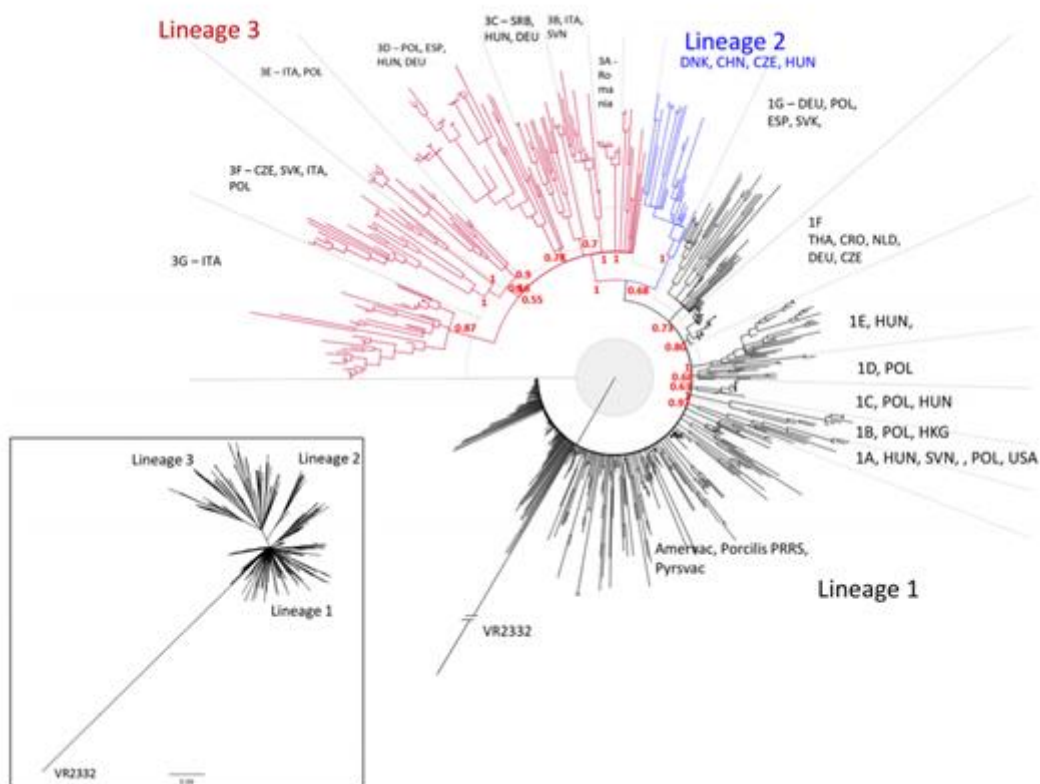
PRRSV se delijo na genotip 1 in genotip 2. Referenčna seva Lelystad in VR-2332 sta med seboj sorodna le v 62,1 %. V začetku so se PRRSV delili v dve homogeni skupini, ameriško in evropsko, kasneje so na podlagi podatkov, pridobljenih na podlagi primerjave nt zaporedij virusnega genoma v regiji ORF5 in ORF7 ugotovili, da v Evropi krožijo genetsko zelo različni sevi virusa. Nato so veliko heterogenost sevov PRRS odkrili tudi v ZDA in Kanadi. Po letu 2000 pa so v evropskih državah občasno začeli ugotavljati tudi ameriške seve in obratno evropske seve v Ameriki in ostalih delih sveta (Stadejek in sod., 2006, 2008).

Tako novejša klasifikacija razvršča PRRSV v genotip 1 (bivša evropska skupina) in genotip 2 (ameriška skupina). Znotraj posameznega genotipa ugotavljajo do 20,0 % razlik v nt zaporedju (Stadejek in sod., 2006, 2008). V območju regije ORF5 genoma PRRSV kažejo evropski izolati med seboj 87,1 - 99,2 % podobnost, ameriški izolati pa med seboj 89,0 – 94,0 % podobnost (Stadejek in sod., 2006; 2008, Balka in sod., 2018).

Velika genetska heterogenost znotraj genotipa 1, ki so jo odkrili po filogenetski analizi zahodnoevropskih in vzhodnoevropskih izolatov virusa PRRS, je botrovala razdelitvi genotipa 1v tri podtipe (linije). Virusi iz zahodne, centralne in vzhodne Evrope, Azije, Severne Amerike, so uvrščeni v podtip 1. V Rusiji najdemo vse 3 podtipe genotipa 1. V Belorusiji pa le seve uvrščene v podtip 3. Razdelitev v tri podtipe opravičujejo tudi razlike v ak zaporedju, ki kodirajo protein nukleokapside (v regiji ORF7), saj ga pri sevih podtipa 1 kodira 128 ak, pri sevih podtipa 2 najdemo 125 ak, pri sevih podtipa 3 pa 124 ak. V nadaljnjih študijah so seve podtipa 1 razdelili še v 12 različnih skupin ali klad, ki so jih poimenovali od A do L, kriterij za razdelitev med posameznimi skupinami pa so razlike v nt zaporedju, ki so večje od 10,0 % (Shi in sod., 2010; Stadejek in sod., 2013).

V študijo leta 2018 so vključili seve, ki so jih odkrili med leti 1994 in 2014 v osrednjem in vzhodnem delu Evrope, ter razdelili podtip 1 na klade 1A-1G. Prvotna razdelitev PRRSV, ki so jih našli v različnih državah sveta, na 12 klad, naj bi bila preobširna. Podtip 2 so predstavljale predvsem danske sekvence, pa tudi češke, madžarske in kitajske. Podtip 3 pa so prav tako razdelili na klade in sicer od 3A-3G, v katerih so sevi, ki so jih našli v različnih evropskih državah (Slika 2). Slovenski sevi so se uvrstili v klade 1A, 3B in 3D (Balka in sod., 2018).

Genotip 2 lahko razdelimo v devet genetskih linij, ki se med seboj razlikujejo v nt zaporedju v več kot 10,0 %. Leta 2015 so izvedli molekularne biološke raziskave sevov iz Tajske in jugovzhodne Azije, v kateri so primerjali 967 vzorcev pozitivnih na PRRSV, ugotovljenih v letih 2008 do 2013, ter jih sekvencirali v regiji ORF5 virusnega genoma. Ugotovili so kroženje genotipa 1 in 2, prav tako pa številne skupine in linije znotraj obeh genotipov (Jantafong in sod., 2015).



Slika 2: Shematska predstavitev klasifikacije PRRSV v klade 1, 1A-1G, 2, 3A-3G (Balka in sod., 2018).

Figure 2: Schematic presentation of PRRSV classification into clades 1, 1A-1G, 2, 3A-3G (Balka et al., 2018).

2.8 Rekombinacija pri PRRSV

Virusni genom je zelo nagnjen k mutacijam, zato se stalno pojavljajo novi sevi. Do rekombinacij prihaja v regijah ORF2, 3, 4, 5 in 7, medtem ko v regiji ORF6 naj ne bi prihajalo do rekombinacij. Prvi *in vitro* poskus rekombinacije je bil opravljen z dvema različnima sevoma PRRS, s katerima so okužili celično kulturo MA-104. Preko klonov virusa in opravljanja pasaj so ugotovili do 10,0 % frekvenco rekombinacij (Halbur in Bush, 1996).

Regiji virusnega genoma ORF7, ki je dokaj stabilna in ORF5, ki je bolj variabilna, se pogosto uporabljata za filogenetske analize sevov virusa PRRS (Stadejek in sod., 2006, 2008; Martín-Valls in sod., 2014; Balka in sod., 2018). Regija ORF5 je še posebej aktualna, saj vsebuje nekatere hipervariabilne in pa manj variabilne segmente, kar znanstveniki s pridom izkoriščajo za lažje ločevanje med posameznimi PRRSV. Na podlagi analiz regije ORF5 so prišli do ugotovitve, da nekaterih sevov ni možno uvrstiti v nobeno izmed klad. Razvrstitve na podlagi regije ORF5 niso kompatibilne z razvrstitvami na podlagi drugih genov, kot recimo regije ORF7. Namreč regija ORF5 je zelo nestabilna, zato tudi verjetno pri njenem

sekvenciranju najdemo seve, ki jih ne moremo uvrstiti v skupine iz prejšnjih filogenetskih analiz (Martín-Valls in sod., 2014).

Leta 2007 so v osrednji Kitajski odkrili sev PRRSV imenovan Em2007, ki je posledica naravne rekombinacije med cepnim sevom PRRSV in naravno krožečim sevom virusa, ki je soroden sevu VR-2332 v 87,6 % ter sevu Lelystad v 57,9 % (Li in sod., 2009).

Prvotne študije so pokazale, da je rekombinacija v naravi pogost pojav pri sevih PRRSV podtipa 2, ne pa tudi pri podtipu 1. Raziskava, opravljena na regiji ORF5, iz leta 2014 pa je pokazala, da se rekombinacija v naravi pojavlja tudi pri PRRSV podtipu 1 (Martín-Valls in sod., 2014).

2.9 Pregled stanja v Sloveniji

Prve pozitivne reje so v Sloveniji odkrili leta 2009, v izvedeni študiji so vse odkrite PRRSV do leta 2015 tipizirali z določanjem nt zaporedja 258 nt in primerjavo v regiji ORF7 ter tako spremljali pojavljanje različnih sevov pri nas. Spremljali so tudi pogostost pojavljanja različnih sevov v posameznem letu, ter okužene reje spremljali tudi več let zaporedoma (Toplak, 2015).

Genetsko so tipizirali 394 vzorcev prašičev različnih kategorij pozitivnih na PRRSV iz 178 okuženih rej prašičev. Pozitivne reje najdemo po vsej Sloveniji, največ pa v pomurski in štajerski regiji, saj se v teh dveh regijah nahaja največ prašičjih rej pri nas. Na podlagi podatkov študije iz leta 2015 je razvidno, da so se reje okužile preko uvoza okuženih prašičev in semena iz različnih evropskih držav, virus pa se je širil tudi znotraj Slovenije. Večina pozitivnih vzorcev spada v genotip 1, ugotovljena je bila prisotnost 14 podtipov virusa, označenih od 1a-1o, med posameznimi podtipi je bilo ugotovljenih do 16,3 % razlik v nt zaporedju (Toplak, 2015).

Leta 2011 so pri nas prvič ugotovili PRRSV, ki spada v genotip 2. Tako so do leta 2015 odkrili 22 pozitivnih vzorcev, v skupno 12 različnih rejah. Med njimi je bila ugotovljena od 92,5 do 100,0 % identičnost nt zaporedja. Ti virusi se od PRRSV genotipa 1 genetsko zelo razlikujejo (Toplak, 2015).

V šestih rejah pa so ugotovili prisotnost obeh genotipov virusa PRRS (razlika v nt zaporedju je bila večja od 35,0 %), kar potrjuje, da lahko v kratkem časovnem obdobju ugotovimo dva genetsko zelo različna PRRSV v isti reji (Toplak, 2015).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Odvzem organov poginjenih prašičev pozitivnih na PRRSV

V raziskavi smo uporabili arhivske vzorce predhodno tipiziranih sevov PRRSV v regiji ORF7 (Toplak, 2015), ki so se zbirali od leta 2009 do 2018 (arhiv Laboratorija za virologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani). Uporabili smo vzorce različnih organov poginjenih prašičev v katerih so PRRSV ugotavljali z metodo RT-PCR (Toplak in sod., 2012, Toplak, 2015). Iz vzorcev organov (tonzil, pljuč, bezgavk, vranice, ledvic) smo pripravili suspenzijo. 2 ml suspenzije homogeniziranih vzorcev smo s pipeto s sterilnim nastavkom s filtrom prenesli v 2 ml epruvete z navojem, ter jih shranili na $< -50^{\circ}\text{C}$ do nadaljevanja dela.

3.2 Metode

3.2.1 Izvedba postopkov v prostorih laboratorija za molekularno virologijo

Laboratorij za molekularno virologijo je razdeljen na več prostorov, v katerih se izvaja molekularna diagnostika virusnih bolezni živali. Ločenost prostorov je pomembna zaradi preprečevanja morebitne navzkrižne kontaminacije.

V ločenih prostorih smo izolirali virusno RNA, pripravili reagente za RT-PCR in dokazali produkte RT-PCR. Pri delu smo se posluževali preoblačenja v zaščitna oblačila, namenjena za delo v laboratoriju, in uporabe sterilnih rokavic, ki smo jih med delom večkrat zamenjali. Uporabljali smo sterilne materiale, kot so epruvete, epruvete Eppendorf in steklovino, proste DNA-z in RNA-z, ter kalibrirane pipete in nastavke s filtri za preprečevanje kontaminacije med vzorci. Med različnimi prostori v laboratoriju nismo prenašali pipet, nastavkov, stojal in reagentov (Kitchin in sod., 1993).

3.2.2 Izolacija nukleinskih kislin

Izolacijo nukleinske kisline RNA iz suspenzije vzorca smo izvedli s komercialnim kompletom QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen, Nemčija). Pri tem smo upoštevali številne preventivne ukrepe, da bi se izognili morebitni navzkrižni kontaminaciji med vzorci in preprečili nenamerno kontaminacijo.

Pri delu smo uporabljali zaščitne rokavice in jih večkrat zamenjali. Pri nanašanju vzorcev na kolonice smo pazili, da se z nastavkom nismo dotikali zunanjih delov in membran kolonic. Med nanašanjem vzorcev smo vedno zamenjali nastavke s filtrom. Nato smo vsebino vorteksirali in potem še s kratkim centrifugiranjem odstranili kapljice z notranjosti pokrova epruvetk. Pazljivi smo bili na morebitno kontaminacijo rokavic z vzorcem, ki smo jih v primeru kontakta takoj zamenjali. Vsakič smo imeli odprto samo eno epruveto Eppendorf naenkrat, pri tem smo pazili, da nismo ustvarili aerosola. Pokrovčke epruvet z vzorci in reagenti smo zapirali sproti ter pazili, da ni prišlo do kontaminacije.

3.2.2.1 Izolacija nukleinskih kislin s komercialnim kompletom QIAamp Viral RNA Kit

Virusno RNA smo izolirali s komercialnim kompletom QIAamp Viral RNA Kit po navodilih proizvajalca (QUIAGEN, 2018). Vzorec smo najprej denaturirali z denaturacijskim pufrom, pri čemer smo inaktivirali RNA-ze in zagotovili izolacijo nepoškodovane nukleinske kisline virusov. Nato smo virusno RNA vezali na membrano, potem pa s pomočjo dveh pufrov za spiranje, AW1 in AW2, odstranili neželene snovi, ki bi lahko zavirale pomnoževanje nukleinskih kislin. Tako smo z izolacijo dobili čisto virusno RNA, prosto proteinov, nukleaz in drugih kontaminantov ter inhibitorjev.

Reagente smo vzeli iz zamrzovalnika in jih pustili na sobni temperaturi 18 - 25 °C približno pol ure, da so se odtopili. Epruvetko z liofilizirano "carrier RNA" smo raztopili v 310 µl pufru AVE in, glede na število vzorcev, ustrezno količino "carrier RNA" dodali k pufru AVL. Poleg tega smo pred prvo uporabo kompleta z dodajanjem absolutnega etanola pripravili delovni raztopini pufru AW1 in AW2.

- Za posamezni vzorec smo pripravili 1,5 ml epruvete, jih označili in vanje odpipetirali 560 µl pufru AVL s »carrier RNA«.
- V epruvete s pufrom AVL smo dodali 140 µl vzorca (pripravljenega iz homogenata tkiv), vsebino epruvete dobro premešali na vorteksu in inkubirali 10 minut na sobni temperaturi. S postopkom kratkega centrifugiranja smo odstranili tekočino s pokrova epruvet.
- Vsebinsi epruvete smo dodali 560 µl absolutnega etanola (100,0 %). Vsebinsi smo nato premešali na vorteksu in kratko centrifugirali.

- 630 µl mešanice iz 1,5 ml epruvetke smo nanесли na označeno QIAamp kolonico in centrifugirali 1 minuto pri 8.000 rpm. Filtrat v zbirni epruveti smo zavrgli in postopek ponovili.
- Na kolono smo nanесли 500 µl pufra AW1 in centrifugirali eno minuto pri 8.000 rpm. Filtrat smo zavrgli, zamenjali zbirno epruveto in nanесли 500 µl pufra AW2. Sledilo je centrifugiranje 3 minute pri 14.000 rpm.
- Kolono smo prenesli v novo 1,5 ml epruveto in na membrano kolone nanесли 60 µl pufra AVE. Sledila je inkubacija 1 minuto in nato centrifugiranje 1 minuto pri 8.000 rpm. Kolono smo zavrgli, izolirano DNA pa shranili v zamrzovalniku pri $< -60^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 Dokazovanje nukleinskih kislin PRRSV s klasično metodo RT-PCR

Ker je regija ORF5 zelo spremenljiva, smo pri pomnoževanju z metodo RT-PCR testirali različne kombinacije začetnih oligonukleotidov in optimalne temperaturne režime v termopomnoževalniku. Tako smo na koncu pripravili postopek, pri katerem smo virusno RNA najprej pomnožili s klasično metodo RT-PCR, nato pa smo produkte pomnoževanja pomnožili še z notranjimi oligonukleotidnimi začetniki (ugnezdena PCR).

3.2.3.1 Izbira in priprava začetnih oligonukleotidov za izvedbo klasične metode RT-PCR in ugnezdene PCR

Za pomnoževanje nukleinske kisline PRRSV smo uporabili tako klasično metodo RT-PCR kot tudi metodo ugnezdene PCR.

Za klasično metodo RT-PCR smo uporabili par začetnih oligonukleotidov (Stadejek in sod., 2002; Balka in sod., 2007) EUORF5 (pozitivno usmerjen začetni oligonukleotid) (Stadejek in sod., 2002; Balka in sod., 2007) in EUORF5C (negativno usmerjen začetni oligonukleotid) (Tabela 2), s katerima pomnožujemo odsek virusnega genoma PRRSV v dolžini 744 nt v regiji ORF5, ki kodira strukturni protein protein GP5 (Tabela 1).

Za metodo ugnezdene PCR smo uporabili par začetnih oligonukleotidov EUORF5B (pozitivno usmerjen začetni oligonukleotid) in EUORF5R (negativno usmerjen začetni oligonukleotid) (Tabela 2), s katerima pomnožujemo odsek virusnega genoma PRRSV v dolžini 662 nt v regiji ORF5, ki kodira strukturni protein protein GP5.

Izdelavo začetnih oligonukleotidov smo naročili pri podjetju SIGMA (Sigma-Aldrich, ZDA). Pred prvim pomnoževanjem smo pripravili zalogo in delovne koncentracije začetnih oligonukleotidov.

Priprava zaloge začetnih oligonukleotidov za izvedbo klasične metode RT-PCR (PCR1):

Epruveti z liofiliziranim začetnim oligonukleotidom EUORF5 smo dodali 228,5 µl ddH₂O in dobili koncentracijo 200 pmol/µl. Epruveti z liofiliziranim začetnim oligonukleotidom EUORF5C smo dodali 227 µl ddH₂O in dobili koncentracijo 200 pmol/µl. Za pomnoževanje kratkega odseka virusnega genoma smo začetna oligonukleotida uporabili v delovni koncentraciji 20 pmol/µl.

Tabela 2: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje odseka PRRSV v regiji ORF5 gena za strukturni protein GP5.

Table 2: Primers for ORF5 region amplification of PRRSV genome encoding structural protein GP5.

Oznaka začetnega oligonukleotida	Oligonukleotidno zaporedje	Mesto prileganja*	Tarčni gen
EUORF5	5'- GTTGCTSCATTTCMTGACAC -3'	13416 - 13434	ORF5
EUORF5C	5'- TATGTIATGCTAAAGGCTAGCAC -3'	14138 - 14160	ORF5
EUORF5B	5'- CAATGAGGTGGGCIACAACC -3'	13442 - 13462	ORF5
EUORF5R	5'- ATCGTCTAGGCCTCCCATTG -3'	14085 - 14104	ORF5

*Mesto prileganja je določeno glede na referenčni sev PRRSV Lelystad, Nizozemska (M96262)

* Position of annealing is determined on the strain PRRSV Lelystad, Netherlands (M96262)

Priprava zaloge začetnih oligonukleotidov za izvedbo metode ugnezdene PCR (PCR2):

Epruveti z liofiliziranim začetnim oligonukleotidom EUORF5B smo dodali 207,5 µl ddH₂O in dobili koncentracijo 200 pmol/µl. Epruveti z liofiliziranim začetnim oligonukleotidom EUORF5R smo dodali 242 µl ddH₂O in dobili koncentracijo 200 pmol/µl. Za pomnoževanje kratkega odseka virusnega genoma smo začetna oligonukleotida uporabili v delovni koncentraciji 20 pmol/µl.

3.2.3.2 Priprava reakcijske mešanice za pomnoževanje kratkih odsekov genoma PRRSV s klasično metodo RT-PCR (PCR 1)

Za pomnoževanje nukleinske kisline PRRSV smo uporabili komplet reagentov podjetja Qiagen, One-step RT-PCR Kit (Qiagen, Nemčija). Pomnoževanje smo izvajali v kalibriranem termopomnževalniku T1 (Biometra, Nemčija). Najprej smo reagente odtopili, vorteksirali in

kratko centrifugirali. Pri pomnoževanju z metodo RT-PCR smo vedno vključili najmanj eno negativno in eno pozitivno kontrolo. Za negativno kontrolo smo uporabili ddH₂O (prosto RNA-z in DNA-z), kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili vzorec referenčnega seva PRRSV Leystad.

Za pomnoževanje PRRSV s klasično metodo RT-PCR smo pripravili reakcijsko mešanico v končnem volumnu 25 µl. Reakcijska mešanica je vsebovala:

- 10 µl deionizirane vode (ddH₂O, prosta RNA-z in DNA-z)
- 5 µl PCR pufra
- 1 µl dNTP mix 10 mM
- 1 µl začetnega oligonukleotida EUORF5 (končne koncentracije 20 pmol/µl)
- 1 µl začetnega oligonukleotida EUORF5C (končne koncentracije 20 pmol/µl)
- 1 µl RT-PCR Enzyme Mix
- 6 µl izolirane RNA preiskovanega vzorca (oz. kontrole)

Pomnoževanje na termopomnoževalniku je potekalo pod naslednjimi pogoji:

- 1 cikel 30 minut, 50 °C
- 1 cikel 2 minuti, 94 °C
- 40 ciklov
 - 30 sekund, 94 °C
 - 2 minuti, 52 °C
 - 1 minuta, 72 °C
- 1 cikel 7 minut, 72 °C
- hlajenje reakcijske mešanice na 4 °C

3.2.3.3 Priprava reakcijske mešanice za pomnoževanje kratkih odsekov genoma PRRS z notranjimi začetnimi nukleotidi (ugnezdena PCR, PCR 2)

Za določanje prisotnosti nukleinske kisline PRRSV smo uporabili komplet reagentov podjetja Qiagen, One-step RT-PCR Kit (Qiagen, Nemčija) in notranje začetne oligonukleotide (Tabela 1). Pričakovana velikost produkta PCR je 662 nt.

Za pomnoževanje predhodno pridobljenih produktov PRRSV s klasično metodo RT-PCR (PCR 1) smo pripravili reakcijsko mešanico v končnem volumnu 25 μ l. Reakcijska mešanica je vsebovala:

- 14 μ l deionizirane vode (ddH₂O, prosta RNA-z in DNA-z)
- 5 μ l PCR pufra
- 1 μ l dNTP mix 10 mM
- 1 μ l začetnega oligonukleotida EUORF5B (končne koncentracije 20 pmol/ μ l)
- 1 μ l začetnega oligonukleotida EUORF5R (končne koncentracije 20 pmol/ μ l)
- 1 μ l RT – PCR Enzyme Mix
- 2 μ l produkta predhodno izvedene klasične metode RT-PCR preiskovanega vzorca (oz. kontrole)

Pomnoževanje je na termopomnoževalniku T1 za pomnoževanje nukleinskih kislin potekalo:

- 1 cikel 30 minut, 50 °C
- 1 cikel 2 minuti, 94 °C
- 40 ciklov
 - 30 sekund, 94 °C
 - 2 minuti, 52 °C
 - 1 minuta, 72 °C
- 1 cikel 7 minut, 72 °C
- hlajenje reakcijske mešanice na 4 °C

3.2.3.4 Dokazovanje produktov ugnezdene PCR z elektroforezo v agaroznem gelu

Prisotnost produktov PCR 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 delovne koncentracije pufra TAE. Raztopino smo v mikrovalovni pečici segrevali do vrelišča in medtem večkrat premešali. Ko se je agaroz popolnoma

raztopila, smo raztopino ohladili na približno 50 °C in prelili v pripravljeno kadičko za elektroforezo.

Na površini gela smo s papirnato brisačo odstranili manjše mehurčke, ki bi lahko motili ločevanje produktov. Dodali smo še glavniček in pustili stati 15 min, da se je gel strdil. V kadičko za elektroforezo smo nalili 1 l delovne koncentracije pufra TAE in vanj potopili gel. Posameznemu vzorcu smo dodali 2,5 µl barvila (6 x DNA Loading dye, Thermo Scientific, ZDA Fermentas) in vzorec nanesti v jamice pripravljenega gela. V zadnjo jamico smo nanesti 2 µl molekularnega označevalca z lestvico velikosti fragmentov v razmiku 100 baznih parov (GeneRuler 100 bp, Thermo Scientific, ZDA) pomešanega s 3 µl barvila (6 x DNA Loading dye, Thermo Scientific, ZDA). Vključili smo elektroforezo, ločevanje produktov je potekalo 60 minut pri napetosti napajalnika 115 voltov. Med potekom elektroforeze smo spremljali potovanje barvila. Po končani elektroforezi smo gel prenesli v plastično posodo, ga prelili s 400 ml raztopine etidijevega bromida (0,5 µg/ml) in pustili stati 15 min. Nato smo raztopino etidijevega bromida odlili in gel sprali z vodovodno vodo. Gel smo pregledali z UV presvetljevalnikom pri ultravijolični svetlobi in sliko gela dokumentirali z E-BOX VX2 ter računalniškim programom ECapt (Vilber Lourmat, Nemčija).

3.2.4 Določanje nukleotidnega zaporedja

Določanje nt zaporedja smo izvedli direktno iz produktov vzorcev, ki smo jih dobili z metodo ugnezdene PCR. Z metodo po Sangerju smo posamezni vzorec direktno sekvencirali v obe smeri z uporabo začetnih oligonukleotidov EUORF5B in EUORF5R.

3.2.4.1 Priprava vzorcev za sekvenciranje v podjetju MacroGen

Sekvenciranje so izvedli v podjetju MacroGen na Nizozemskem. Za sekvenciranje posameznega vzorca smo pripravili 10 µl produkta ugnezdene PCR in po 5 µl začetnega oligonukleotida EUORF5B ter 5 µl EUORF5R. Začetna oligonukleotida smo pripravili v koncentraciji 5 pmol/µl. Vključili smo tudi produkt PCR poznanega vzorca (PRRSV Lelystad), ki nam je služil kot pozitivna kontrola sekvenciranja. Vzorce smo na sekvenciranje poslali po pošti, podatke pa smo vnesli v spletno aplikacijo. Rezultate smo dobili po elektronski pošti čez približno en teden.

3.2.5 Obdelava izpiskov sekvenčnih reakcij s programom DNASTAR

S pomočjo komercialnega računalniškega programa za urejanje sekvenc DNASTAR (Lasergene, ZDA) smo po sekvenciranju uredili vsako nt zaporedje posebej z uporabo treh programov: SeqMan, EditSeq in MegAlign.

3.2.5.1 Uporaba programa SeqMan

Pred začetkom urejanja smo kvaliteto vsake sekvence pogledali v dokumentu datoteke z oznako ".pdf" in ocenili ali je sekvenciranje vzorca uspelo. Nato smo v nadaljevanju izpise zaporedij nt posameznega vzorca uredili, analizirali in obdelali s programom SeqMan programskega paketa DNASTAR (Lasergene, ZDA).

S programom SeqMan smo poravnali oba izpisa nt zaporedja, ki smo ju dobili s sekvenčno reakcijo za posamezni vzorec (po dve zaporedji za vsak vzorec – z vsakim začetnim oligonukleotidom smo dobili eno zaporedje). Za analizo smo uporabili dobljene rezultate sekvenciranja v dokumentu s končnico ".abi", ki vsebuje informacije za odčitane signale zaporedja vseh štirih nt posameznega vzorca. Začetni in končni del posamezne sekvence, ki ni bil jasno berljiv, smo izrezali. Pri pregledu dobljenega zaporedja obeh sekvenc (angl. forward

in reverse) smo pregledali in preverili kvaliteto ter ujemanje posameznih baz nt zaporedja v celotni dolžini sekvence. Po končanem urejanju smo nt zaporedje kopirali v program EditSeq.

3.2.5.2 Uporaba programa EditSeq

Zaporedje nt vseh vzorcev smo shranili s programom EditSeq in nato njihova zaporedja primerjali s sekvencami v genski banki (GenBank) preko spletne strani strežnika NCBI (National Center for Biotechnology Information, ZDA). S programom EditSeq smo, glede na podatek o polarnosti posamezne sekvence (primerjava glede na sekvence PRRSV v NCBI), sekvenco po potrebi "spremenili-obrnili v reverzno komplementarno" in jo shranili s končnico ".seq".

Potem ko smo v programu MegAlign zaključili s primerjavo in poravnavo dolžin vseh dobljenih sekvenc, smo začetni in končni del sekvence izrezali. Tako smo dobili vse sekvence v enaki dolžini in v celoti odstranili sekvenco začetnega oligonukleotida. Vse sekvence naših sevov PRRSV smo shranili v dolžini 606 nt (pozicija nt zaporedja v genomu 13.494 – 14.099, glede na referenčni sev PRRS Lelystad, Nizozemska, M96262). Nato smo s programom EditSeq še pretvorili sekvenco posameznega vzorca v ak zaporedje in dobili zaporedje 202 ak ter ga shranili na računalniku s končnico ".pro".

3.2.5.3 Uporaba programa MegAlign in programa MEGA6

Preko programa MegAlign smo naredili poravnavo nt zaporedij s parametrom Clustal W in slikovno prikazali razlike v nt na posameznih mestih. Razlike med primerjanimi nt in ak zaporedji smo prikazali v tabelah. V primerjavo na filogenetskem drevesu smo vključili najbližje sekvence iz genske banke (GenBank) in reprezentativne predstavnike posameznih genetskih skupin tako imenovanih klad PRRSV, ugotovljenih pri prašičih po svetu.

S programom MEGA6 smo izvedli poravnavo nt zaporedij z metodo Clustal W, poiskali najboljši model in filogenetske primerjave izvedli z modelom Kimura 2-parameter, Gamma porazdelitvijo (K2+G+I), pri 1000 samovzorčenjih (Tamura in sod., 2013).

Filogenetske primerjave v dolžini 606 nt regije ORF5 smo izvedli skupaj s predstavniki klad 1, 1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F, ki smo jih povzeli iz razvrstitve v predhodno objavljene študiji iz leta 2018 (Balka in sod., 2018) in genetsko najbližjimi dostopnimi sevi PRRSV iz genske banke, ki smo jih ugotovili s programom BLAST preko strežnika NCBI.

3.2.6 Uporaba programa BLAST preko spletnega strežnika NCBI

Preko internetnega strežnika NCBI (National Center for Biotechnology Information) smo s spletnim orodjem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI, ZDA) primerjali dobljena nt zaporedja z najbližjimi zaporedji genoma PRRSV v genski banki. Potem smo s pomočjo prve najbližje sekvence, ki smo jo z iskanjem v programu BLAST dobili, v programu SeqMan v naši sekvenci natančno pogledali vsa mesta, kjer smo ugotovili razlike v nt. Sekvence iz genske banke, ki so bile najbližje našim sekvencam, smo vključili v filogenetsko primerjavo. S primerjavo v NCBI smo lahko potrdili ali dobljena zaporedja ustrezajo nt zaporedju PRRSV in dobili podatek, v koliko odstotkih se nt zaporedja naših sevov PRRSV ujemajo z najbližjimi in ostalimi sevi PRRSV, ki so jih ugotovili drugod po svetu in so dostopne v genski banki.

3.2.7 Primerjava s sevi v genski banki in tipizacija sevov PRRSV ugotovljenih v Sloveniji

V primerjavo smo vključili sekvence ORF5 dolžine 606 nt. Tipizacijo smo izvedli za 68 slovenskih sevov, na filogenetskem drevesu pa smo naše seve prikazali skupaj s 33 sevi PRRSV, ki so dostopni v genski banki in so bili ugotovljeni v različnih državah po svetu.

3.2.8 Pošiljanje sekvenc 68 sevov PRRSV v gensko banko

V gensko banko smo poslali 68 sekvenc v dolžini 606 nt. Pri tem smo navedli podatke o imenu vzorca, sekvencirani regiji, datumu vzorčenja, vrsti živali, pri kateri je bil virus ugotovljen, državi ugotovitve in naslovom ter avtorji študije. Za pošiljanje smo uporabili program BankIt. Po izvedenem postopku smo za posamezno sekvenco dobili številko (angl. accession number), preko katere bo sekvenca posameznega seva PRRSV dostopna vsem ostalim raziskovalcem po svetu.

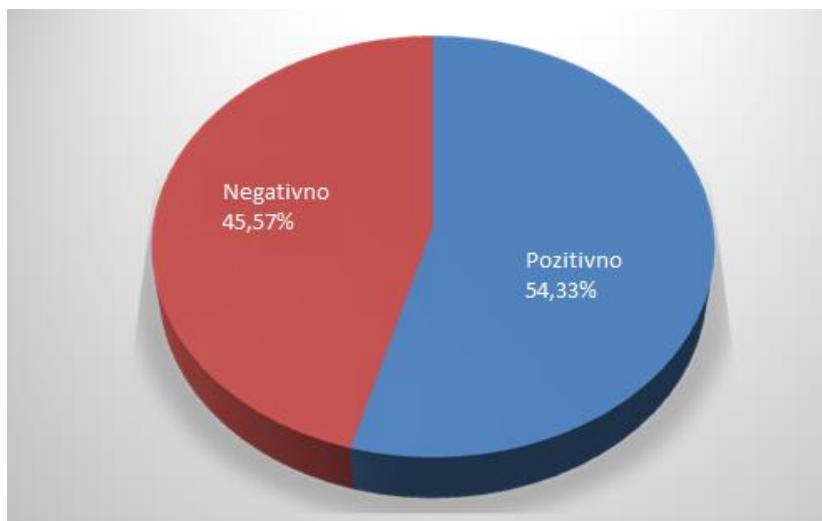
4 REZULTATI

4.1 Izbor sevov PRRSV za genetsko karakterizacijo

Iz arhivske zbirke 500 pozitivnih vzorcev PRRSV, zbranih med leti 2009 in 2018, smo odbrali 127 vzorcev suspenzij organov. Vzorce smo izbirali tako, da smo zajeli genetsko čim bolj različne seve, iz čim večjega števila rej okuženih s PRRS vzorčenih v različnih letih.

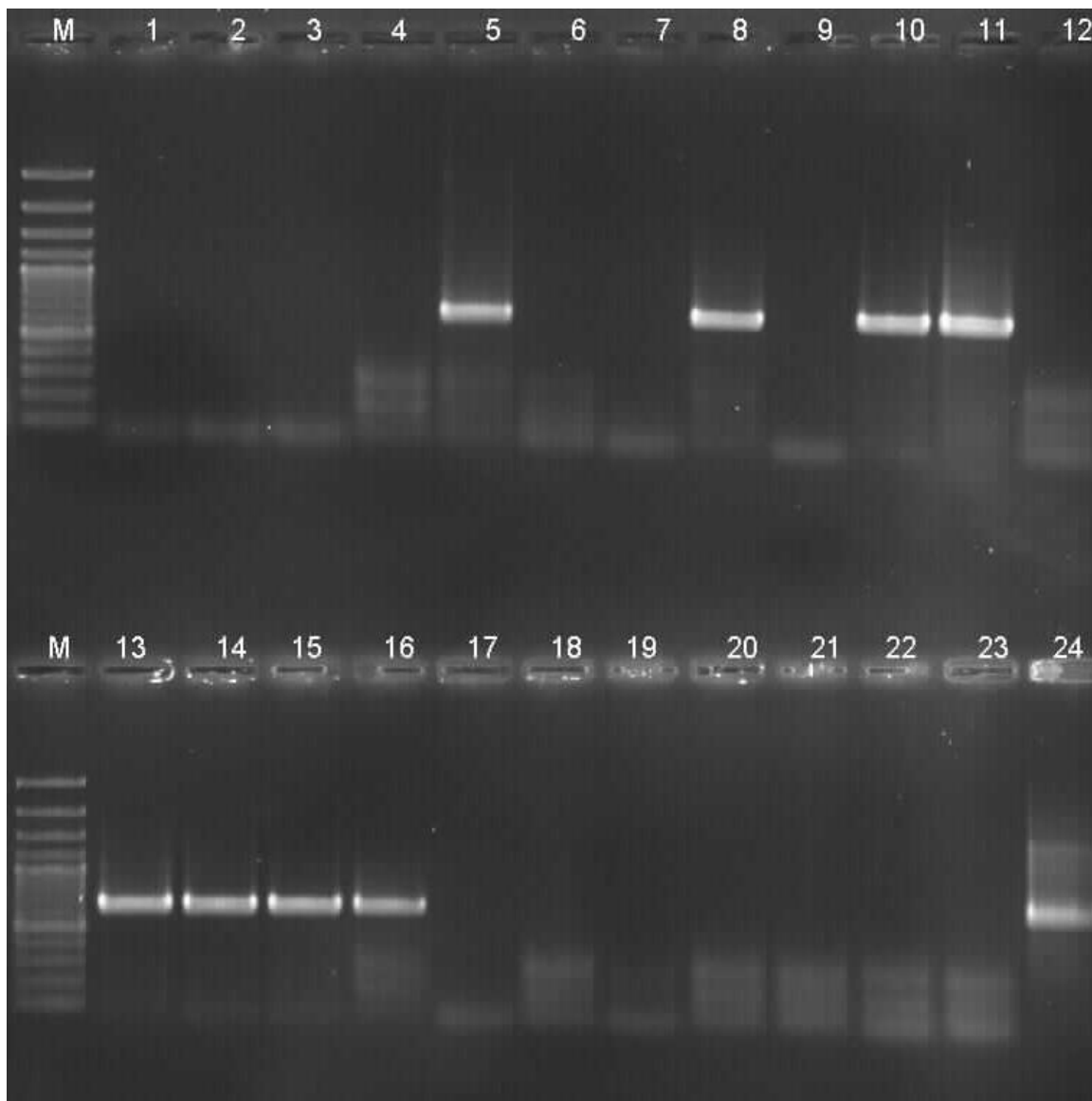
4.1.1 Pomnoževanje nukleinskih kislin PRRSV s klasično metodo RT-PCR

Iz 127 vzorcev smo izolirali nukleinsko kislino virusa PRRS in s klasično metodo RT-PCR in ugnezdno PCR pomnožili odsek genoma, ki kodira regijo ORF5. Dobili smo produkte PCR pričakovane velikosti 662 nt (Slika 4) pri 69 vzorcih (54,33 %). Na sekvenciranje smo poslali samo močno pozitivne vzorce (več kot 50 ng/ μ l) (Slika 3).



Slika 3: Rezultati pregleda 127 vzorcev, pri katerih smo dokazovali nukleinsko kislino PRRSV v regiji ORF5 z metodo RT-PCR.

Figure 3: Results of examination of 127 samples, in which we detected PRRSV nucleic acid with classical RT-PCR method.



Slika 4: Prikaz vzorcev v 1,8 % agaroznem gelu. Pričakovana velikost produkta pri pozitivnih vzorcih je 662 nt (vzorci v kolonah 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16). Kolone s preiskovanimi vzorci od 1 do 22, 23: negativna kontrola, 24: pozitivna kontrola, M: molekularni označevalec (z naraščajočo lestvico fragmentov po 100 bp).

Figure 4: Demonstration of the PCR products in 1.8 % agarose gel. Expected product size of positive samples is 662 nt (samples in columns 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16). Columns with the test samples 1 to 22, 23: negative control, 24: positive control, M: molecular marker (with an ascending scale of 100 bp).

4.2 Določitev nukleotidnega zaporedja 68 sevom PRRSV iz Slovenije

Na neposredno določitev nt zaporedja (sekvenciranje) produktov PCR velikosti 662 nt (celotna regija ORF5 in približno 30 dodatnih nt na vsaki strani produkta pomnoževanja), smo poslali 69 vzorcev. Sekvenciranje z oligonukleotidnima začetnikoma EUORF5B in EUORF5R je uspelo pri 68 (98,55 %) poslanih vzorcih. Pri vseh smo dobili čiste sekvence (Slika 5).

Nt zaporedje PRRSV smo uspešno določili v celotnem ORF5 pri 68 vzorcih prašičev pozitivnih na PRRSV iz 56 različni rej, ki se nahajajo v 33 različnih občinah Slovenije. Vzorci izhajajo iz časovnega obdobja vzorčenja med leti od 2010 do 2018 (Tabela 3). Pri vseh 68 sekvenciranih sevih PRRSV ORF5 obsega 606 nt, med seboj pa imajo od 79,5 % do 100,0 % identičnost nt.

Tabela 3: Prikaz 68 sekvenc sevov PRRSV iz 56 rej prašičev, pri katerih smo določili nt zaporedje v celotnem ORF5. Navedeno je ime, datum vzorčenja, občina in najbližji sev v genski banki (primerjava na dan 1. junij 2019) ter št. pod katero je sev dostopen v genski banki.

Table 3: 68 sequences of PRRSV stains from 56 pig herds, from which ORF5 region was sequenced. The table includes names, dates, municipalities and their closest strains from gene bank (compared on 1.7.2019) and accession number of the PRRSV strain, in the length of 606 nt, which is accessible in gene bank.

	Št. reje	Ime vzorca	Datum odvzema vzorca	Občina	Najbližji sev v genski banki- % identičnosti nt v ORF5	Številka v genski banki
1	16	16A/2010	31.03.2010	Preddvor	SPA/CRSA-57/2014 (KF666907)- 94,55%	MK814044
2	30	30B/2010	24.05.2010	Murska Sobota	SLO/5852/2013 (MF600619)- 95,87%	MK814045
3	30	30U/2015	13.01.2015	Murska Sobota	GER/H-45-1a/2010 (FJ705427)- 89,77%	MK814046
4	30	30AA/2015	16.12.2015	Murska Sobota	GER/H-13-1-a/2010 (FJ705401)- 93,56%	MK814047
5	30	30AE/2016	13.04.2016	Murska Sobota	SPA/Sp-31a/2011 (JF730978)- 88,61%	MK814048
6	31	31A/2010	5.06.2010	Dol pri Ljubljani	ITA/IT32/2006 (AY739988)- 95,05%	MK814049
7	47	47E/2012	12.07.2012	Križevci pri Ljutomeru	GER/BH_95/10-08-EU (JN651737)-95,05%	MK814050
8	47	47K/2015	3.12.2015	Križevci pri Ljutomeru	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 97,85%	MK814051
9	47	47I/2015	23.02.2015	Križevci pri Ljutomeru	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,35%	MK814052
10	68	68A/2011	1.12.2011	Dornava	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 97,69%	MK814053
11	83	83F/2017	28.03.2017	Sveti Jurij ob Ščavnici	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 97,52%	MK814054

	Št. reje	Ime vzorca	Datum odvzema vzorca	Občina	Najbližji sev v genski banki- % identičnosti nt v ORF5	Številka v genski banki
12	86	86A/2012	18.07.2012	Črenšovci	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 97,69%	MK814055
13	97	97A/2012	13.11.2012	Šentilj	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,02%	MK814056
14	99	99B/2017	21.11.2017	Gornji Petrovci	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 96,70%	MK814057
15	100	100C/2017	12.01.2017	Murska Sobota	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,35%	MK814058
16	112	112A/2013	2.07.2013	Križevci pri Ljutomeru	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,84%	MK814059
17	112	112D/2017	30.11.2017	Križevci pri Ljutomeru	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 96,70%	MK814060
18	155	155B/2014	20.11.2014	Središče ob Dravi	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,35%	MK814061
19	155	155C/2015	13.10.2015	Središče ob Dravi	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,35%	MK814062
20	156	156B/2014	14.11.2014	Sveta Trojica v Slov. Goricah	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,51%	MK814063
21	156	156A/2014	23.10.2014	Sveta Trojica v Slov. Goricah	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,51%	MK814064
22	156	156C/2015	20.10.2015	Sveta Trojica v Slov. Goricah	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,35%	MK814065
23	158	158A/2014	28.10.2014	Sveti Jurij v Slovenskih goricah	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,51%	MK814066
24	159	159A/2014	13.11.2014	Sveti Andraž v Sl. goricah	SLO/1659/2012 (MF600618)- 97,03%	MK814067
25	160	160A/2014	13.11.2014	Gorišnica	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,35%	MK814068
26	165	165A/2014	20.11.2014	Ormož	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 97,36%	MK814069
27	166	166A/2014	26.11.2014	Apače	BEL/VF_21dpc/2010 (HM755895)-91,25%	MK814070
28	166	166C/2015	9.01.2015	Apače	BEL/VF_21dpc/2010 (HM755895)-91,25%	MK814071

	Št. reje	Ime vzorca	Datum odvzema vzorca	Občina	Najbližji sev v genski banki- % identičnosti nt v ORF5	Številka v genski banki
29	168	168D/2018	2.03.2018	Kostanjevica na Krki	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 96,20%	MK814072
30	168	168G/2018	2.03.2018	Kostanjevica na Krki	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 97,03%	MK814073
31	174	174A/2015	22.04.2015	Križevci pri Ljutomeru	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,51%	MK814074
32	175	175A/2015	22.04.2015	Sveti Jurij ob Ščavnici	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,51%	MK814075
33	176	176A/2015	22.04.2015	Beltinci	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,02%	MK814076
34	177	177A/2015	24.04.2015	Sveti Jurij ob Ščavnici	ITA/IT32/2006 (AY739988)- 94,88%	MK814077
35	178	178A/2015	10.02.2015	Sežana	SLO/5852/2013 (MF600619)- 93,07%	MK814078
36	179	179A/2015	15.09.2015	Slovenj Gradec	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,18%	MK814079
37	180	180A/2015	11.09.2015	Straža	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 95,21%	MK814080
38	183	183A/2015	22.09.2015	Vitomarci	CHE/IVI-1173/2016 (KX622783)- 97,85%	MK814081
39	184	184B/2015	15.10.2015	Gorišnica	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,02%	MK814082
40	186	186A/2015	6.10.2015	Ljutomer	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 97,69%	MK814083
41	188	188A/2015	20.10.2015	Slovenska Bistrica	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 97,52%	MK814084
42	189	189A/2015	23.11.2015	Beltinci	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 97,52%	MK814085
43	190	190A/2016	14.01.2016	Beltinci	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,68%	MK814086
44	191	191A/2015	30.11.2015	Moravske Toplice	POL/MPGB1-26F/2014 (MF600578)-91,91%	MK814087
45	193	193B/2016	22.03.2016	Puconci	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,18%	MK814088

	Št. reje	Ime vzorca	Datum odvzema vzorca	Občina	Najbližji sev v genski banki- % identičnosti nt v ORF5	Številka v genski banki
46	195	195A/2016	14.04.2016	Križevci pri Ljutomeru	ITA/IT 55 GPS/2006 (AY740011)- 90,76%	MK814089
47	197	197A/2016	15.05.2016	Središče ob Dravi	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,35%	MK814090
48	198	198A/2016	15.05.2016	Vitomarci	ITA/IT 55 GPS/2006 (AY740011)- 94,06%	MK814091
49	202	202A/2016	23.05.2016	Cerknica	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,02%	MK814092
50	203	203A/2016	24.05.2016	Sveta Ana	SPA/CRSA-59/2014 (KF666919)- 99,17%	MK814093
51	204	204A/2016	27.05.2016	Ljutomer	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,02%	MK814094
52	207	207A/2016	16.06.2016	Metlika	GER/BH_95/10-08-EU (JN651737)-92,41%	MK814095
53	208	208A/2016	11.07.2016	Gornji Petrovci	SLO/5852/2013 (MF600619)- 91,42%	MK814096
54	212	212A/2017	6.01.2017	Polhov Gradec	AUT/AUT 15-33/2016 (KU494019)-98,18%	MK814097
55	213	213A/2017	12.01.2017	Polhov Gradec	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 98,18%	MK814098
56	214	214A/2017	17.03.2017	Sveti Jurij ob Ščavnici	SPA/CRSA-59/2014 (KF666919)- 99,67%	MK814099
57	214	214B/2017	23.02.2018	Sveti Jurij ob Ščavnici	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 97,19%	MK814100
58	215	215A/2017	28.03.2017	Sveti Jurij ob Ščavnici	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 97,36%	MK814101
59	216	216A/2017	18.07.2017	Dornava	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 97,03%	MK814102
60	219	219A/2017	4.08.2017	Ptuj	AUT/1935 ENV. GLYC./05 (AY875861)-90,61%	MK814103
61	225	225A/2017	27.09.2017	Markovci	AUT/AUT 14-440/2015 (KT334375)-94,39%	MK814104
62	226	226A/2017	21.11.2017	Sveti Jurij ob Ščavnici	SLO/5852/2013 (MF600619)- 91,25%	MK814105

	Št. reje	Ime vzorca	Datum odvzema vzorca	Občina	Najbližji sev v genski banki- % identičnosti nt v ORF5	Številka v genski banki
63	227	227A/2017	23.11.2017	9264 Grad	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 97,02%	MK814106
64	228	228A/2017	30.11.2017	Sveti Jurij ob Ščavnici	SLO/5852/2013 (MF600619)- 91,09%	MK814107
65	229	229A/2018	23.01.2018	Puconci	CHE/IVI-1173/2016 (KX622783)- 89,29%	MK814108
66	230	230A/2018	20.02.2018	9253 Apače	AUT/AUT 15-33/2016 (KU494019)-98,51%	MK814109
67	231	231A/2018	20.02.2018	Gornja Radgona	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 96,20%	MK814110
68	233	233A/2018	21.02. 218	Beltinci	SLO/6770-2/2013 (MF600621)- 97,03%	MK814111

4.3 Genetska raznolikost sevov PRRSV v ORF5, ugotovljenih v Sloveniji

Reje s PRRSV, se nahajajo na celotnem območju Slovenije, največ v regiji Pomurje in Štajerska (Slika 11-20, Tabela 4). Iz primerjave sekvenc (Tabela 3) smo ugotovili, da ima 51 naših sevov več kot 95,0 % identično zaporedje nt z objavljenimi sevi v genski banki. Ugotovili smo, da je 41 sevov PRRSV iz 33 različnih rej zelo sorodnih slovenskemu sevu SLO/6770-2/2013 (MF600621), ki je v genski banki dostopen od leta 2018 (Balka in sod., 2018). Izmed preostalih 10 sevov PRRSV, ki imajo več kot 95,0 % identičnost v zaporedju nt z najbližjim sevom iz genske banke imata dva seva PRRSV 212A/2017 (Polhov Gradec) in 230A/2018 (Apače) od 98,18 do 98,51 identičnost nt zaporedja s sevom AUT 15-33/2016 (KU494019) iz Avstrije, seva PRRSV 203A/2016 (Sveta Ana) in 214A/2017 (Sveti Jurij ob Ščavnici) pa od 99,17 do 99,67 identičnost nt zaporedja s sevom SPA/CreSA-59/2014 (KF666919). 17 sevov PRRSV iz te študije je manj kot v 95,0 % sorodnih kateremukoli od sevov PRRSV v genski banki. Z genetsko analizo smo torej določili številne nove seve PRRSV, ki do sedaj še niso bili objavljeni v mednarodnem prostoru.

Tabela 4: Občine, v katerih smo v rejah prašičev pozitivnih na PRRSV določili nt zaporedje v celotni regiji ORF5 virusnega genoma PRRSV.

Table 4: Municipalities and the number of positive samples taken from each separate municipality, in which we sequenced ORF5 region of PRRSV genom.

	Občine v Sloveniji	Število sekvenciranih vzorcev v ORF5
1	Apače	3
2	Beltinci	4
3	Cerknica	1
4	Črenšovci	1
5	Dol pri Ljubljani	1
6	Dornava	2
7	Gorišnica	2
8	Gornja Radgona	1
9	Gornji Petrovci	2
10	Grad	1
11	Križevci pri Ljutomeru	7
12	Ljutomer	2
13	Kostanjevica na Krki	2
14	Markovci	1
15	Metlika	1
16	Moravske Toplice	1
17	Murska Sobota	5
18	Ormož	1
19	Polhov Gradec	2
20	Preddvor	1
21	Puconci	2
22	Ptuj	1
23	Sežana	1
24	Slovenj Gradec	1
25	Slovenska Bistrica	1
26	Središče ob Dravi	3
27	Straža	1
28	Sveta Ana	1
29	Sveti Andraž v Slovenskih goricah	3
30	Sveti Jurij v Slovenskih goricah	1
31	Sveti Jurij ob Ščavnici	8
32	Sveta Trojica v Slovenskih goricah	3
33	Šentilj	1

4.4 Razvrstitev nukleotidnih zaporedij 68 sevov PRRSV iz Slovenije znotraj najnovejše klasifikacije

S filogenetsko primerjavo sekvenc ORF5 68 slovenskih sevov PRRSV s sekvencami sevov iz genske banke smo ugotovili, da vsi slovenski sevi spadajo v genotip 1. V nadaljnji razvrstitvi smo dobljene sekvence razdelili v klade (1, 1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F) po najnovejši klasifikaciji PRRSV iz leta 2018 (Balka in sod., 2018). Za prikaz razvrstitve posameznih slovenskih sevov PRRSV znotraj posameznih klad in primerjavo medsebojne sorodnosti smo izdelali filogenetsko drevo (Slika 6 in 7), v katerem smo primerjali 98 nt zaporedij (68 iz naše študije, 7 slovenskih sevov iz genske banke in 23 tujih sevov) v dolžini 606 nt, kar predstavlja celotno regijo ORF5.

4.4.1 Primerjava evropskih sevov PRRSV iz različnih klad genotipa 1 (1, 1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F) po najnovejši klasifikaciji PRRSV

Primerjana nt zaporedja v dolžini 606 nt slovenskih in tujih sevov PRRS, ki smo jih vključili v filogenetsko analizo (slika 6 in 7) kodirajo celotno regijo ORF5 in se začnejo z nt na poziciji 13.494 in končajo z nt 14.099 v genomu PRRSV referenčnega seva Lelystad (M96262) iz leta 1991 iz Nizozemske.

Primerjava nt zaporedja vseh predstavnikov klad, ki smo jo izvedli s programom MegAlign (DNASTAR, Lasergene), je pokazala, da imajo le-ti z referenčnim sevom PRRSV Lelystad (M96262), ki sam spada v klado 1F, od 84,3 do 96,0 % identičnost v zaporedju nt regije ORF5 (Tabela 5). Najmanjšo identičnost zaporedja nt (79,6 %) smo ugotovili med predstavnikom klade 3D, slovenskim sevom PRRSV SLO 8220-3-2011 (MF600623) in madžarskim predstavnikom iz klade 2: HUN-20012780-2012 (MF600510). Med referenčnim sevom PRRSV Lelystad (M96262) in poljskim predstavnikom klade 1C, sev POL-RJ1180-9-2014 (MF600593) smo ugotovili najmanjšo razliko (96,0 %) v nt zaporedju (Slika 8 in 9, Tabela 5).

4.4.2 Razvrstitev 68 sevov PRRSV iz Slovenije v klade

Na podlagi predhodne razvrstitve sevov PRRSV genotipa 1 (Balka in sod., 2018), smo s filogenetsko primerjavo 68 nt zaporedij v dolžini 606 nt skupaj s predstavniki klad in najbližjimi sevi iz genske banke naše seve razvrstili v eno od klad (1, 1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F). Vseh 68 sevov PRRSV iz te študije smo razvrstili v klade: 1 (n = 2), 1A (n = 5), 1B (n = 41), 1G (n=7), 3B (n = 9), 3C (n = 1) in 3D (n = 3), (Tabela 5).

V klado 1 spadata še dva slovenska seva iz iste reje. To sta seva 166A/2014 in 166C/2015, ki sta si med seboj 100,0 % identična. Najbližjemu sevu iz genske banke, to je BEL/VF_21dpc/2010 (HM755895) sta sorodna v 91,25 % (Slika 6).

V klado 1A so uvrščeni genetsko različni sevi iz petih različnih rej, ki imajo med seboj od 87,5 % do 99,7 % identičnost v zaporedju nt (Slika 6).

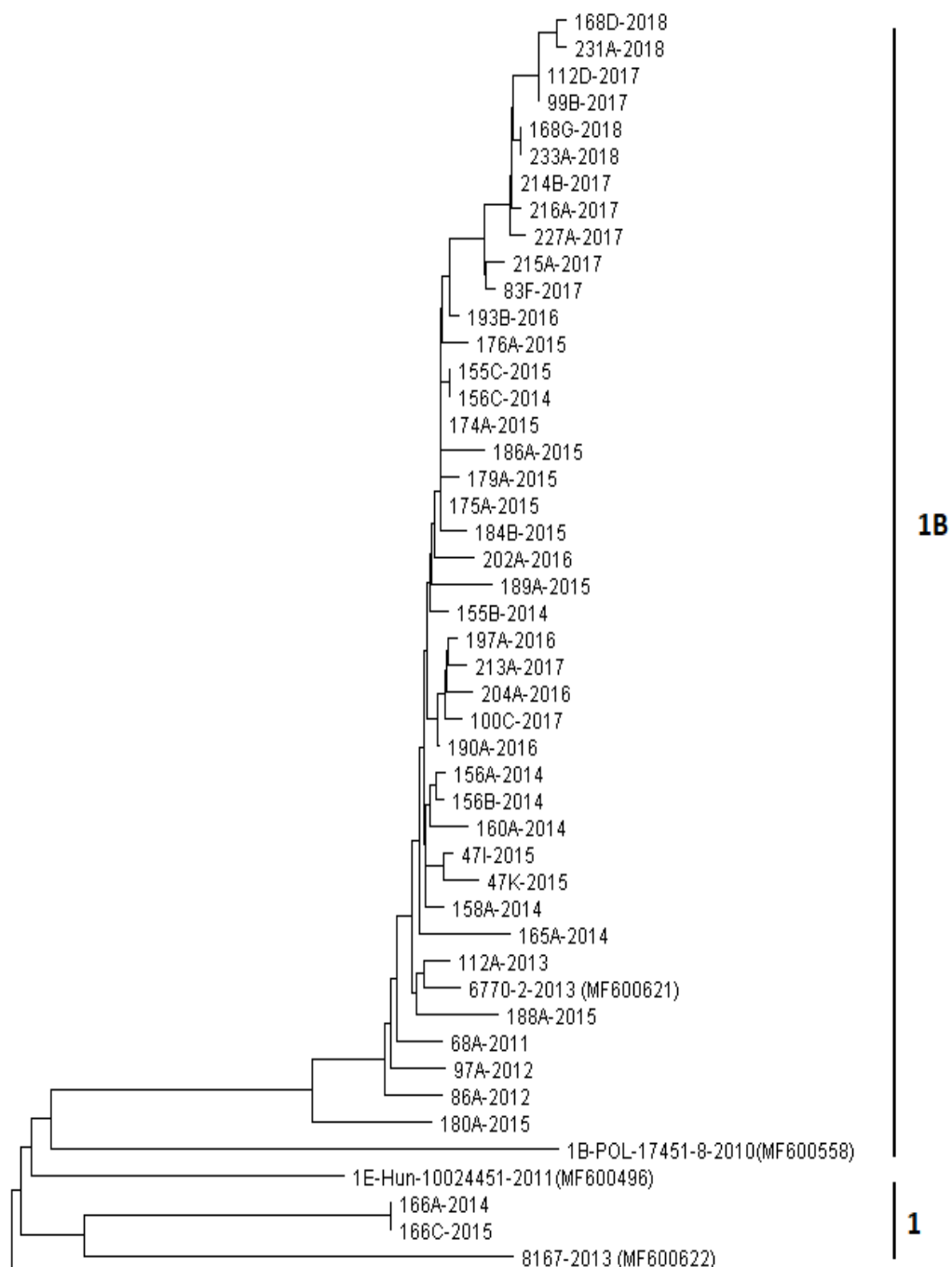
Največ sevov se je uvrstilo v klado 1B (n = 41). Te seve smo ugotovili v skupno 33 različnih rejah. Med slovenskimi sevi znotraj klade 1B je od 94,6 % do 99,8 % identičnost v zaporedju nt, v genski banki pa je najbližji slovenski sev 6770-2-2013 (MF600621) iz leta 2013 (Tabela 5), objavljen v predhodni študiji primerjave srednjeevropskih sevov (Balka in sod., 2018). Prvi sev PRRSV iz klade 1B smo ugotovili leta 2011 v reji 68 (68A/2011). Identičen sev virusa pa se je razširil med leti 2012 in 2018 v preostalih 31 rej. Sev PRRSV 180A/2015 se precej razlikuje od preostalih slovenskih sevov iz klade 1B (od 94,2 % do 95,7 % identičnosti nt), iz česa lahko sklepamo, da je bil v to rejo vnesen podoben sev PRRSV kot v rejo 68, vendar iz drugega vira okužbe.

V klado 1G je uvrščenih sedem genetsko različnih sevov PRRSV, vzorčenih od leta 2012 do 2018, iz 6 različnih rej. Slovenski sevi, ki so uvrščeni znotraj klade 1G imajo med seboj od 84,7 % do 92,4 % identičnost v zaporedju nt.

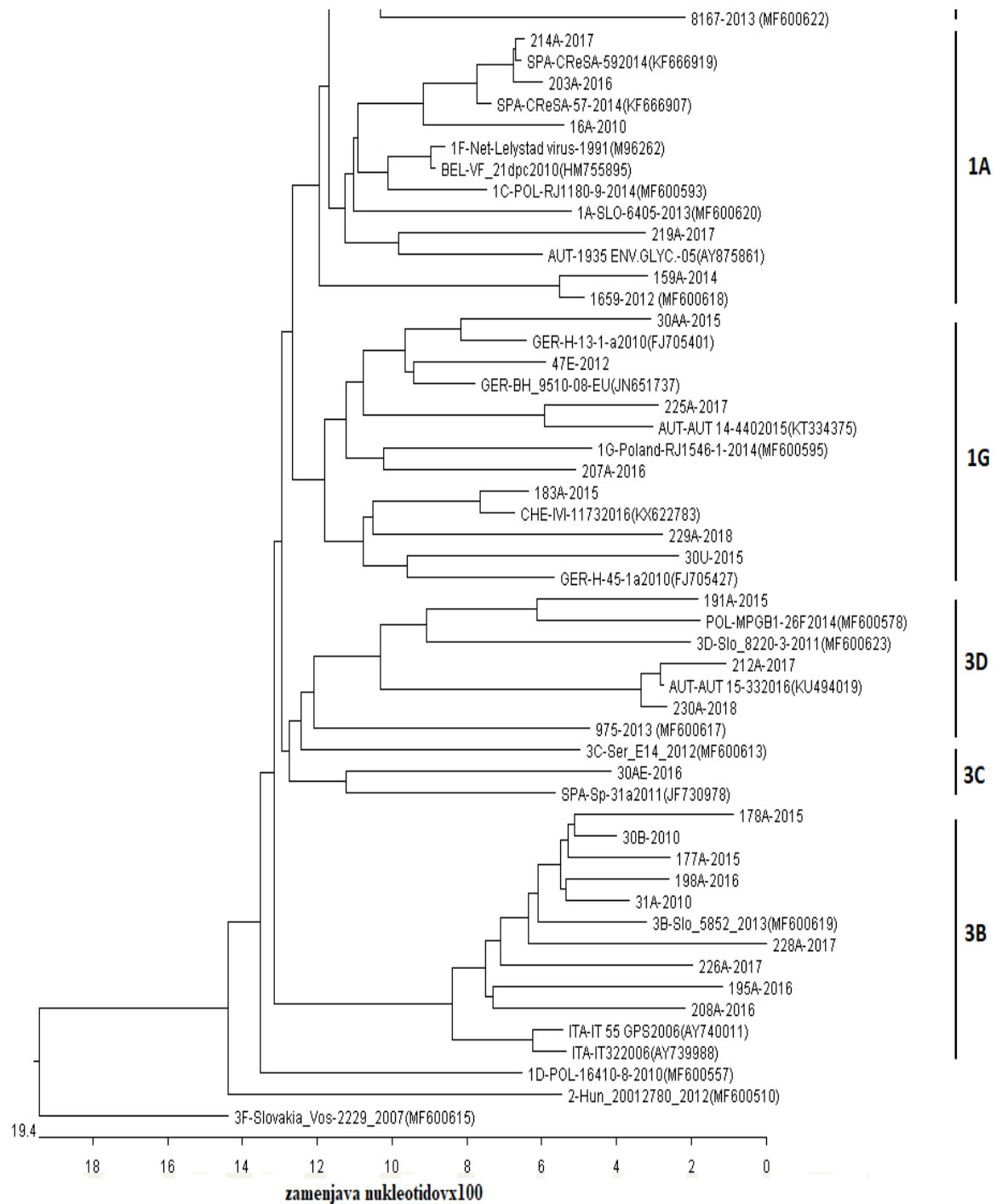
V klado 3B se je uvrstilo devet sevov, ki smo jih vzorčili med leti 2010 in 2017 iz 9 različnih rej. Med slovenskimi sevi znotraj klade 3B smo ugotovili od 87,5 % do 97,4 % identičnost v zaporedju nt.

V klado 3C se je uvrstil le en sev PRRSV (30AE/2016), kateremu je najbližje sev SPA/Sp-31a/2011 (JF730978) iz Španije, s katerim pa ima le 88,61 % identičnost v zaporedju nt.

V klado 3D so se uvrstili trije sevi iz 3 različnih rej iz let 2015, 2017 in 2018. Ti so si med seboj sorodni od 82,8 % do 97,4 %.

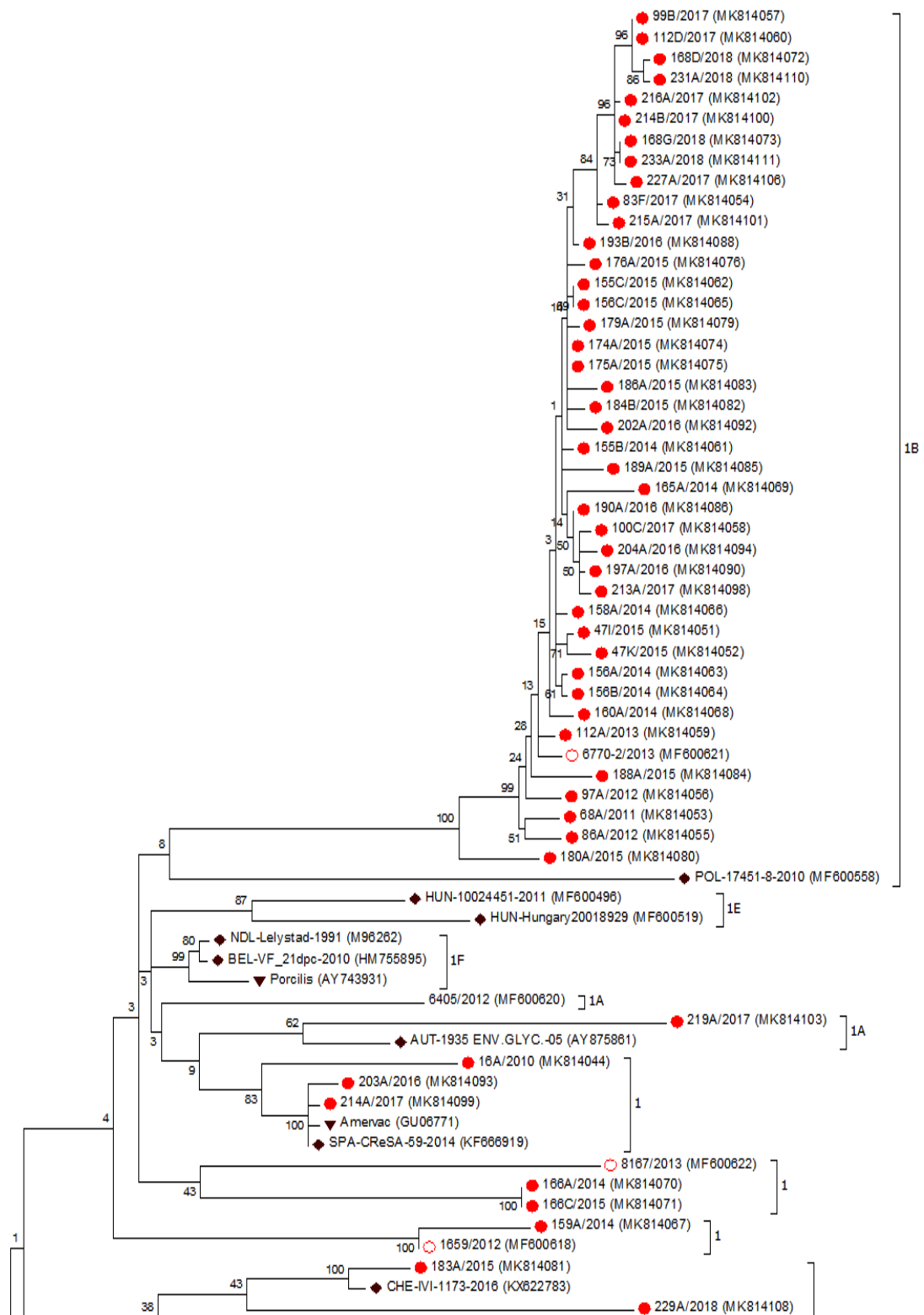


se nadaljuje na naslednji strani

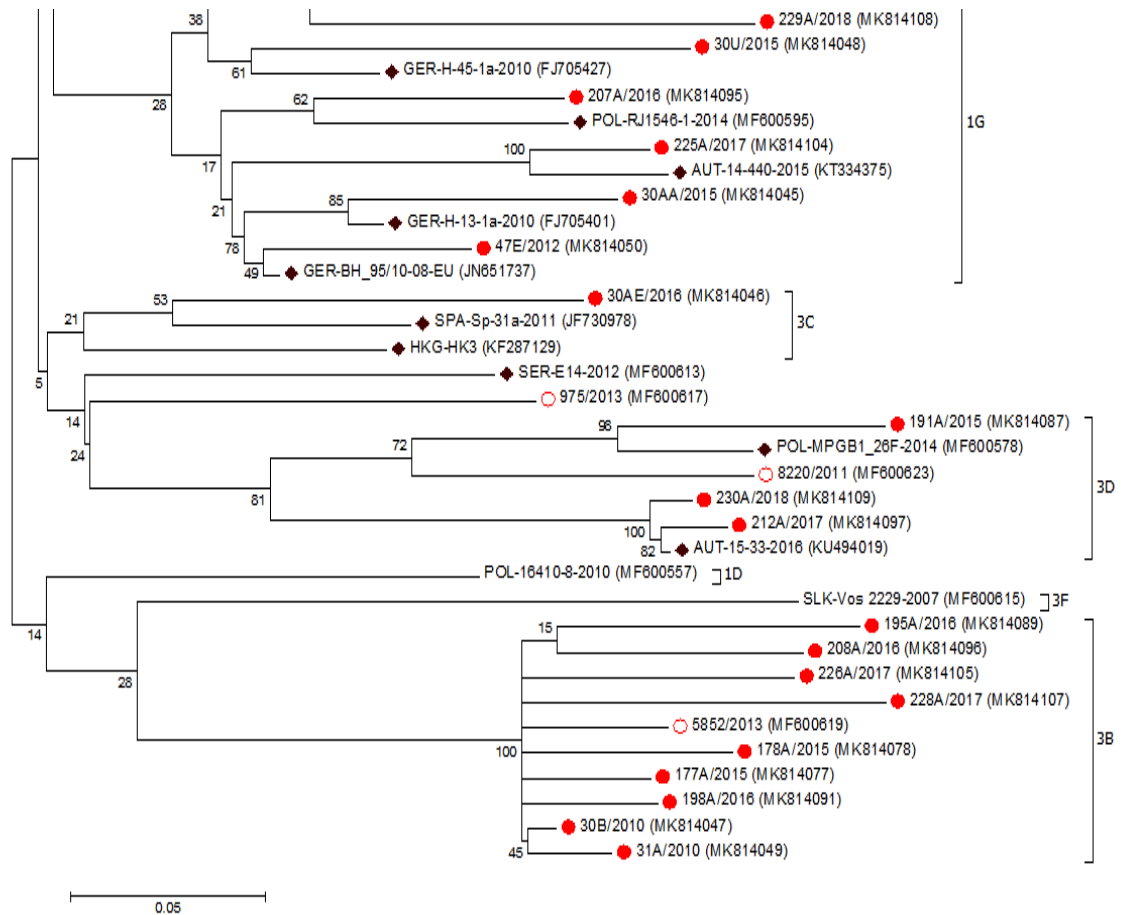


Slika 6: Filogenetsko drevo (program MegAlign, DNASTAR, Lasergene) prikazuje 606 nt ORF5 z 12 predstavnikmi klad (1, 1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F, povzeto po Balka in sod., 2018) in 68 slovenskimi sevi PRRSV ter 19 najbližjimi tujimi sevi PRRSV iz genske banke. Merilo prikazano pod filogenetskim drevesom odraža nt razlike med sevi PRRSV v odstotkih.

Figure 6: Phylogenetic tree, drawn with program MegAlign (DNASTAR, Lasergene) shows a comparison of 606 nucleotides in region ORF5 for 12 Clad representatives (1, 1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F, taken from Balka et al., 2018), 68 Slovenian PRRSV strains and 19 of their most related foreign PRRSV strains from gene bank. The measure shown below phylogenetic tree represents the difference between samples in %.



se nadaljuje na naslednji strani



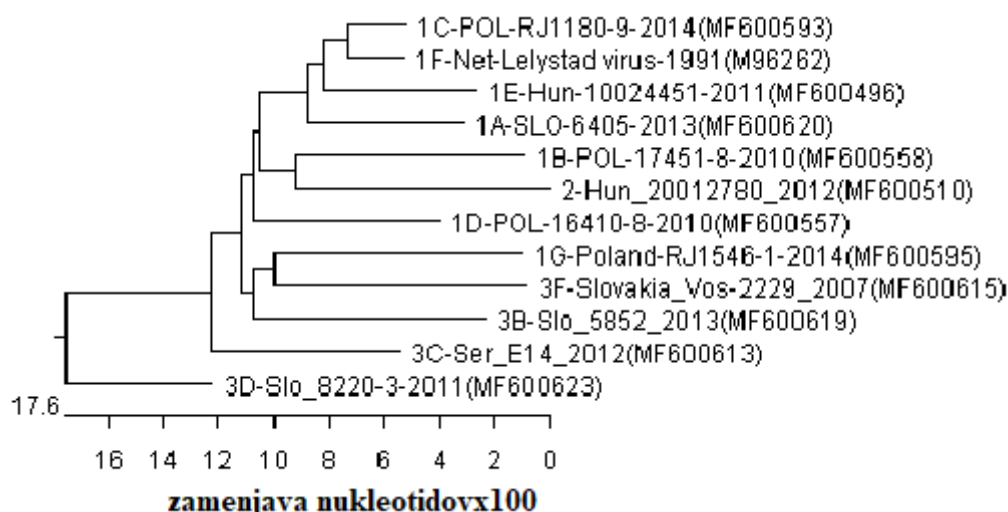
Slika 7: Filogenetsko drevo (program MEGA6) prikazuje 606 nt ORF5 skupaj s predstavniki klad (1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F, povzeto po Balka in sod., 2018), 68 slovenskimi sevi PRRSV ter 19 najbližjimi tujimi sevi PRRSV iz genske banke, vzorci so označeni z rdečimi krogi.

Figure 7: Phylogenetic tree, drawn with program MEGA6 shows 606 nt ORF5 together with clad representatives (1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F, which were taken from Balka et al., 2018), 68 Slovenian sequences and 19 of their most related foreign strains from gene bank, samples from this study were marked with red circles.

Tabela 5: Prikaz identičnosti v zaporedju nt med referenčnim sevom PRRSV Lelystad (M96262) in predstavniki posamezne klade. Navedeno je tudi število slovenskih sevov, ki spadajo v posamezno klado (iz te študije).

Table 5: Percent of similarity between individual Clades, compared to PRRSV Lelystad (M96262) from Clad 1F. The number of sequences from each Clad, which were gathered in our research is also shown.

Klada	Predstavnik klade	Identičnost zaporedja nt z virusom Lelystad PRRSV (M96262)	Število slovenskih sevov, uvrščenih v posamezno klado
1	Porcilis_PRRS	98,00 %	2
1A	SLO-6405-2013	91,9 %	5
1B	POL-17451-8-2010	88,0 %	41
1C	POL-RJ1180-9-2014	96,0 %	0
1D	POL-16410-8-2010	88,6 %	0
1E	HUN-10024451-2011	92,7 %	0
1F	Net-Lelystad virus-1991	100,0 %	0
1G	POL-RJ1546-1-2014	87,8 %	7
2	HUN-20012780-2012	84,3 %	0
3B	SLO-5852-2013	86,3 %	9
3C	SER-E14-2012	88,4 %	1
3D	SLO-8220-3-2011	84,5 %	3
3F	SK-Vos-229-2007	85,1 %	0



Slika 8: Filogenetsko drevo (program MegAlign, DNASTAR, Lasergene) prikazuje medsebojno sorodnost 12 predstavnikov klad (1, 1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F) na podlagi primerjave 606 nt regije ORF5 genoma PRRSV. Merilo prikazano pod filogenetskim drevesom odraža nt razlike med sevi PRRSV v odstotkih.

Figure 8: Phylogenetic tree, drawn with program MegAlign (DNASTAR, Lasergene) shows a comparison of 606 nt for 12 clad representatives (1, 1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F) in the ORF5 region of PRRSV genome. The measure shown below phylogenetic tree represents the difference between PRRSV strains in %.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1		96.0	92.7	91.9	88.0	84.3	88.6	87.8	85.1	86.3	88.4	84.5	1
2	4.1		91.7	91.6	87.5	85.0	88.9	86.9	84.5	86.3	88.6	85.3	2
3	7.8	8.9		89.1	85.6	81.7	86.8	85.1	83.3	85.1	86.8	83.0	3
4	8.7	9.1	12.1		86.6	84.3	87.5	84.2	84.5	85.1	86.3	81.4	4
5	13.5	14.2	16.5	15.1		84.5	85.3	84.2	82.2	82.8	83.7	81.4	5
6	18.1	17.2	21.7	18.1	17.6		85.0	81.7	83.6	82.6	85.0	79.6	6
7	12.8	12.3	15.0	14.1	16.9	17.2		84.0	84.8	86.0	86.3	84.5	7
8	13.7	14.9	17.3	18.5	18.4	21.5	18.8		84.3	84.3	84.3	81.2	8
9	17.1	18.0	19.5	17.9	21.5	19.1	17.5	18.1		83.8	84.0	81.4	9
10	15.4	15.4	17.0	16.9	20.0	20.3	15.8	18.0	18.7		84.7	84.2	10
11	12.8	12.6	14.9	15.5	18.9	17.2	15.6	18.3	18.7	17.7		84.8	11
12	18.4	16.8	19.9	22.3	22.2	24.9	17.9	22.7	22.5	19.0	17.6		12
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

1F-Net-Lelystad virus-1991(M96262)
1C-POL-RJ1180-9-2014(MF600593)
1E-Hun-10024451-2011(MF600496)
1A-SLO-6405-2013(MF600620)
1B-POL-17451-8-2010(MF600558)
2-Hun_20012780_2012(MF600510)
1D-POL-16410-8-2010(MF600557)
1G-Poland-RJ1546-1-2014(MF600595)
3F-Slovakia_Vos-2229_2007(MF600615)
3B-Slo_5852_2013(MF600619)
3C-Ser_E14_2012(MF600613)
3D-Slo_8220-3-2011(MF600623)

Slika 9: Prikaz odstotkov medsebojne identičnosti in razlik v regiji ORF5 genoma PRRSV, na podlagi primerjave 606 nt za predstavnike klad (1, 1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F).

Figure 9: Percent of similarity between 606 nt of 12 Clad representatives (1, 1A-1G, 2, 3B, 3C, 3D, 3F) in the region ORF5 of PRRSV genome.

4.5 Medsebojna primerjava aminokislinskih zaporedij 68 sevov PRRSV iz Slovenije

Filogenetska primerjava 68 slovenskih sevov PRRSV na podlagi ak zaporedja v dolžini 202 ak v delu genoma, ki kodira celoten protein GP5 je pokazala podobno razvrstitev slovenskih sevov v več različnih klad (1, 1A, 1B, 1G, 3B, 3C, 3D), kakor smo jo dobili na podlagi primerjave nt zaporedja (ni prikazano).

Spremembe ak so prisotne skozi celotno kodirajočo regijo, Med 68 slovenskimi sevi PRRSV smo ugotovili od 79,7 do 100,0 % identičnost v zaporedju ak v ORF5.

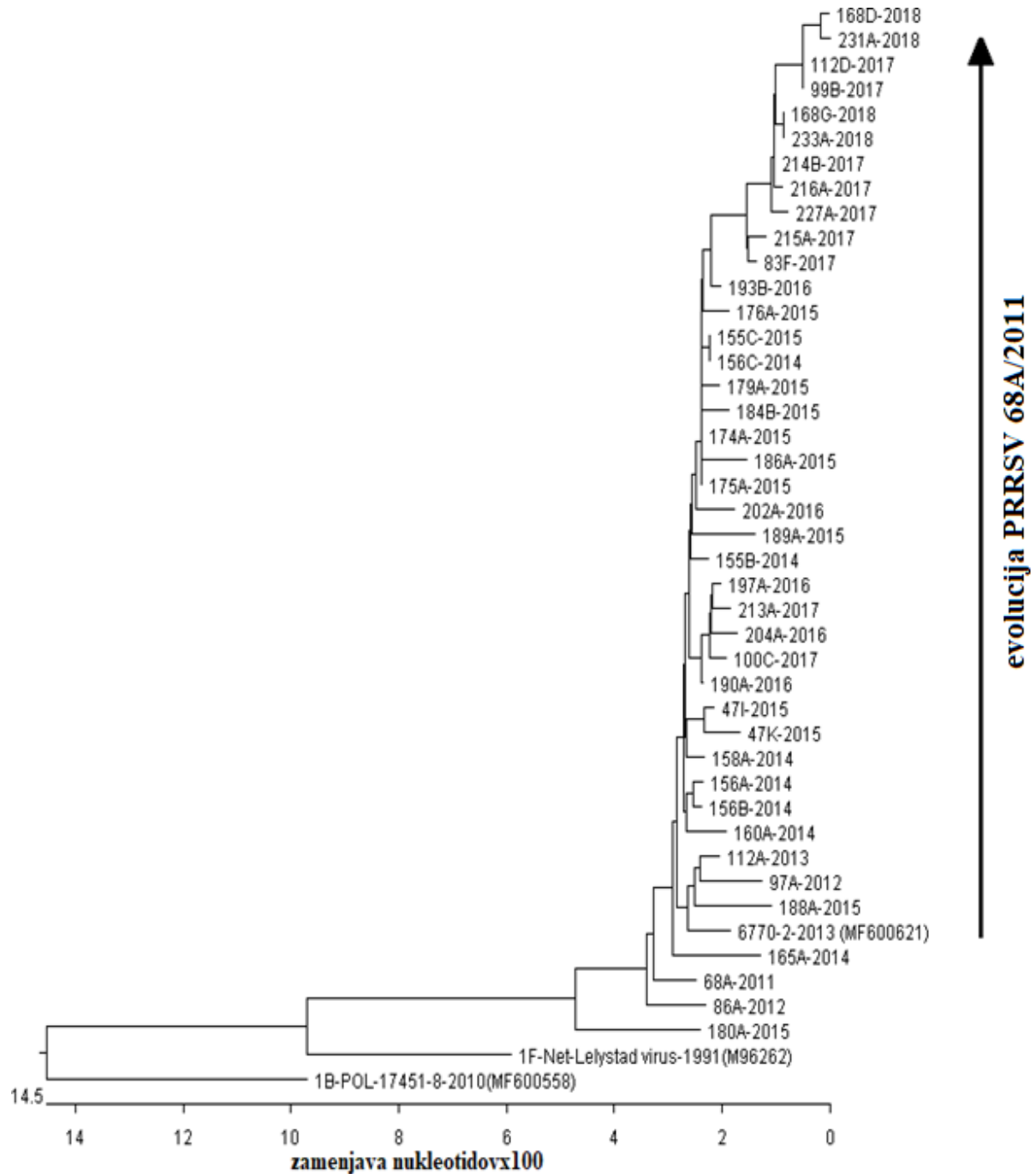
4.6 Primerjava nukleotidnih zaporedij 68 sevov PRRSV z najbližjimi sevi iz genske banke

Primerjavo posameznega od 68 nt zaporedij sevov PRRSV smo izvedli preko spletnega strežnika BLAST. Primerjavo smo izvedli s sevi, ki so že dostopni v genski banki. Na podlagi večletnega spremljanja dinamike nastajanja sprememb v regiji ORF7 virusnega genoma in primerjavi nt zaporedja PRRSV znotraj iste reje so v raziskavi iz leta 2015 ocenili, da bi lahko govorili o nedavnem prenosu okužbe, če bi med dvema sevoma PRRSV ugotovili manj kot 2,0 % razlik v nt zaporedju (Toplak, 2015). Ker je regija ORF5 pogosteje podvržena spremembam nukleotidov, smo ocenili, da bi lahko prenos PRRSV med dvema rejama dokazali takrat, ko bi bila identičnost v nt zaporedju višja od 95,0 %.

Reje pozitivne na PRRSV, ki smo jih vključili v študijo, se nahajajo na celotnem območju Slovenije, največ smo jih zajeli iz Pomurja in Štajerske, kjer se nahaja tudi največje število prašičjih rej. Med njimi je največ sevov, 41 iz 33 različnih rej, genetsko zelo blizu slovenskemu sevu SLO/6770-2/2013 (MF600621), s katerim imajo od 94,6 % in 99,8 % podobnost (Slika 11). Iz filogenetskega drevesa (Slika 10) lahko razberemo evolucijo slovenskega seva 68A/2011, ki se je širil v nove prašičje reje (najmanj 31) neprekinjeno skozi daljše obdobje od leta 2011 do 2018. Med sevom PRRSV 68A/2011 iz prve okužene reje 68 v letu 2011 in sevom PRRSV 231A/2018, ki smo ga v okuženi reji dokazali leta 2018, je razlika v 19 nt, v ak zaporedju pa je med njima razlika v 9 ak. Najbližji sevi v genski banki se od ugotovljenih 41 slovenskih sevov razlikujejo za več kot 10 %, kar pomeni, da smo ugotovili nov sev PRRSV v evropskem prostoru.

V naši raziskavi smo ugotovili, da je sev PRRSV 159A/2014 iz reje 159 genetsko zelo blizu s predhodno tipiziranim slovenskim sevom SLO/1659/2012 (MF600618), s katerim ima 97,03 % identičnost v zaporedju nt v ORF5.

Ugotovili smo, da ima pet sevov PRRSV več kot 96,5 % identičnost z zaporedji sevov PRRSV, ki so jih ugotovili v drugih državah in so dostopni v genski banki. Med sevom CHE/IVI-1173/2016 (KX622783) iz Švice in slovenskim sevom 183A/2015 iz reje 183 smo ugotovili 97,85 % identičnost v zaporedju nukleotidov. Dva genetsko zelo sorodna slovenska seva iz rej 212 in 230 pa imata 98,18 % identičnost v zaporedju nukleotidov z avstrijskim sevom AUT 15-33/2016 (KU494019). Pri dveh sevih (iz reje 203 in 214), ki sta genetsko najbližje španskemu sevu SPA/CRSA-59/2014 (KF666919), smo ugotovili od 99,17 % do 99,67 % identičnost v nt zaporedju s španskim predstavnikom, prav tako pa imata s cepnim sevom Amervac od 98,84 do 99,33 % identičnost v nt zaporedju.



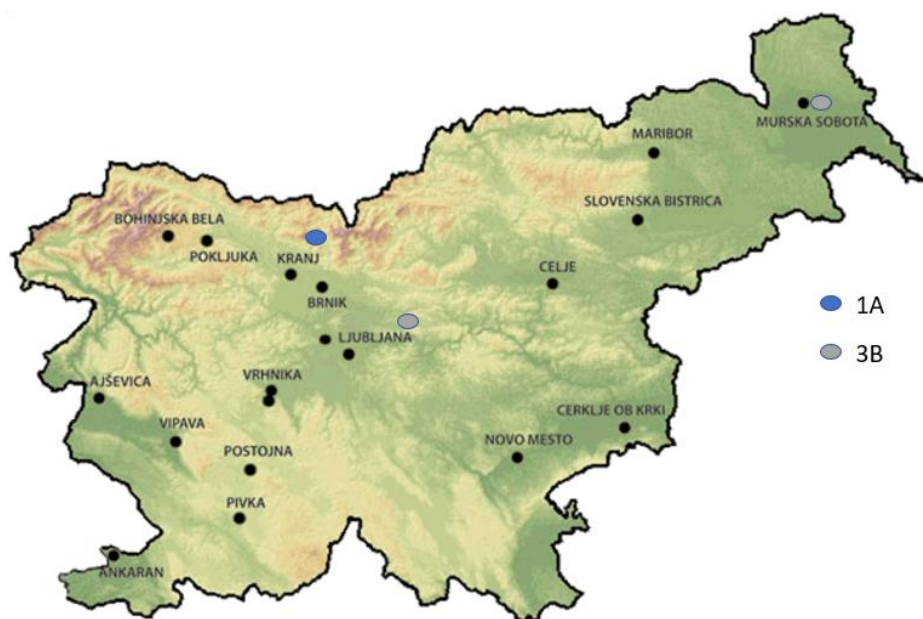
Slika 10: Filogenetsko drevo (program MegAlign DNASTAR, Lasergene) prikazuje primerjavo 606 nt ORF5 za 41 sevov PRRS iz klade 1B, skupaj s sevom Lelystad, ki spada v klado 1F in predstavnikom klade 1B iz Poljske. Merilo prikazano pod filogenetskim drevesom odraža nt razlike med sevi PRRSV v odstotkih.

Figure 10: Phylogenetic tree, drawn with program MegAlign (DNASTAR, Lasergene) shows a comparison of 606 nt in ORF5 for 41 representatives of clad 1B, together with strain Lelystad, which is a representative of Clad 1F and the representative of clad 1B from Poland. The measure shown below phylogenetic tree represents the difference between samples in %.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
1	888	888	893	896	899	894	886	888	894	893	896	894	893	891	886	886	894	894	889	884	889	886	893	894	893	888	886	893	886	898	880	1		
2	125	997	995	988	990	987	982	983	977	972	979	968	974	972	964	972	969	967	965	972	970	969	964	965	964	962	965	965	962	960	942	2		
3	125	03	995	988	990	987	982	983	977	972	975	968	974	972	964	972	969	967	965	972	970	969	964	965	965	962	965	969	962	960	942	3		
4	119	05	05	993	995	992	987	988	982	977	980	974	979	977	969	977	974	972	970	977	975	974	969	960	969	967	960	970	967	965	947	4		
5	115	12	12	07	998	995	990	992	985	980	983	977	982	980	972	980	977	975	974	980	979	977	972	964	972	970	964	974	970	968	950	953	5	
6	113	10	10	05	02	997	992	993	987	982	985	979	983	982	974	982	979	977	975	982	980	979	974	965	974	972	965	975	972	970	962	951	6	
7	117	13	13	08	05	03	988	990	983	979	982	975	980	979	970	979	975	974	972	979	979	977	972	964	972	970	964	975	970	969	962	951	7	
8	115	18	18	13	10	08	12	995	988	987	987	980	985	983	975	983	980	979	977	983	982	977	975	967	975	974	967	977	974	972	947	948	8	
9	113	17	17	12	08	07	10	05	990	985	988	982	987	985	977	985	982	980	979	985	983	979	977	969	977	975	969	979	975	974	962	951	9	
10	117	24	24	18	15	13	17	12	10	992	995	988	993	992	983	992	988	987	985	992	990	985	983	975	983	982	975	983	982	975	979	955	948	10
11	118	29	29	24	20	18	22	13	15	08	993	987	992	990	982	990	987	985	983	990	988	983	982	974	982	980	974	979	974	974	950	945	11	
12	114	22	25	20	17	15	18	13	12	05	07	990	995	993	985	993	990	988	987	993	992	987	985	977	985	983	977	982	977	977	954	947	12	
13	117	32	32	27	24	22	25	20	18	12	13	10	988	987	979	987	983	982	980	987	985	980	982	970	979	977	974	975	970	970	950	943	13	
14	116	27	27	22	18	17	20	15	13	07	08	05	12	992	983	992	988	987	985	992	990	985	983	975	983	982	975	980	975	975	952	945	14	
15	118	29	29	24	20	18	22	17	15	08	10	07	13	08	982	990	987	985	983	990	988	983	982	977	982	980	974	979	974	974	950	947	15	
16	121	38	38	32	29	27	31	25	24	17	18	15	22	17	18	985	982	980	979	985	983	979	977	972	977	975	967	977	972	969	946	942	16	
17	114	29	29	24	20	18	22	17	15	08	10	07	13	08	10	15	990	988	990	993	992	987	988	977	985	983	979	982	977	977	950	950	17	
18	114	32	32	27	24	22	25	20	18	12	13	10	17	12	13	18	10	995	993	997	988	987	982	977	987	983	975	979	977	974	952	950	18	
19	116	34	34	29	25	24	27	22	20	13	15	12	18	13	15	20	12	05	992	995	987	985	980	975	985	982	974	977	975	972	950	945	19	
20	116	36	36	31	27	25	29	24	22	15	17	13	20	15	17	22	10	07	08	993	985	983	982	974	987	980	975	975	977	970	949	945	20	
21	110	29	29	24	20	18	22	17	15	08	10	07	13	08	10	15	07	03	05	07	992	990	985	980	988	987	979	982	980	977	954	950	21	
22	116	30	30	25	22	20	22	18	17	10	12	08	15	10	12	17	08	12	13	15	08	988	987	979	987	985	979	982	979	979	950	950	22	
23	110	32	32	27	24	22	24	22	15	17	13	20	15	17	22	13	13	15	17	10	12	982	974	985	983	975	977	977	974	962	950	23		
24	114	37	37	32	29	27	29	25	24	17	18	15	18	17	18	24	12	18	20	18	15	13	18	972	980	979	970	975	972	972	947	945	24	
25	118	46	46	41	38	36	38	34	32	25	27	24	31	25	24	29	24	25	27	20	22	27	29	975	974	962	974	967	967	946	940	25		
26	116	38	38	32	29	27	29	25	24	17	18	15	22	17	18	24	15	13	15	13	12	13	15	20	25	988	980	980	985	979	957	948	26	
27	118	39	39	34	30	28	30	27	25	18	20	17	24	18	20	25	17	17	18	20	13	15	17	22	12	975	977	980	977	952	947	27		
28	124	46	46	41	37	36	37	34	32	25	27	24	27	25	27	34	22	25	27	25	22	22	25	30	39	20	25	969	975	969	946	947	28	
29	115	36	36	32	30	27	25	25	24	17	22	18	25	20	22	24	18	22	24	25	18	18	24	25	27	20	24	32	979	982	955	951	29	
30	119	39	39	34	31	29	31	27	25	22	27	24	30	25	27	29	24	24	25	24	20	22	24	29	34	15	20	25	22	979	952	953	30	
31	115	41	41	36	32	30	32	29	27	22	27	23	30	25	27	32	24	27	29	30	24	22	27	29	34	22	24	32	18	22	952	956	31	
32	113	61	61	55	52	50	50	55	50	46	52	48	52	50	52	57	52	50	52	53	48	52	50	55	57	44	50	57	46	50	50	853	32	
33	135	184	184	177	168	171	171	175	171	175	179	177	182	179	177	184	173	172	179	173	172	172	179	166	175	177	177	171	168	164	168	853	33	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	

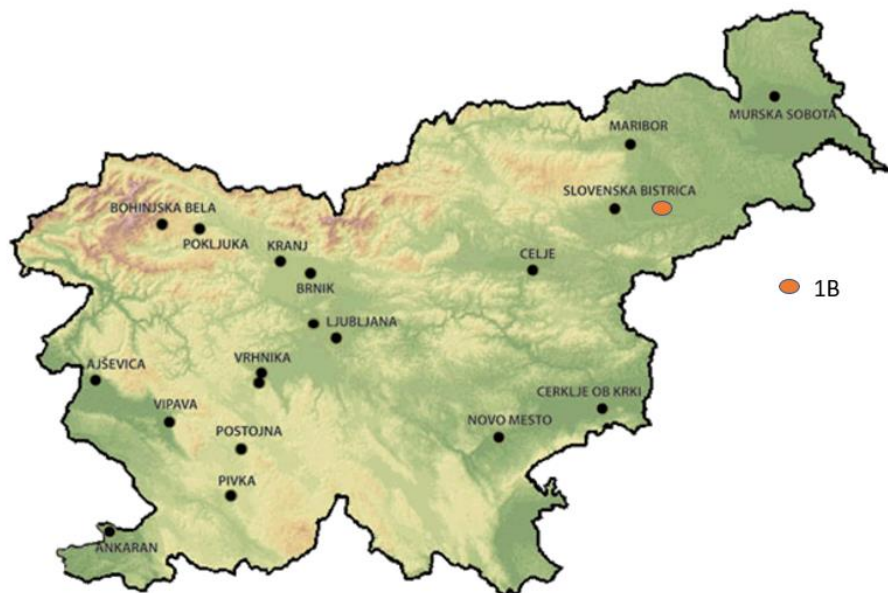
Slika 11: Medsebojna primerjava identičnosti zaporedja 606 nt, prikazana v % za nekatere slovenske seve iz klade 1B, skupaj s predstavnikom iz klade 1B in referenčnim sevom Lelystad. Tabela je izrisana s programom MegAlign (DNASTAR, Lasergene).

Figure 11: Percentage of similarity between 606 nt shown for some of the Slovenian strains from clad 1B, together with the representative of clad 1B and the referal strain Lelystad. The table was constructed with the program MegAlign (DNASTAR, Lasergene).



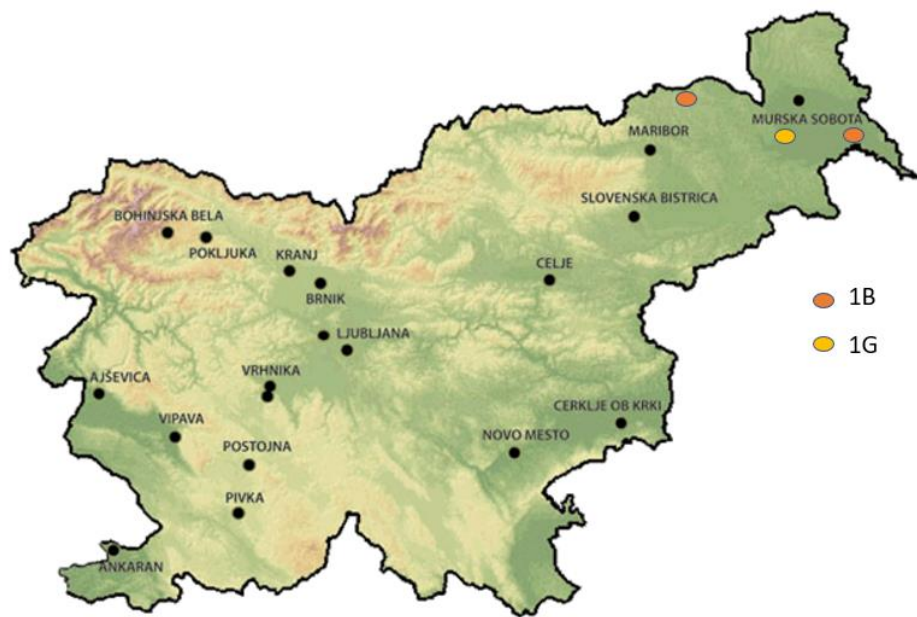
Slika 12: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno ORF5 PRRS v letu 2010. Barva kroga predstavlja določeno klado.

Figure 12: Map of the Republic of Slovenia with marked PRRSV herd locations, from which we successfully sequenced ORF5 region of PRRSV in 2010. Each coloured circle represents a certain clad.



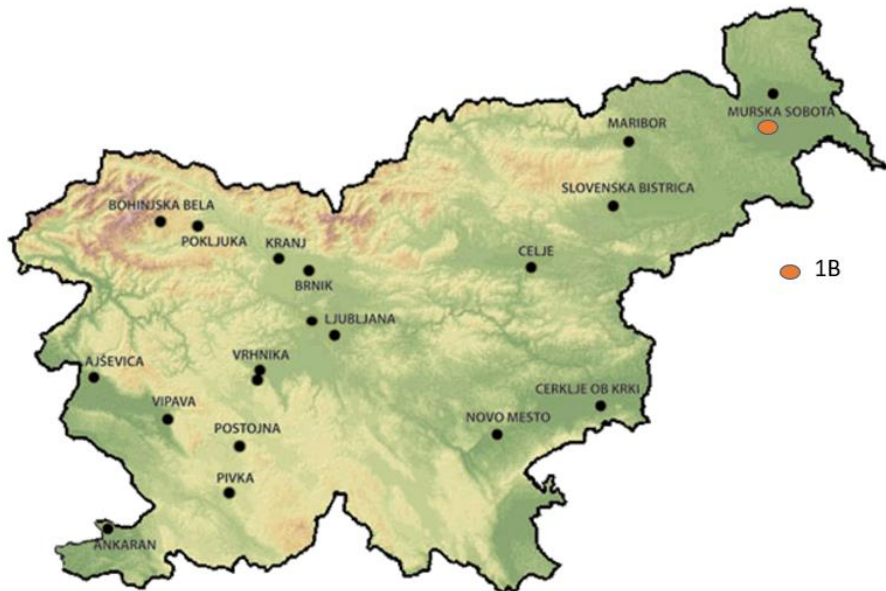
Slika 13: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno ORF5 PRRSV v letu 2011. Barva kroga predstavlja določeno klado.

Figure 13: Map of the Republic of Slovenia with marked PRRSV herd locations, from which we successfully sequenced ORF5 of PRRSV in 2011. Each coloured circle represents a certain clad.



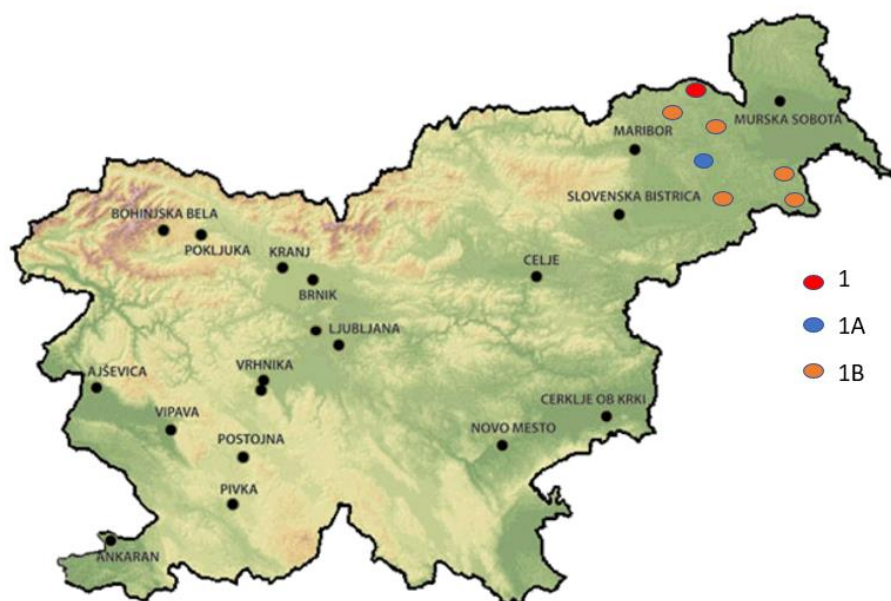
Slika 14: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno ORF5 PRRSV v letu 2012. Barva krogca predstavlja določeno klado.

Figure 14: Map of the Republic of Slovenia with marked PRRSV herd locations, from which we successfully sequenced ORF5 of PRRSV in 2012. Each coloured circle represents a certain clad.



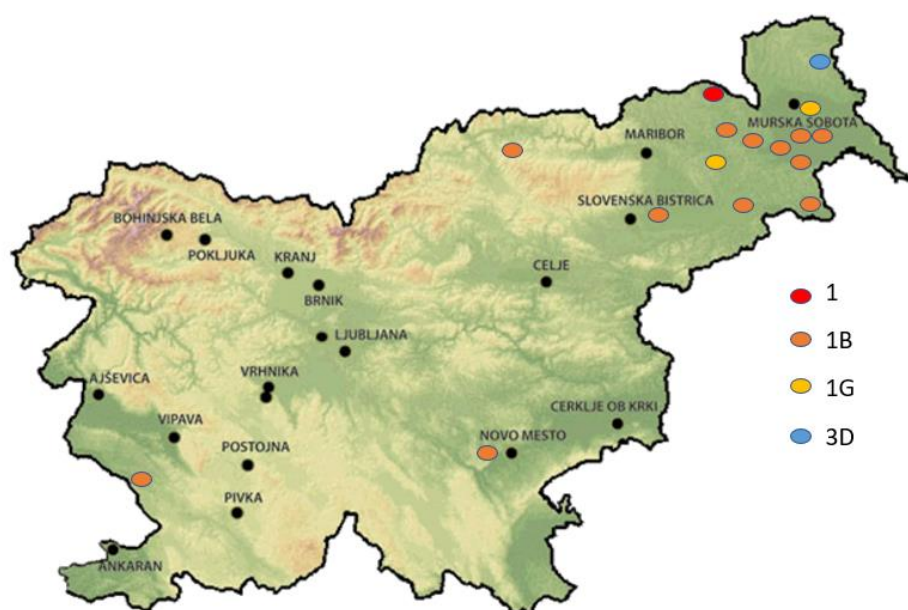
Slika 15: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno regijo ORF5 PRRSV v letu 2013. Barva krogca predstavlja določeno klado.

Figure 15: Map of the Republic of Slovenia with marked PRRSV herd locations, from which we successfully sequenced ORF5 of PRRSV in 2013. Each coloured circle represents a certain clad.



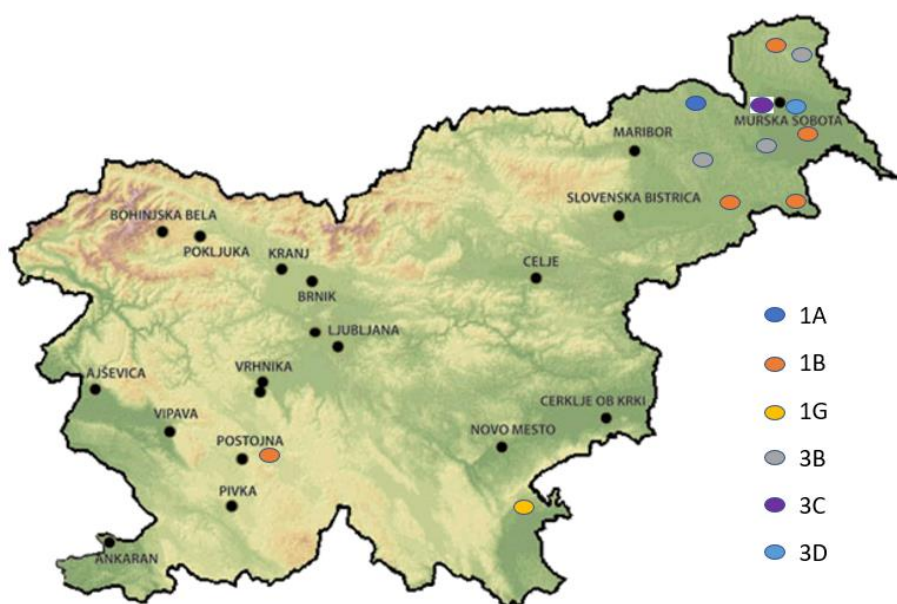
Slika 16: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno regijo ORF5 PRRSV v letu 2014. Barva krogca predstavlja določeno klado.

Figure 16: Map of the Republic of Slovenia with marked PRRSV herd locations, from which we successfully sequenced ORF5 of PRRSV in 2014. Each coloured circle represents a certain clad.



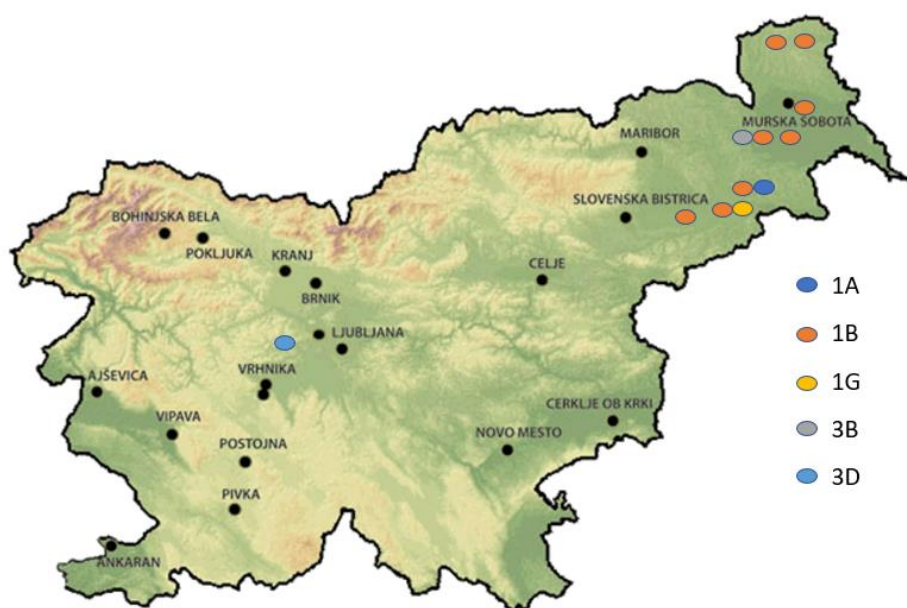
Slika 17: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno regijo ORF5 PRRSV v letu 2015. Barva krogca predstavlja določeno klado.

Figure 17: Map of the Republic of Slovenia with marked PRRSV herd locations, from which we successfully sequenced ORF5 of PRRSV in 2015. Each coloured circle represents a certain clad.



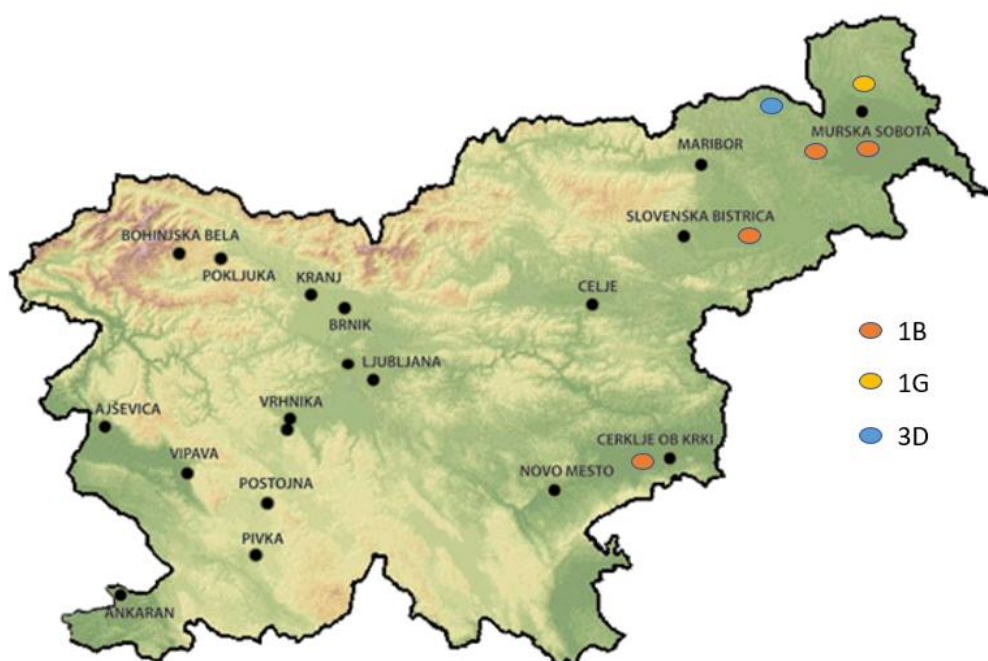
Slika 18: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno regijo ORF5 PRRSV v letu 2016. Barva kroga predstavlja določeno klado.

Figure 18: Map of the Republic of Slovenia with marked PRRSV herd locations, from which we successfully sequenced ORF5 of PRRSV in 2016. Each coloured circle represents a certain clad.



Slika 19: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno regijo ORF5 PRRSV v letu 2017. Barva kroga predstavlja določeno klado.

Figure 19: Map of the Republic of Slovenia with marked PRRSV herd locations, from which we successfully sequenced ORF5 of PRRSV in 2017. Each coloured circle represents a certain clad.



Slika 20: Zemljevid Republike Slovenije z označenimi lokacijami okuženih rej prašičev s PRRSV, iz katerih smo uspeli sekvencirati celotno regijo ORF5 PRRSV v letu 2018. Barva kroga predstavlja določeno klado.

Figure 20: Map of the Republic of Slovenia with marked PRRSV herd locations, from which we successfully sequenced ORF5 of PRRSV in 2018. Each coloured circle represents a certain clad.

4.7 Primerjava pozitivnih vzorcev PRRSV znotraj iste reje

V sedmih rejah (30, 47, 112, 155, 156, 166 in 168) so odvzemali vzorce večkrat ali celo več let zaporedoma. Pri tem smo v nekaterih rejah dokazali vedno isti sev, pri drugih pa smo opazili prisotnost novih sevov.

V reji 30 smo odkrili štiri seve iz leta 2010, 2015 in 2016, ki imajo med seboj od 82,8 % do 85,6 % identičnost v zaporedju nt. V reji 47 smo sekvencirali tri seve v letu 2012 in 2015, ki kažejo med seboj 86,0 % do 99,2 % identičnost. V reji 112 sta prisotna dva seva dokazana v letu 2013 in 2017, ki sta si med seboj identična v 96,9 %. V reji 155 smo ugotovili dva seva, v letu 2014 in 2015, sorodna sta si v 99,3 %. V reji 156 smo določili tri seve v letu 2014, ki imajo med seboj 99,2 % in 100,0 % identičnost zaporedja nt. Sev 156C/2015 pa se od prvih dveh zelo razlikuje, saj ima z njima le 86,13 % identičnost v zaporedju nt. Seva 156A/2014 in 156B/2014 sta identična v 99,6 %. V reji 166 smo v letih 2014 in 2015 določili dva seva PRRSV, pri katerih smo v ORF5 določili enako zaporedje nt. Iz reje 168 smo v letu 2018 sekvencirali dva seva, ki sta med seboj 98,8 % sorodna.

V izvedeni študiji lahko na podlagi primerjave nt zaporedja ORF5 PRRSV iz 56 okuženih rej ugotovimo najmanj 18 vnosov PRRSV iz različnih virov okužbe.

4.8 Dostopnost podatkov o 68 sekvencah slovenskih vzorcev PRRSV v genski banki (GenBank)

Sekvence PRRSV 68 vzorcev iz slovenskih rej so v genski banki dostopne pod zaporednimi številkami od MK814044 do MK814111 (dostopne javnosti od 26. oktobra 2019).

5 RAZPRAVA

V študiji smo ugotavljali genetsko raznolikost v regiji ORF5 virusnega genoma sevov PRRSV, ki krožijo po Sloveniji. Do sedaj je bila večina genetskih raziskav sevov PRRSV narejenih v regiji ORF7 (Toplak in sod, 2010, Toplak in sod., 2012, Štukelj, 2013, Toplak, 2015). Izvedena raziskava pa predstavlja prvo tovrstno študijo v regiji ORF5 PRRSV V Sloveniji, ki je zajela večje število sevov PRRSV, ki smo jih dokazali v različnih rejah v Sloveniji.

V raziskavi smo uporabili arhivske vzorce sevov PRRSV, ki so bili predhodno tipizirani v dolžini 258 nt regije ORF7 (Toplak, 2015). Vzorci prašičev so se zbirali od leta 2009 do 2018. Iz arhivske zbirke smo odbrali 127 PRRSV pozitivnih vzorcev, saj smo želeli zajeti genetsko čim bolj heterogene seve iz čim večjega števila rej ter iz različnih let, ki bi jih lahko primerjali z dostopnimi sevi iz drugih držav.

Za potrebe sekvenciranja celotne regije ORF5 genoma PRRSV smo uporabili dve klasični metodi RT-PCR. Od 127 pozitivnih vzorcev smo produkt PCR za regijo ORF5 s PCR1 in PCR2 dobili le pri 69 vzorcih (54,33 %). V študiji iz leta 2012 (Toplak in sod., 2012) so s pomnoževanjem regije ORF7 uspeli dokazati 30 sevov PRRSV, tako z metodo RT-PCR kot tudi z metodo RT-PCR v realnem času. Težave pri dokazovanju PRRSV z molekularnimi metodami so posledica zelo velike genetske raznolikosti sevov PRRS. Ta prav tako vpliva na uspešnost sekvenciranja različnih odsekov genoma PRRSV. V naši raziskavi smo lahko izbirali med pozitivnimi vzorci, zbranimi od leta 2011 do 2018, ki so že bili predhodno tipizirani v delu regije ORF7 in so nekateri tudi zajeti v raziskavi iz leta 2015 (Toplak, 2015). Kljub temu, da skoraj polovico vzorcev, za katere vemo, da so PRRSV pozitivni, v naši nalogi nismo uspeli sekvencirati v regiji ORF5 (58 od 127 vzorcev), le-ti ostajajo v arhivski zbirki in jih bomo lahko uporabili pri kasnejših študijah.

Obstaja več možnih razlag za neuspešno pomnoževanje večjega števila vzorcev pozitivnih na PRRSV. Razlog so lahko zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki niso bili optimalno izbrani za pomnoževanje vseh genetskih različic sevov PRRSV. Prav gotovo bi dobili več pozitivnih rezultatov, če bi uporabili večji nabor različnih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje regije ORF5 (Stadejek in sod., 2006, 2008, 2013, Balka in sod., 2018). Razlog za negativen rezultat je lahko tudi premajhno število kopij v vzorcu ali pa je bila nukleinska kislina PRRSV v vzorcih že razgrajena, do česar lahko pride zaradi večkratnega odtapljanja in ponovnega zamrzovanja vzorcev. Iste vzorce smo namreč uporabili tudi za preverjanje ustreznosti nekaterih komercialnih testov za dokazovanje PRRSV, podobno kot so to izvedli v raziskavi iz leta 2012 (Toplak in sod., 2012). Za potrebe sekvenciranja celotne regije ORF5 smo pomnoževali precej dolge odseke (744 nt v PCR 1 in 662 nt v PCR 2), kar tudi vpliva na uspešnost pomnoževanja v primerjavi z ORF7, kjer so uporabili začetne oligonukleotide, ki pomnožujejo le okrog 300 nt dolge odseke. S podobnimi težavami so se srečevali že v

predhodnih študijah (Stadejek in sod., 2006, 2008, 2013, Balka in sod., 2018), zato naši rezultati pomnoževanja odsekov genoma genetsko tako raznolikih virusov kot so virusi PRRSV niso povsem nepričakovani.

Produkte pomnoževanja smo poslali na sekvenciranje v firmo Macrogen na Nizozemsko. Zaradi zmanjševanja stroškov se vse več vzorcev pošilja na sekvenciranje v specializirane laboratorije, saj so cene postopka ugodne, hkrati pa so rezultati dobri in večinoma dosežejo naša pričakovanja. To se je potrdilo tudi pri naši študiji, saj so uspeli sekvencirati kar 98,55 % poslanih vzorcev.

Nukleinsko kislino PRRSV smo uspešno pomnožili v regiji ORF5 pri 68 pozitivnih vzorcih iz 56 različni rej, ki se nahajajo v 33 različnih občinah Slovenije. V študiji so zajeti vzorci živali pozitivnih na PRRSV iz celotnega območja Slovenije, zbranih v časovnem obdobju desetih let (od leta 2010 do 2018). Ugotovimo lahko, da so si sevi PRRSV tipizirani v regiji ORF5 med seboj zelo različni in imajo do 20,5 % razlik v nt zaporedju. Na podlagi primerjave ak zaporedja pa v regiji ORF5 ugotavljamo od 79,7 do 100,0 % identičnost. V podobni raziskavi, ki so jo opravili v regiji ORF7, so genetsko dokazali in tipizirali 394 sevov PRRSV v vzorcih, ki so bili odvzeti v 178 rejah z okuženimi prašiči (Toplak, 2015). Ugotovili so do 16,3 % razlik v nt zaporedju med slovenskimi sevi, kar je nekoliko nižji odstotek od tistega, ki smo ga določili v tej študiji. Vendar pa je potrebno upoštevati, da so pri tem uporabili za pomnoževanje regijo ORF7 virusnega genoma, za katero je poznano, da je genetsko bolj stabilna (Stadejek in sod., 2006, 2008). V obeh študijah smo potrdili veliko genetsko heterogenost sevov PRRSV, ki se nahajajo na področju Slovenije. To dejstvo potrjuje, da rejci kupujejo prašiče v zelo različnih rejah, okuženih s PRRSV. Vsako okuženo rejo pri nas pa moramo obravnavati kot ločeno epizootiološko enoto, iz katere se lahko različni sevi PRRSV razširijo v neokužene reje. Takšen primer smo dokazali pri sevu 68A/2011, pri katerem smo lahko spremljali evolucijo virusa v 31 okuženih rejah.

Sekvence ORF5 sevov PRRSV smo razdelili v sedem različnih klad, ki so jih predhodno določili v najnovejši klasifikaciji PRRSV iz srednje in vzhodne Evrope (Balka in sod., 2018). V omenjeni raziskavi so 402 sekvenci ORF5 sevov PRRSV, ki so izvirali iz Madžarske, Poljske, Češke, Bolgarije, Srbije, Slovenije, Slovaške, Romunije in Hrvaške, skupaj z referenčnim sevom Lelystad in cepnimi sevi Porcilis, Avermac in Prysvac razdelili v 18 skupin, ki so se delile naprej v linije 1, 2 in 3, ter nato še v manjše klade, 1, 1A-1G, 2 in pa 3A-3G (Balka in sod., 2018). V študijo primerjave srednje in vzhodno-evropskih sevov so vključili tudi sedem sevov PRRSV iz Slovenije, ki so se razvrstili v klade 1, 1A, 3B in 3D. Na podlagi te zadnje večje evropske raziskave smo iz dostopnih sevov v genski banki odbrali najbolj ustrezne reprezentativne predstavnike za vsako klado in jih uvrstili v filogenetsko drevo. Ugotovili smo, da se naših 68 sevov PRRSV uvršča v eno od sedmih klad 1, 1A, 1B, 1G, 3B, 3C in 3D (Slika 6). Prav gotovo ta razvrstitev naših sevov PRRSV v klade ni dokončna in se bo v prihodnje lahko še spremenila.

Od 90 sekvenc madžarskih sevov PRRS jih je kar 83 (92,2 %) uvrščenih v klade 1A-1G (Balka in sod., 2018). Podobno so se sevi PRRSV, ki smo jih ugotovili pri nas, večinoma uvrščali v klade 1A-1G (77,9 %). Vendar pa smo v Sloveniji na podlagi primerjave nt zaporedja ORF5 ugotovili genetsko povsem drugačne seve PRRSV, tako da za noben slovenski sev ne moremo trditi, da bi imel bližnjega sorodnika iz Madžarske.

V študiji iz leta 2018 opozarjajo na možnost rekombinacij v regiji ORF5 (Balka in sod., 2018), zato je klasifikacija PRRSV lahko še bolj težavna, saj se na ta način ustvarjajo novi sevi virusov, ki jih ne moremo razvrstiti v nobeno od klad. Tudi v naši raziskavi smo imeli določene težave z uvrščanjem sevov PRRSV v posamezne klade, saj smo določili povsem nove seve PRRSV, za katere pa ne moremo potrditi, da gre za rekombinantne seve. Pogosto so v genski banki dostopne sekvence PRRSV iz rej držav, s katerimi imamo manjši trgovinski promet z živimi prašiči. To pa lahko pomeni, da so z uvozom prašičev v našo državo prišli tudi novi sevi PRRSV. Na drugi strani pa smo ugotovili, da je poljski sev iz klade 1B, genetsko najbližji naši največji skupini 41 sevov PRRSV (Slika 10), čeprav je Poljska država, ki je geografsko zelo oddaljena od nas. Kljub temu, da so naši in poljski sevi uvrščeni v isto klado 1B, pa si genetsko niso tako zelo sorodni, da bi lahko na Poljskem iskali vir okužbe za slovensko rejo v letu 2011 (sev 68A/2011). Prav gotovo pa bodo prihodnje raziskave potrdile, da se izvorni sev nahaja tudi v kateri od drugih evropskih držav.

Reje pozitivne na PRRSV, v katerih smo odvzeli vzorce prašičev za dokazovanje in genetsko karakterizacijo sevov PRRSV v ORF5, se nahajajo na celotnem območju Slovenije. Največ jih najdemo v Pomurju in na Štajerskem, kjer se nahaja tudi največje število prašičjih rej v Sloveniji (Toplak, 2015). Z našo raziskavo smo ugotovili, da je 56 nt zaporedij ORF5 kar v več kot 95,0 % identičnih z zaporedji nt, ki so objavljeni v genski banki (Tabela 3). Med njimi je kar 41 zaporedij ORF5 sevov PRRSV iz 33 različnih rej, ki so genetsko zelo blizu (> 98,0 %) sevu SLO/6770-2/2013 (MF600621), (Balka in sod., 2018). Vseh 41 sevov PRRSV pa se od prvega najbližjega seva v genski banki razlikuje za več kot 10,0 % (ni prikazano). Ugotovimo lahko, da enaki sevi PRRSV iz drugih držav še niso objavljeni v genski banki, zato z našo raziskavo pomembno dopolnjujemo podatke o genetski raznolikosti sevov PRRSV, ki krožijo v Evropi. Vsi naši sevi, uvrščeni v klado 1B (n = 41), verjetno izvirajo iz seva 68A/2011, ki je bil tipiziran v regiji ORF7 že v raziskavi leta 2015 (Toplak, 2015) in so ga po takratni aktualni klasifikaciji uvrstili v skupino 1m. Podobno kot v naši raziskavi so že takrat ugotovili, da je prišlo do vnosa virusa iz tujine. Virus se je v obdobju med leti 2009 do 2015 širil med najmanj 48 okuženimi slovenskimi rejami (Toplak, 2015), kar pomeni, da je število okuženih rej lahko še bistveno večje. Ugotovljeni sevi PRRSV iz omenjene raziskave (Toplak, 2015) imajo od 96,1 do 100,0 % identičnost zaporedja nt. V naši raziskavi pa so se sevi PRRSV v ORF5 razlikovali od 94,6 do 99,8 % (Slika 10). Pri sevu PRRSV 180A/2015 lahko ugotovimo večje razlike od preostalih slovenskih sevov iz klade 1B (Slika 10 in 11), kar pomeni, da gre zelo verjetno za vnos genetsko podobnega PRRSV, vendar iz drugega vira, kot smo ugotovili za sev PRRSV 68A/2011.

Največjo identičnost v zaporedju nt ORF5 PRRSV z zaporedji dostopnimi v genski banki smo ugotovili med dvema slovenskima sevoma PRRSV (212A/2017 in 230A/2018) in sevom AUT 15-33/2016 (KU494019) iz Avstrije, kar je verjetno posledica vnosa tega virusa z uvozom živih okuženih prašičev v Slovenijo (Tabela 3). Pri drugih dveh sevih (203A/2016 in 214A/2017) smo ugotovili od 99,17 do 99,67 % identičnost v nt zaporedju s sevom SPA_CReSA-57_2014, ugotovljenim v Španiji. Po dodatni analizi smo ugotovili, da gre verjetno za seva PRRSV, ki sta bila v reji prisotna kot posledica cepljenja prašičev s sevom Amervac, s katerim imata naša seva od 98,84 do 99,33 % identičnost v zaporedju nt ORF5 (Slika 7). Pojav enakega seva v Španiji je verjetno posledica dejstva, da so tudi v okuženi španski reji cepili prašiče z enakim cepivom. Podobno kot pri nas so tudi v španski reji cepni sev ugotovili pri prašičih.

V naši raziskavi smo določili 12 novih sevov PRRS, ki imajo manj kot 95,0 % identičnost v nt zaporedju ORF5 s katerimkoli od genetsko najbližjih sevov v genski banki (Tabela 3), kar pomeni, da do sedaj še niso bili odkriti oziroma še niso bili vpisani v gensko banko ter tako predstavljajo določitev novih sevov PRRSV v mednarodnem prostoru.

Preverili smo, kateri sev PRRSV v genski banki je genetsko najbližji našemu sevu PRRSV 68A/2011 in ugotovili, da je to sev DEN/GP5-2.46/2001 (AY035923) iz Danske, s katerim ima naš sev 90,1 % identičnost v nt zaporedju ORF5 (Tabela 3). Danska je ena od največjih izvoznic plemenskih prašičev in pitancev, zato bi lahko v tej državi iskali izvorni vir okužbe s tem sevom PRRSV. Dejstvo, da je sev 68A/2011 in ostalih 40 slovenskih sevov v regiji ORF5 najbolj sorodnih samo enemu slovenskemu predstavniku iz genske banke (SLO-6770-2-2013, MF600621) in nobenemu izmed tujih sevov, ki so trenutno dostopni v genski banki (Tabela 3), samo potrjuje, da gre za sev, ki v drugih državah ni zelo razširjen in se je k nam po vsej verjetnosti prenesel preko nakupa okuženih prašičev. Očitno pa je imel pri nas ugodne pogoje za širjenje in se je pri nas obdržal, ter postal endemičen.

V sedmih rejah (30, 47, 112, 155, 156, 166 in 168) smo ugotavljali prisotnost PRRSV ob več zaporednih odvzemih ali celo več let zaporedoma (Tabela 3). V nekaterih rejah smo določili vedno enak sev, v drugih pa smo na podlagi nt zaporedja ORF5 ugotovili vnose drugih sevov, podobno, kot je bilo ugotovljeno v predhodni študiji (Toplak, 2015).

S tipizacijo 68 sevov PRRSV v ORF5 in genetskih razlik med njimi lahko ugotovimo, da je prisotnost različnih sevov posledica vnosa različnih virusov PRRSV iz najmanj 18 različnih virov, kjer so ti sevi PRRSV prisotni (Slika 6). V raziskavi, ki je temeljila na analizi nt zaporedij ORF7 sevov PRRSV iz leta 2015, poročajo o dokaj homogeni sliki med sevi znotraj iste reje (Toplak, 2015). V naši raziskavi, ki temelji na analizi nt zaporedij ORF5, pa lahko opazimo večjo heterogenost sevov znotraj rej (Slika 6 in 7), vendar je treba poudariti, da smo v primerjavo vključili manjše število vzorcev iz posameznih rej. V primeru, da bi preiskali večje število vzorcev v posamezni reji, bi verjetno prišli do podobnih ugotovitev. Dokaz različnih sevov PRRSV znotraj iste reje potrjuje tudi domnevo, da se v Sloveniji preventivni ukrepi za preprečevanje vnosa PRRSV izvajajo pomanjkljivo oziroma se celo ne izvajajo.

Tako so naše prašičje reje pri vsakem nakupu živih prašičev zelo ranljive (vnos živali brez predhodnih laboratorijskih pregledov, brez karantene, širjenje virusa s plemenskimi merjasci, prekupevalci...) in zelo izpostavljene okužbi z novimi sevi PRRSV iz tujine, ki jih bomo v prihodnje verjetno zasledili še pogosteje.

V študijah iz leta 2010 in 2015 (Toplak in sod., 2010, Toplak, 2015) poudarjajo, da velika genetska raznolikost in hitro spreminjanje PRRSV zmanjšuje uspešnost cepljenja. Cepljenje je seveda samo eden izmed možnih ukrepov za kontrolo bolezni PRRS v okuženih rejah in služi zmanjševanju ekonomskih škod. Cepljenje je smiselno, v kolikor bi uporabili cepni sev, ki je v nt zaporedju več kot v 95,0 % identičen sevu, ki je okužil rejo (Toplak, 2015). Tako imenovano cepljenje "na slepo", v številnih okuženih rejah ne daje ustrezne zaščite in ne prepreči kroženja PRRSV v reji, ampak le nekoliko zmanjša ekonomske škode. Vsekakor pa številne okužene slovenske reje dokazujejo, da je z virusom PRRS mogoče "preživeti", z upoštevanjem stalnih izgub zaradi pogina pujskov in zmanjšanega prirasta. V naši raziskavi smo v dveh rejah dokazali cepni sev virusa Amervac (Slika 6), kar dokazuje, da se poleg cepiva Porcilis in cepiva, ki vsebuje genotip 2, v Sloveniji uporablja še tretja vrsta cepiva. Uporaba večjega števila različnih cepiv dokazuje, da cepljenje ni najbolj uspešno, tako da poskušajo rejci in veterinarji z zamenjavo najti bolj učinkovito cepivo. Glede na veliko število različnih sevov PRRSV, ki jih ugotavljamo v slovenskih rejah, je takšno cepljenje večkrat neuspešno (Štukelj, 2013). Poleg tega z živimi cepivi vnašamo v reje nove seve PRRSV, ki bi lahko v prihodnje, ob zanje ugodnih pogojih, povzročili še večjo ekonomsko škodo. V italijanski študiji so v regijah ORF5 in ORF7, med leti 2009 do 2012, opisali 6 rekombinantnih sevov, ki so nastali zaradi rekombinacije med divjim in cepnim sevom kot posledica neustrezne uporabe cepiv (Franz in sod., 2014). Pred uporabo cepiva bi bilo zato potrebno najprej preveriti genetsko sorodnost seva PRRSV, ki kroži v populaciji prašičev, s sevom, ki ga vsebuje cepivo. V primeru, da takšno cepivo ne obstaja, bi bilo potrebno izdelati hlevsko vakcino iz seva, ki je prisoten v reji.

Genetska tipizacija sevov PRRSV v regiji ORF5 je pomembna, saj ta regija kodira glikoprotein, ki je glavni antigen PRRSV, na katerega se vežejo nevtralizacijska protitelesa. Za cepiva je torej pomembno, da vsebujejo sev PRRSV z glikoproteinom, ki omogoča nastanek zaščitnih protiteles proti sevu PRRSV, ki kroži v reji prašičev (Fang in sod., 2006). Ugotovili so, da določeni sevi virusov PRRSV uporabljajo imunodominantne nevtralizacijske epitope, s katerimi zavrejo tvorbo nevtralizacijskih protiteles, ki so odgovorni za samo nevtralizacijo virusa (Fang in sod., 2006). Na tak način slabijo imunski sistem in onemogočajo dober odgovor na uporabljeno vakcino. V prihodnje bi tako lahko na podlagi podatkov genetske analize regije ORF5 PRRSV, izdelali bistveno boljše cepivo.

Proti okužbam z različnimi sevi PRRSV se je mogoče boriti tudi na druge načine, enega od teh ponuja že sama reja okužena z določenim sevom PRRSV. Leta 2013 je bila v Sloveniji izvedena študija, v katero so vključili devet farm pozitivnih na PRRS. Poleg uvedbe biovarnostnih ukrepov in dvojne zapore reje, so na treh farmah uporabili metodo naravne prekužitve, na treh farmah metodo serumske imunizacije in na treh farmah vakcinacijo. V

vseh rejah so uspeli odstraniti PRRSV, kar potrjuje, da so že osnovni biovarnostni ukrepi in pravilen pristop rejca ključ do uspešnega nadzora bolezni (Študelj, 2013).

Nt zaporedja regije ORF5 68 sevov PRRSV v dolžini 606 nt, ki smo jih določili v naši raziskavi, smo poslali v gensko banko. Dostopni so pod številkami od MK814044 do MK814111 in so tako na voljo raziskovalcem po svetu, ki se bodo v prihodnje ukvarjali s to tematiko. Ta nt zaporedja pomembno dopolnjujejo zbirko predhodno objavljenih 7 sevov PRRS, ki so jih določili v Sloveniji in so že dostopna v genski banki od leta 2018 (Balka in sod., 2018). Podatki, ki smo jih dobili v okviru naše raziskave, bodo tudi v pomoč pri ugotavljanju kronološkega sosledja vnosov in prenosov PRRSV na določenem območju, za ugotavljanje vnosa novega seva iz neznanega ali endemičnega področja. V naši raziskavi smo tako ugotovili prisotnost seva PRRSV (uvrstili smo ga v klado 1B), ki se je v reje vnesel s trgovanjem iz neznanega vira in je sedaj pri nas endemično prisoten (Slika 10).

Čeprav je bilo naše delo zelo obsežno, pa bi nam vključitev še večjega števila sevov PRRSV v genetsko analizo regije ORF5 omogočila boljše poznavanje raznolikosti sevov PRRSV, ki krožijo v slovenskih rejah. Dokazovanje PRRSV s pomnoževanjem regije ORF5 bi lahko izboljšali tudi z uporabo dodatnih začetnih oligonukleotidov. Predvidevamo, da so v naših rejah prisotni tudi rekombinantni sevi PRRSV, saj smo ugotovili, da znotraj posamezne reje kroži tudi več različnih sevov PRRSV. Ugotavljanje teh rekombinant bi si prav tako zaslužilo več pozornosti.

Rezultati te raziskave so pomembni za nadaljnje primerjave sevov PRRSV, ki se pojavljajo v naših okuženih rejah in sevov PRRSV, ki se pojavljajo v drugih državah po svetu.

Tekom naše raziskave smo se povezali tudi z raziskovalci iz Avstrije in Madžarske. Skupaj smo opravili obsežno primerjavo sevov PRRSV v treh sosednjih državah. Trenutno pripravljamo skupno študijo, v katero bodo zajeti tudi naši rezultati.

V nalogi smo si postavili tri hipoteze. Na podlagi rezultatov smo lahko odgovorili na vse tri postavljene hipoteze. Potrdili smo prvo hipotezo, ki trdi, da so sevi PRRSV, ki jih najdemo v Sloveniji, genetsko zelo heterogeni. Ugotovili smo, da se slovenski sevi uvrščajo v sedem klad: 1, 1A, 1B, 1G, 3B, 3C in 3D (Slika 6).

Drugo hipotezo, ki pravi, da so tipizirani sevi PRRSV genetsko zelo sorodni (> 95,0 %) s sevi iz genske banke, smo delno potrdili in delno ovrgli. Iz primerjave sekvenc (Tabela 3) smo ugotovili, da ima 51 naših sevov več kot 95,0 % identično zaporedje nt z objavljenimi sevi v genski banki, medtem ko je 17 sevov PRRSV iz te študije manj kot v 95,0 % sorodnih kateremukoli od sevov PRRSV v genski banki.

Potrdili smo tudi tretjo hipotezo, ki trdi, da lahko isti sev PRRSV najdemo v večjem številu okuženih rej, kar dokazuje neposredno povezavo za prenos virusa med njimi. Namreč dobili smo kar 41 zaporedij ORF5 sevov PRRSV iz 33 različnih rej, ki so uvrščeni v klado 1B in

verjetno izvirajo iz seva 68A/2011, ki je bil tipiziran v regiji ORF7 že v raziskavi leta 2015 (Toplak, 2015) in so ga po takratni aktualni klasifikaciji uvrstili v skupino 1m.

6 SKLEPI

- V raziskavi smo prvič uspešno sekvencirali večje število slovenskih sevov PRRSV v regiji ORF5.
- Oseminšestdesetim sevom PRRSV iz 56 različnih slovenskih rej prašičev smo uspešno določili nt zaporedje v dolžini 606 nt v regiji ORF5 in jih primerjali med seboj ter z najbližjimi sevi iz genske banke.
- Izdelali smo filogenetska drevesa in tipizirane slovenske seve uvrstili po najnovejši klasifikaciji PRRSV v sedem klad (1, 1A, 1B, 1G, 3B, 3C, 3D) znotraj genotipa 1.
- V obdobju od leta 2010 do 2018 v Sloveniji ugotavljamo prisotnost genetsko zelo raznolikih PRRSV.
- Velika genetska raznolikost sevov PRRSV je v Sloveniji posledica uvoza okuženih prašičev iz najmanj 18 različnih virov okužbe, verjetno iz različnih evropskih držav.
- Po vnosu PRRSV v Slovenijo se je isti sev virusa PRRS (68A/2011) zelo hitro razširil v najmanj 31 prašičjih rej, kar je razvidno iz nt zaporedja regije ORF5 sekvenciranih sevov, ki spadajo v klado 1B.
- V dveh rejah (30 in 47) smo sekvencirali več sevov PRRSV in v posamezni reji potrdili prisotnost PRRSV iz najmanj dveh različnih klad.
- Ugotovili smo 12 sevov PRRSV, ki se v nt zaporedju regije ORF5 za več kot 5,0 % razlikujejo od najbližjih sevov v genski banki, kar predstavlja nov doprinos k znanosti v mednarodnem prostoru.
- V dveh rejah smo ugotovili sev PRRSV, ki je genetsko zelo podoben cepnemu sevu Amervac.

7 ZAHVALA

Rad bi se zahvali izr. prof. Ivanu Toplaku za dragocene izkušnje in znanje, ki mi jih je pomagal pridobiti tekom naloge, za njegov trud pri usmerjanju in mentorstvu, za vso potrpežljivost, ki jo je pokazal in pa predvsem za njegovo dostopnost in odprtost, ter verjetno to, kar mi je pri ustvarjanju tega dela najbolj pomagalo, da se je bil vedno pripravljen pogovoriti in mi kljub zaposlenosti, vedno namenil svoj čas. Hvala.

Zahvalil bi se tudi vsem na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo, vsem zaposlenim v Virološkem laboratoriju, ki so kakorkoli pripomogli k naši raziskavi, predvsem pa dr. Danijeli Rihtarič, dr. vet. med. in Poloni Berčon.

Veterinarski fakulteti se zahvaljujem za financiranje raziskovalnega dela v okviru programske skupine P4-0092, katero vodi zn. svet. dr. Matjaž Ocepek, dr. vet. med.

Rad bi se zahvalil tudi moji družini in prijateljem, za skrb in podporo ter za vso pomoč pri urejanju naloge.

8 LITERATURA

Balka G, Hornyák A, Bálint A, et al. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains circulating in Hungarian swine herds. *Vet Microbiol* 2008; 127: 128–35.

Balka G, Podgórska K, Brar MS, et al. Genetic diversity of PRRSV 1 in Central Eastern Europe in 1994–2014: origin and evolution of the virus in the region. *Sci Rep* 2018; 8: e7811(12 str.)
<https://www.nature.com/articles/s41598-018-26036-w.pdf> (30.4.2019)

Cavanagh D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 1997; 42: 629–33.

Choen DS, Chae C. Distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in stillborn and live born piglets from experimentally infected sows. *J Comp Pathol* 2001; 124: 231–7.

Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, et al. Persistence of porcine reproductive respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest* 1995; 7: 456–64.

DiPietre D, Mulberry L. The Economics of PRRS. In: *The pig site*. Sheffield: 5m Publishing, 2017.
<https://thepigsite.com/articles/the-economics-of-prrs> (2.9.2019)

Donadeu M, Arias M, Gomez-Tejedor C, et al. Using polymerase chain reaction to obtain PRRSV-free piglets from epidemically infected herds. *Swine Health Prod* 1999; 7: 255–61.

Done SH, Paton DJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. *Vet Rec* 1995; 136: 32–5.

Fang L, Jiang Y, Xiao S, Niu C, Zhang H, Chen H. Enhanced immunogenicity of the modified GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Genes* 2006; 32(1): 5–11.

Franzo G, Cecchinato M, Martini M, Ceglie L, Gigli A, Drigo M. Observation of high recombination occurrence of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in field condition. *Virus Res* 2014; 194: 159–66.

Halbur GP, Bush E. Update on abortion storms and sow mortality. *Swine Health Prod* 1996; V5(2): 73.

Hopper SA, White ME, Twiddy N. An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *Vet Rec* 1992; 131(7): 140–4.

Jantafong T, Sangtong P, Saenglub W, et al. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Thailand and Southeast Asia from 2008 and 2013. *Vet Microbiol* 2015; 176: 229–38.

Kappes MA, Faaborg KS. PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology* 2015; 479/480: 475–486.

Kimman TG, Cornelissen LA, Moormann RJ, Rebel JMJ, Stockhofe - Zurwieden N. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine* 2009; 27: 3704–18.

Kitchin PA, Bootmann JS. Quality control of the polymerase chain reaction. *Med Virol* 1993; 3: 107–14.

Kuhn JH, Lauck M, Bailey AL, et al. Reorganization and expansion of the nidoviral family Arteriviridae. *Arch Virol* 2016; 161(3): 755–68.

Lager KM, Halbur PG. Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8: 275–82.

Li B, Fang L, Xu Z et al. Recombination in vaccine and circulating strains of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(12): 2032–5.

Loula T. Mystery pig disease. *Agripractice* 1991; 12: 23–34.

Lunney JK, Benfield DA, Rowland RRR. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: An update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Res* 2010; 154 (1–2): 1–6.

Martín-Valls GE, Kvisgaard LK, Tello M, et al. Analysis of ORF5 and full-length genome sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates of genotypes 1 and 2 retrieved worldwide provides evidence that recombination is a common phenomenon and may produce mosaic isolates. *Virol* 2014; 88(6): 3170–81.

Mengeling WL, Lager KM. A brief review of procedures and potential problems associated with the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Res* 2000; 31: 61–9.

MKGP RS. Prašičje meso. Ljubljana: Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, 2019

http://www.mkgp.gov.si/si/delovna_podrocja/kmetijstvo/kmetijski_trgi/prasicje_meso/
(30.4.2019).

Murtaugh M. Update on PRRSV immunology and viral genetics: From hopeless to hopeful. Dallas: American Association of Swine Veterinarians, 2009: 459–62.

Plain R. World pork production in line with population growth. St. Charles: Farm Progress, 2018.

<https://www.nationalhogfarmer.com/marketing/world-pork-production-line-population-growth> (30.4.2019).

Prieto C, Castro JM. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) in gestating sows. *Vet Res* 2000; 31: 56–7.

QUIAGEN. QIAamp® Viral RNA. Mini Handbook, 2018.

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=2ahUKEwjb4uL41aXkAhVlo4sKHXCiDQIAamp%C2%AE%20Viral%20RNA.%20Mini%20HandbookknwQFjABegQIARAC&url=https%3A%2F%2Fwww.qiagen.com%2Fus%2Fresources%2Fdownload.aspx%3Fid%3Dc80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018%26lang%3Den&usg=AOvVaw1hw8pDa7wdus-_KkN7pEdV (29.8.2019)

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230 (4732): 1350–4.

Schulze M, Revilla-Fernández S, Schmoll F, Grossfeld R, Griessler A. Effects on boar semen quality after infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a case report. *Acta Vet Scand* 2013; 55(1): 16.

Shi M, Lam TTY, Hon CC, et al. Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus Res* 2010; 154: 7–17.

Stadejek T, Oleksiewicz MB, Potapchuk D, Podgorska K. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *Gen Virol* 2006; 87: 1835–41.

Stadejek T, Oleksiewicz MB, Scherbakov AV, et al. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Arch Virol* 2008; 153(8): 1479–88.

Stadejek T, Stankevicius A, Murtaugh MP, Oleksiewicz MB. Molecular evolution of PRRSV in Europe: Current state of play. *Vet Microbiol* 2013; 165(1/2): 21–8.

Stadejek T, Stankevicius A, Storgaard T, et al. Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *Gen Virol* 2002; 83: 1861–73.

Stevenson GW, Van Alstine WG, Kanitz CL, Keffaber KK. Edemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of nursery pigs in two swine herds without current reproductive failure. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 432–4.

Suarez P. Ultrastructural pathogenesis of PRRS virus. *Vet Res* 2000; 31: 47–55.

Sur JH, Doster AB, Christian JS, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J Virol* 1997; 71: 9170–9.

Štukelj M. Eliminacija prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma (PRRS) z naravno prekužitvijo, serumizacijo in vakcinacijo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2013. Doktorska disertacija

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S .MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30(12): 2725–9.

Taylor DJ. Pig diseases, 8th ed.: Glasgow: Taylor D.J., 2006: 60–8.

ThermoFisher Scientific. Basic Principles of RT-qPCR. Waltham, 2019.

<https://www.thermoFisher.com/si/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html> (13.6.2019).

Tong GZ, Zhou YJ, Hao XF, Tian ZJ, An TQ, Qiu HJ. Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, China. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(9): 1434–36.

Toplak I. Molekularna epidemiologija sevov virusa prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma (PRRS) v Sloveniji. Ljubljana: Veterinarska fakulteta 2015.

Toplak I, Rihtarič D, Hostnik P, Grom J, Štukelj M, Valenčak Z. Identification of a genetically diverse sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Slovenia and the impact on the sensitivity of four molecular tests. *J Virol Methods* 2012; 179: 51–6.

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, Nacionalni veterinarski inštitut, 2010.

Valenčak Z. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Slovenia: evaluation of serology. *Slov Vet Res* 2004; 41: 99–101.

Van Reeth K. Pathogenesis and clinical aspects of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Microbiol* 1997; 55: 223–30.

Zhou L, Zhang J, Zeng J, et al. The 30 amino acids deletion in Nsp2 of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China is not clearly related to its virulence. *J Virol* 2009; 83(10): 5156–67.

Zhou L, Yang H. Porcine reproductive and respiratory syndrome in China. *Virus Res* 2010; 154: 31–7.

Zimmerman J, Benfield D, Christopher-Hennings J, Dee S, Stevenson G. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS). *Agricultural Disasters Preparedness and Recovery* 2015; 1–26.

Zimmerman JJ, Benfield DA, Dee SA, et al. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus). In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW eds. *Diseases of Swine*. 10th ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2012: 461–86.

Zimmerman JJ, Yoon KJ, Wills RW, Swenson SL. General overview of PRRSV: a perspective from the United States. *Vet Microbiol* 1997; 55: 187–96.