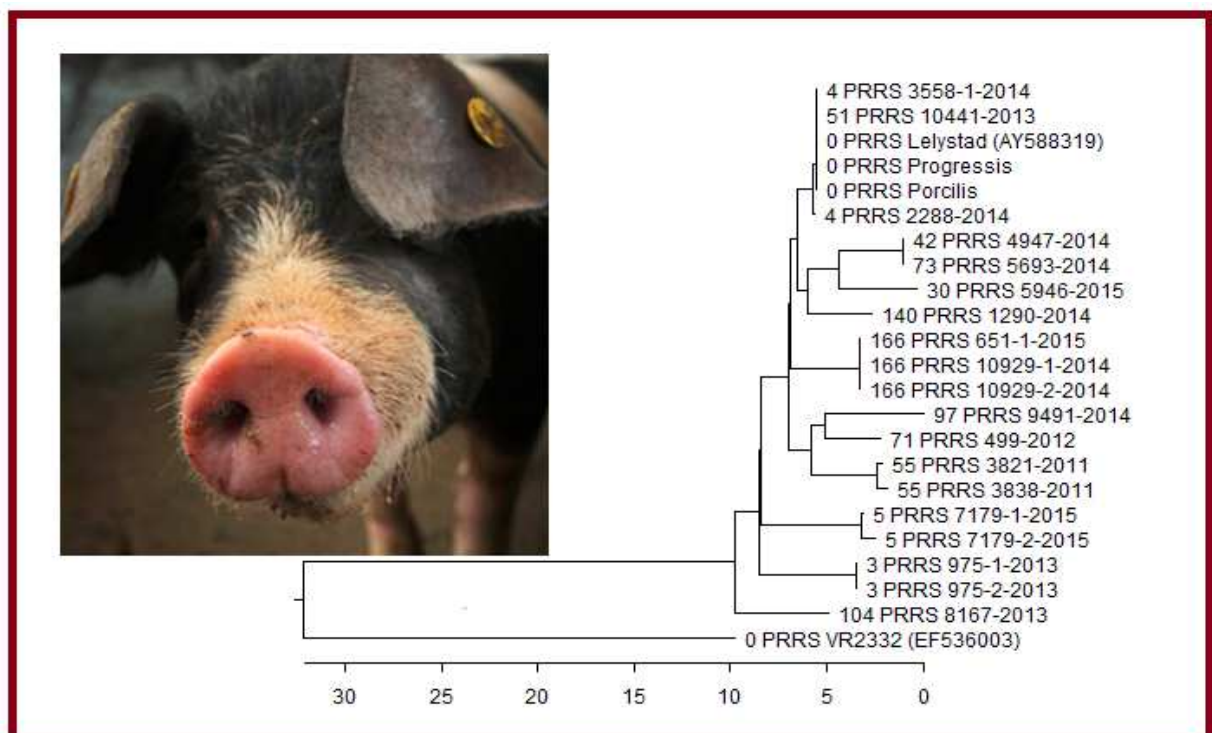




Ivan Toplak

MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA SEVOV VIRUSA PRAŠIČJEGA REPRODUKCIJSKEGA IN RESPIRATORNEGA SINDROMA (PRRS) V SLOVENIJI



Univerza
v Ljubljani *Veterinarska*
fakulteta



Ivan Toplak

**MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA SEVOV VIRUSA PRAŠIČJEGA
REPRODUKCIJSKEGA IN RESPIRATORNEGA SINDROMA (PRRS)
V SLOVENIJI**

Ljubljana, 2015

Avtor: viš. zn. sod. dr. Ivan Toplak, dr. vet. med.

Strokovna recenzija:

prof. dr. Jože Grom, Veterinarska fakulteta

prof. dr. Peter Hostnik, Veterinarska fakulteta

Izdajatelj: Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

Leto izida: 2015

Vse pravice pridržane. Nobenega dela te publikacije se ne sme reproducirati ali posredovati v kakršnikoli obliki brez predhodnega pisnega dovoljenja avtorjev.

CIP - Kataložni zapis o publikaciji

Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

636.4.09:616.98-036.22(497.4)(0.034.2)

TOPLAK, Ivan, 1972-

Molekularna epidemiologija sevov virusa prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma (PRRS) v Sloveniji [Elektronski vir] / Ivan Toplak. - El. knjiga. - Ljubljana : Veterinarska fakulteta, 2015

ISBN 978-961-6199-76-6 (pdf)

281849088

KAZALO VSEBINE

MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA SEVOV VIRUSA PRAŠIČJEGA REPRODUKCIJSKEGA IN RESPIRATORNEGA SINDROMA (PRRS) V SLOVENIJI

| | |
|--|-----------|
| <i>Predgovor</i> | 7 |
| 1 NEKATERA IZHODIŠČA, POMEMBNA ZA IZVEDBO ŠTUDIJE | 8 |
| 1.1 Prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom (PRRS) | 8 |
| 1.1.1 Organizacija genoma virusa PRRS | 8 |
| 1.2 Razdelitev sevov PRRS v genotip 1 in genotip 2 | 9 |
| 1.3 Pojavljanje okužb z virusi PRRS po različnih evropskih državah | 13 |
| 1.4 Načini prenosa virusa PRRS med rejami in kontrola bolezni | 13 |
| 1.5 Namen in uporabnost molekularno epidemioloških študij | 14 |
| 1.6 Podatki za izvedbo molekularno epidemiološke študije PRRS | 15 |
| 2 UGOTAVLJANJE OKUŽENIH REJ S PRRS | 16 |
| 2.1 Vzorčenje v posamezni reji | 16 |
| 2.2 Najpogostejša vrsta vzorcev za dokaz virusa PRRS | 17 |
| 2.3 Različne metode za dokaz virusa PRRS | 17 |
| 2.3.1 Izolacija virusa PRRS | 17 |
| 2.3.2 Dokaz virusa PRRS z molekularnimi metodami | 17 |
| 2.3.2.1 Dokaz virusa s klasično metodo RT-PCR | 18 |
| 2.3.2.2 Dokaz virusa z metodo RT-PCR v realnem času | 19 |
| 2.4 Določanje nukleotidnega zaporedja pozitivnim vzorcem PRRS | 19 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.5 | Analiza nukleotidnih zaporedij in primerjava med virusi PRRS | 20 |
|------------|---|-----------|

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3 | MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA VIRUSOV PRRS, SLOVENIJA 2009 - 2015 | 21 |
|----------|---|-----------|

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.1 | Genetska raznolikost sevov PRRS ugotovljenih v Sloveniji | 21 |
| 3.1.1 | Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1a | 25 |
| 3.1.2 | Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1b | 26 |
| 3.1.3 | Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1c | 28 |
| 3.1.4 | Okuženi reji s sevi virusov PRRS iz podtipa 1d | 28 |
| 3.1.5 | Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1e | 29 |
| 3.1.6 | Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1f | 33 |
| 3.1.7 | Okuženi reji s sevi virusov PRRS iz podtipa 1g | 34 |
| 3.1.8 | Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1h | 34 |
| 3.1.9 | Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1i | 35 |
| 3.1.10 | Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1j | 36 |
| 3.1.11 | Okužena reja s sevom virusa PRRS iz podtipa 1k | 37 |
| 3.1.12 | Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1m | 38 |
| 3.1.13 | Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1n | 41 |
| 3.1.14 | Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1o | 41 |
| 3.2 | Primerjava naših sevov PRRS s sevi iz drugih držav | 42 |
| 3.3 | Ugotovitev sevov PRRS iz genotipa 2 | 44 |
| 3.3.1 | Ugotovitev cepnega seva VR2332 v pozitivnih rejah | 45 |
| 3.3.2 | Ugotovitev divjih sevov virusov PRRS genotipa 2 | 46 |
| 3.3.3 | Istočasna prisotnost sevov virusov PRRS genotipa 1 in genotipa 2 v okuženi reji | 46 |
| 3.4 | Primerjava pozitivnih vzorcev PRRS, ugotovljenih znotraj iste reje | 49 |
| 3.4.1 | Ugotovitev zelo podobnih virusov PRRS v reji 80 v obdobju od 2012 do 2015 | 49 |
| 3.4.1.1 | Genetsko spreminjanje virusa PRRS podtipa 1e v reji 80 v obdobju štirih let | 50 |
| 3.4.2 | Pojavljanje virusov PRRS v reji 29 v obdobju od 2010 do 2013 | 51 |
| 3.4.2.1 | Ugotovitev dveh linij genetsko zelo podobnih sevov PRRS v reji 29 | 51 |
| 3.4.2.2 | Primerjava večjega števila pozitivnih vzorcev iz reje 29, ugotovljenih ob istem vzorčenju | 52 |
| 3.4.3 | Spremljanje virusov PRRS v reji 67 v obdobju od 2011 do 2013 | 53 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.4.4 | Ugotovitev različnih podtipov virusov PRRS znotraj iste reje | 53 |
| 3.4.4.1 | Ugotovitev petih različnih podtipov virusov PRRS v reji 47 v obdobju od 2010 do 2015 | 53 |
| 3.4.4.2 | Ugotovitev šestih različnih podtipov virusov PRRS v reji 30 v obdobju od 2010 do 2015 | 55 |
| 3.5 | Pojavljanje dveh najpogosteje ugotovljenih podtipov 1e in 1m | 57 |
| 3.6 | Uporaba cepljenja proti virusu PRRS v okuženih rejah | 60 |
| 3.6.1 | Cepljenje pozitivnih rej s cepivom, ki vsebuje virus PRRS genotipa 1 | 61 |
| 3.6.2 | Cepljenje pozitivnih rej s cepivom, ki vsebuje virus PRRS genotipa 2 | 61 |
| 3.6 | Pojavljanje PRRS pri divjih prašičih | 62 |
| 4 | ZAKLJUČKI | 62 |
| 5 | LITERATURA | 65 |

Predgovor

Monografija za naslovom "Molekularna epidemiologija sevov virusa prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma (PRRS) v Sloveniji" zajema sedemletno spremljanje genetske raznolikosti virusov PRRS, ki smo jih ugotavljali v slovenskih prašičjih rejah. Zaradi hitrega razmnoževanja in prenosa med prašiči nastajajo vedno nove variante virusov PRRS, kar povečuje njihovo genetsko raznolikost. Sodoben način vzreje omogoča širjenje "super virusov", ki se hitro raznesejo med prašičjimi rejami. Leta 2009 smo virus PRRS prvič dokazali v Sloveniji, v naslednjih letih smo ugotavljali nadaljevanje širjenja in vnos novih sevov virusov PRRS v naše reje prašičev. Kroženje velikega števila različnih virusov PRRS v rejah je pokazatelj pomanjkljivega izvajanja preventivnih ukrepov, kar otežuje uspešno kontrolo bolezni.

S pomočjo molekularno epidemioloških študij lahko natančno opredelimo, kateri sevi virusa povzročajo okužbe, pojasnimo vztrajanje okužbe v reji, sledimo vzročni povezanosti med okuženimi rejami in uspešnje načrtujemo preventivo ter kontrolo bolezni.

Gradivo opisuje osnovne pojme in pristope, ki jih uporabljamo pri študijah molekularne epidemiologije. V delu so predstavljeni konkretni primeri, ki smo jih povzeli iz primerjave nukleotidnih zaporedij ugotovljenih virusov PRRS med leti 2009 in 2015, podobne pristope lahko uporabimo tudi pri drugih povzročiteljih bolezni. Delo je namenjeno predvsem študentom veterinarske medicine, ki se pri predmetu Epizootiologija srečajo z obravnavano tematiko, koristila pa bo tudi veterinarjem po zaključenem študiju, da pridobijo nova znanja.

Za pomoč pri testiranju in sekvenciranju vzorcev se posebej zahvaljujem dr. Danijeli Rihtarič, dr. vet. med., Nataliji Novak in Poloni Žagar ter ostalim delavcem Virološkega laboratorija. Hvala doc. dr. Marini Štukelj, dr. vet. med., za odvzem dodatnih vzorcev iz pozitivnih rej, ki smo jih natančneje skupaj spremljali, prav tako zahvala vsem ostalim veterinarjem in patologom za poslane vzorce. Brez vaših pridnih rok in dobre volje bi tako obsežno nalogo težko sam opravil. Stroške študije smo pokrili iz sredstev programske skupine P4-0092 (Zdravje živali, okolje in varna hrana).

Hvala recenzentoma, prof. dr. Jožetu Gromu in prof. dr. Petru Hostniku, za nasvete in predloge, ki sta mi jih nesebično predajala in me vzpodbujala pri tem, da je to delo nastalo v obliki, kot je pred vami.

Ljubljana, 2015

avtor

MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA SEVOV VIRUSA PRAŠIČJEGA REPRODUKCIJSKEGA IN RESPIRATORNEGA SINDROMA V SLOVENIJI

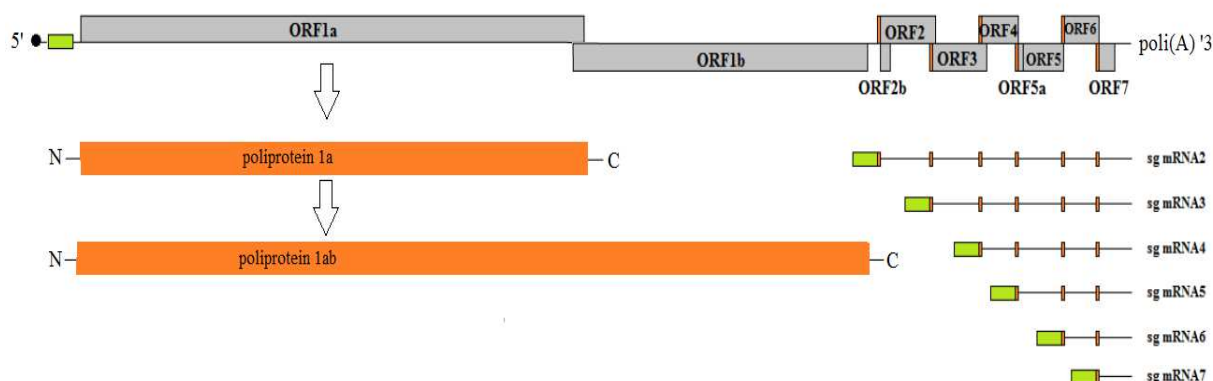
1 NEKATERA IZHODIŠČA, POMEMBNA ZA IZVEDBO ŠTUDIJE

1.1 PRAŠIČJI REPRODUKCIJSKI IN RESPIRATORNI SINDROM (PRRS)

Prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom (PRRS) je ena od najkompleksnejših virusnih bolezní prašičev, ki jo je zelo težavno zatirati. Okužba se hitro širi med rejami in v prašičereji povzroča velike ekonomske škode. Virus PRRS so prvič, skoraj istočasno, dokazali v Evropi in v Združenih državah Amerike med leti 1987 in 1988 (1, 2). Bolezen so pri bolnih prašičih opisovali z različnimi kliničnimi slikami, zato je bolezen v prvih objavah poimenovana z več imeni (angl. mystery swine disease, blue ear disease, porcine endemic abortion and respiratory syndrome – PEARS, swine infertility respiratory syndrome – SIRS,...), kasneje pa se je v strokovni literaturi uveljavil izraz PRRS. Bolezen povzroča RNA virus z ovojnico, ki spada v družino *Arteriviridae*, rod *Arterivirus*.

1.1.1 Organizacija genoma virusa PRRS

Genom predstavlja enojnovijačna pozitivno polarna molekula RNA, ki ima 10 bralnih okvirjev (ORF) in je velikosti okrog 15.000 nukleotidov (nt). Na začetku in koncu genoma sta nekodirajoči regiji (UTR). Tri četrtine genoma obsegata ORF 1a in ORF 1b, ki se prepiseta v dva poliproteina 1a in 1ab, iz katerih nastane 14 nestrukturnih proteinov, pomembnih za razmnoževanje in sestavljanje virusa. Zadnji del genoma kodira osem strukturnih proteinov v prekrivajočih regijah (ORF 2a, ORF 2b, ORF 3, ORF 4, ORF 5, ORF 5a, ORF 6, ORF 7). ORF 2-5 kodirajo glikoproteine membrane (gp 2-5), ORF 6 kodira neglikoziliran protein membrane (M), ORF 7 pa protein nukleokapside (N). ORF 2b, ki se nahaja znotraj regije ORF 2, kodira neglikoziliran protein E, ORF 5a, znotraj ORF 5 pa kodira protein ORF 5a (slika 1). Zaradi velike genetske raznolikosti glikoproteina 5 (ORF 5), njegovega pomena pri virulenci in imunosti je največ genetskih študij izvedenih prav v tej regiji virusnega genoma (1, 3, 4, 5, 6, 7).

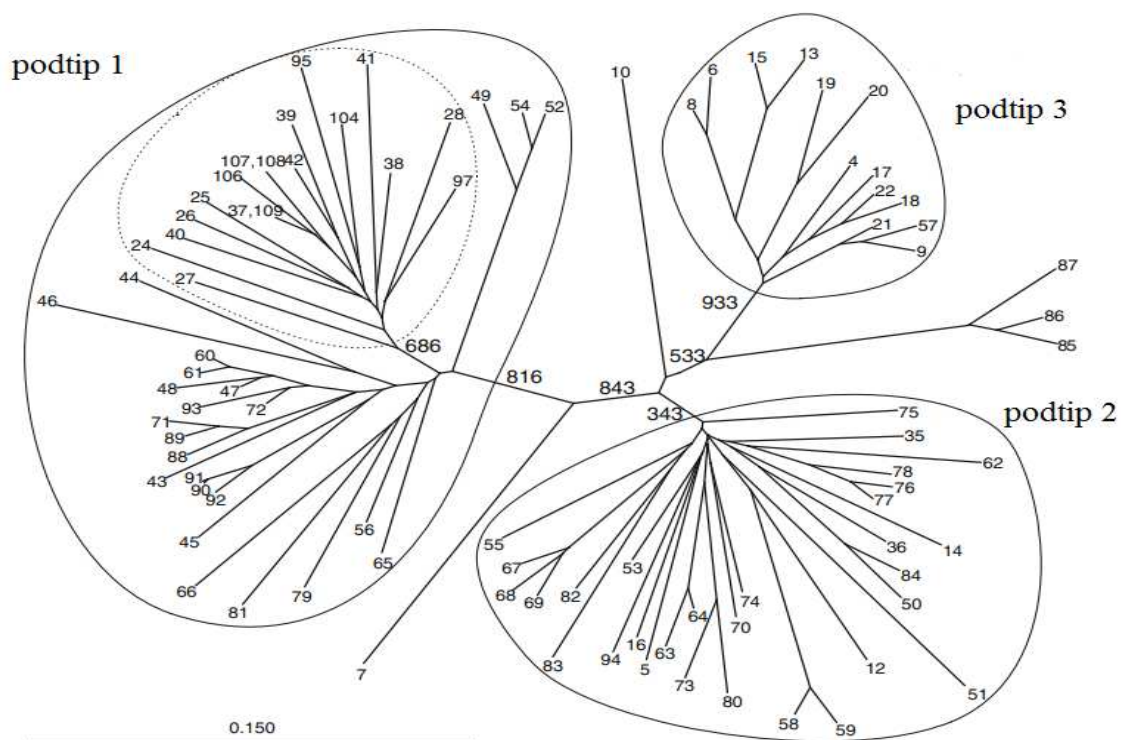


Slika 1: Shematski prikaz organizacije genoma virusa PRRS. Posamezni bralni okvir (ORF) je prikazan z imenom od ORF 1a do ORF 7 v sorazmerni velikosti genoma, v obliki pravokotnikov. ORF 1a in ORF 1b se prepiseta v krajši poliproteina 1a in daljši 1ab. Zeleni kvadratici na 5' posameznega bralnega okvirja predstavljajo skupno vodilno zaporedje, oranžne črtice pa kažejo začetek prepisovanja sporočilnih RNA (mRNA).

1.2 RAZDELITEV SEVOV PRRS V GENOTIP 1 IN GENOTIP 2

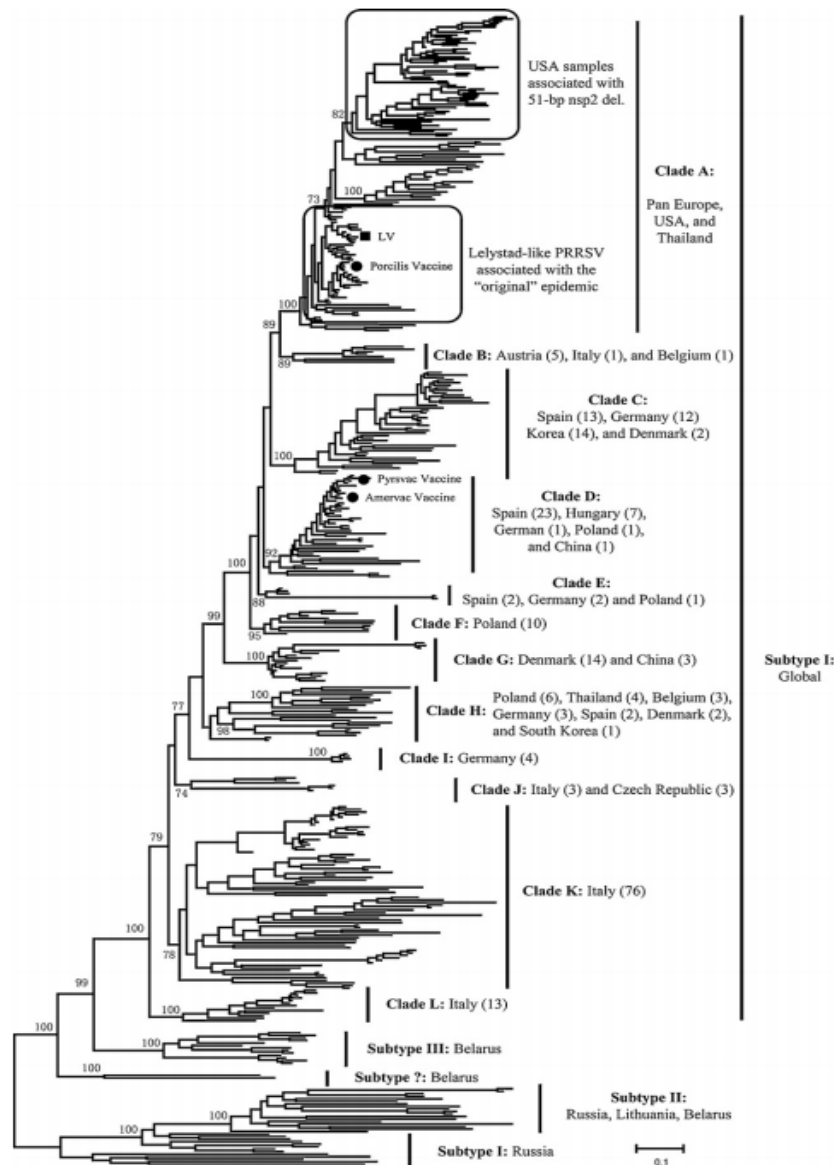
Ob določitvi nukleotidnega zaporedja celotnih genomov evropskega seva PRRS Lelystad in ameriškega seva PRRS VR2332 so raziskovalci prvič ugotovili, da sta ta dva virusa PRRS genetsko zelo različna, genoma sta si med seboj podobna le v 62,1 % od 15.000 nukleotidov. Kaj točno je sprožilo širjenje dveh različnih virusov PRRS okrog leta 1990 v Evropi in Ameriki, še ni jasno. V prvih letih po ugotovitvi bolezni se je domnevalo, da evropski sevi PRRS tvorijo genetsko zelo homogeno skupino virusov, podobnih prvemu izolatu, z imenom Lelystad virus "evropska skupina", za ameriške izolate, ki so bili podobni prvemu izolatu z imenom VR2332, pa se je smatralo, da tvorijo tako imenovano "ameriško skupino". Kasnejši podatki, dobljeni na podlagi primerjave večjega števila nukleotidnih zaporedij iz regije virusnega genoma ORF 5 in ORF 7, sevov PRRS iz evropskih držav (Danske, Italije, Češke, Poljske, Španije, Nemčije, Nizozemske, Belorusije in Slovenije), so pokazali, da v Evropi krožijo zelo različni sevi virusov PRRS (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Veliko genetsko heterogenost sevov PRRS so po letu 1995 začeli ugotavljati tudi v ZDA in Kanadi (12). Po letu 2000 v evropskih državah občasno ugotavljajo tudi "ameriške seve" virusov PRRS, prav tako pa so "evropske seve" dokazali v Ameriki in

ostalnih delih sveta. Na Kitajskem se je leta 2006 pojavil visoko patogeni sev PRRS (angl. high pathogen PRRS, HP-PRRS), ki je se je hitro širil in povzročil visok pogin pri domačih prašičih. Po določitvi celotnega genoma HP-PRRS so ugotovili, da je ta sev genetsko najbolj podoben ameriškim sevom, ki spadajo v genotip 2, ima pa značilno delecijo 30-tih aminokislin v regiji genoma, ki kodira nestrukturni (Nsp2) protein (13). Intenzivno trgovanje s prašiči je glavni razlog za vnos ameriških sevov PRRS v Evropo, "evropske seve" pa ugotavljajo na vseh celinah. Novejša klasifikacija razvršča seve PRRS v genotip 1, prej poimenovana evropska skupina virusov PRRS in v genotip 2, prej poimenovana ameriška skupina (8). Primerjava virusov iz genotipa 1 in genotipa 2 kaže približno 60 % identičnost v nukleotidnem zaporedju med sevi PRRS, znotraj posameznega genotipa pa ugotavljajo do 20 % razlik v zaporedju nukleotidov (14). Filogenetska analiza zahodnoevropskih in vzhodnoevropskih izolatov PRRS je pokazala veliko genetsko heterogenost virusov PRRS, ki krožijo med pozitivnimi rejami, zato lahko evropske viruse PRRS genotipa 1 razdelimo v najmanj tri podtipe (slika 2). V podtip 1 se uvrščajo virusi PRRS ugotovljeni v državah v zahodnem, centralnem in vzhodnem delu Evrope, Azije in Severne Amerike, na območju Rusije ugotavljajo genetsko zelo različne viruse iz vseh treh podtipov genotipa 1, v Belorusiji pa ugotavljajo le seve uvrščene v podtip 3 (8). Razdelitev v tri podtipe 1, 2, in 3 potrjuje tudi različno število aminokislin, ki kodirajo protein nukleokapside (ORF 7) in sicer pri sevih podtipa 1 protein nukleokapside kodira 128 aminokislin, pri sevih podtipa 2 ugotavljajo 125 aminokislin in pri sevih podtipa 3 kodira nukleokapsido 124 aminokislin (15), vendar pa število aminokislin ne služi kot genetski marker. Shi in sodelavci je seve podtipa 1 še dodatno razdelil v 12 različnih klad ali skupin, poimenovanih od A do L, kriterij za razdelitev med posameznimi skupinami pa so razlike v nukleotidnem zaporedju večje od 10 % (slika 3).



Slika 2: Filogenetska primerjava genetsko različnih virusov PRRS genotipa 1, izvedena na podlagi primerjave zaporedja nukleotidov ORF 7 regije virusnega genoma, pri izolatih iz zahodnega, srednjega in vzhodnega dela Evrope. Krog označen pikčasto zajema seve virusov PRRS, ki so jih ugotavljali v državah zahodnega in centralnega dela Evrope, preostale seve so ugotovili v Rusiji in Belorusiji. Predlagana razdelitev v tri podtipe je povzeta po Stadejek in sodelavcih (15).

Podobno kot seve genotipa 1, so tudi seve virusov PRRS genotipa 2 nadalje razdelili v 9 genetskih linij, posamezne nove linije pa so bile določene, če je šlo za več kot 10 % razlike v nukleotidnem zaporedju glede na predhodno ugotovljene linije (16). V letu 2015 je bila objavljena obsežna molekularno epidemiološka študija iz Tajske in jugovzhodne Azije, ki je zajela v primerjavo 967 pozitivnih vzorcev virusov PRRS, ugotovljenih v letih od 2008 do 2013 in so jih sekvencirali v regiji ORF 5 virusnega genoma. Ugotovili so kroženje virusov PRRS iz genotipa 1 in 2, prav tako pa številne skupine in linije znotraj obeh genotipov, kar potrjuje potrebo po nadaljnjem globalnem spremljanju genetske heterogenosti sevov PRRS in sistematičnem dopolnjevanju klasifikacije virusov PRRS z novimi sevi (17).



Slika 3: Prikaz genetske heterogenosti sevov PRRS genotipa 1 v genski banki, filogenetska primerjava je izvedena na celotnem delu genoma, ki kodira ORF 5. Virusi podtipa 1 so nadalje razdeljeni v 12 različnih klad ali skupin, razlika med posameznimi skupinami je večja od 10 %. Zraven posamezne podskupine so prikazane države, v katerih so viruse PRRS ugotovili, v oklepaju pa je navedeno število vzorcev, ki so jih vključili v primerjavo (slika povzeta po 16).

1.3 POJAVLJANJE OKUŽB Z VIRUSI PRRS PO RAZLIČNIH EVROPSKIH DRŽAVAH

Zaradi intenzivnega trgovanja z živimi prašiči med evropskimi državami, so novo bolezen po ugotovitvi na Nizozemskem hitro dokazali v različnih evropskih državah (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 18, 19, 20). Kljub temu so Švedska, Norveška in Švica z natančnim izvajanjem preventivnih ukrepov uspele preprečiti razširitev virusa PRRS znotraj države in so ostale proste bolezni. Naša država je bila prosta bolezni do vstopa Slovenije v Evropsko unijo in je uspešno preprečevala vnos virusa PRRS v neokužene reje s pregledom vseh uvoženih prašičev v karantenah (21). Po letu 2004 se je virus PRRS, zaradi drastičnega povečanja števila uvoženih živih prašičev in opuščanja karanten, vnesel v državo in se potem hitro razširil v številne prašičje reje. Virus PRRS smo v okuženih slovenskih prašičjih rejah prvič uradno dokazali v letu 2009 (22, 23).

1.4 NAČINI PRENOSA VIRUSA PRRS MED REJAMI IN KONTROLA BOLEZNI

Bolezen PRRS je v okuženi reji težko kontrolirati saj se virus lahko v posameznih prašičih ohranja še do 200 dni po okužbi. Večina okuženih prašičev v 3 do 4 tednih pridobi specifična protitelesa in preneha izločati virus PRRS znotraj 60 dni po okužbi (24). Če rejec ne izvaja preventivnih ukrepov, ki preprečujejo vnos virusa PRRS v rejo, se reja okuži. Po okužbi se virus hitro razširi med prašiči znotraj iste reje, s pozitivnimi prašiči pa se virus največkrat širi v druge, še neokužene reje. Najpogostejši vzrok za vnos virusa v rejo je nakup pozitivnih živih prašičev, ki so takrat nosilci virusa PRRS. Virus se lahko vnese v rejo s pozitivnim semenom pri umetnem osemenjevanju. Hitrost širjenja virusa PRRS znotraj reje je odvisna od razporeditve prostorov v hlevu, števila prašičev, ločene vzreje različnih kategorij prašičev, "all in-all out" sistema vzreje in drugih aktivnosti rejca. Pomemben dejavnik za prenos in ohranjanje virusa v prašičji reji je človek, ki lahko med rednim oskrbovanjem in izvajanjem različnih ukrepov pri prašičih virus PRRS prenese z obleko, obutvijo in uporabo okužene opreme (24). Vsi ti dejavniki tveganja se različno izvajajo in se razlikujejo od reje do reje ter lahko prispevajo k temu, da neka reja ostane neokužena, druga pa se okuži in dolgo časa ohranja virus PRRS v reji. Z natančnim izvajanjem karantene in drugih preventivnih ukrepov je mogoče ohraniti neokužene reje prašičev, vsekakor pa je dolgoročno vzdrževanje negativne reje odvisno tudi od okuženosti prašičjih rej v bližnji okolici in v regijah, od koder se prašiče uvažja. Pri nas smo zabeležili tudi primere, ko nam je

okužene reje uspelo sanirati in potem ohraniti zdrave prašiče, neokužene z virusom PRRS, skozi daljše časovno obdobje (25).

1.5 NAMEN IN UPORABNOST MOLEKULARNO EPIDEMIOLOŠKIH ŠTUDIJ

Z molekularno epidemiološkimi študijami virusa PRRS poskušamo pojasniti dogajanje v okuženi reji, načrtovati ustreznejše preventivne ukrepe in natančneje ovrednotiti ustreznost in uspešnost sanacije določene reje. Molekularno epidemiološke študije so izvedene na podlagi primerjave nukleotidnega zaporedja kratkih ali daljših odsekov virusnega genoma ugotovljenih virusov PRRS znotraj iste reje ali med različnimi okuženimi rejami (24, 26). Podatke lahko primerjamo tudi s rezultati izvedenih študij v sosednjih pokrajinah ali zelo oddaljenih državah, iz katerih so dostopne baze podatkov. Večje kot je število podatkov, ki jih primerjamo med seboj, natančnejša je študija. Pomembni podatki, ki nam pomagajo pri interpretaciji rezultatov so datum in leto vzorčenja, podatki o lokaciji okužene reje in o številu primerjanih vzorcev iz iste ali različnih rej. Molekularna epidemiologija nam lahko pomaga, da pojasnimo nekatere dogodke, npr. če ne dosežemo pričakovane učinkovitosti zatiranja bolezni po cepljenju. Tudi če nam manjka določeni ključni podatek, npr. dokaz protiteles po cepljenju, lahko s primerjavami virusnih sevov ocenimo ustreznost nekega cepiva. S primerjavo nukleotidnih zaporedij dobimo podatek o identičnosti oziroma različnosti primerjanih sevov in na podlagi tega lahko dokažemo ali je nek sev virusa PRRS povzročil okužbo ene ali večjega števila rej. Po vnosu virusa PRRS v neokuženo rejo, se isti sev virusa PRRS razširi med prašiči. Pri primerjavi nukleotidnega zaporedja virusov PRRS znotraj iste reje posledično lahko ugotavljamo pri ugotovljenih virusih PRRS iz različnih prašičev, identično zaporedje nukleotidov. Pri okužbah z virusom PRRS je potrebno upoštevati, da se v okuženem prašiču virus hitro razmnožuje v limfatičnem tkivu, predvsem pa v pljučnih makrofagih, kar povzroči slab imunski odgovor prašiča. Virus se v okuženem prašiču zato več tednov razmnožuje, kar ima za posledico veliko število kopij virusa in to povečuje možnosti nastanka večjega števila variant virusa, ter poveča možnosti prenosa istega virusa na še neokužene prašiče. Med pomnoževanjem virusa PRRS prihaja v genomu virusa do naključnih mutacij. Objavljen podatek za regijo ORF 7 pokaže, da se v genomu virusa PRRS vgradijo napačni nukleotidi s frekvenco $3,8 \times 10^{-3}$ na leto, saj virusna polimeraza RNA nima sposobnosti

samopopravljalnega mehanizma ob vgraditvi napačnega nukleotida (27). Tako nastajajo nove variante virusnega seva, ki pa imajo še vedno zelo podobno zaporedje nukleotidov, kot izvorni sev. Večje kot je število prašičev, v katerih se je razmnoževal določen sev virusa in daljše kot je spremljano časovno obdobje, večje razlike lahko pričakujemo med primerjanimi pozitivnimi vzorci (26). Molekularno epidemiološke študije nam omogočajo primerjave različnih pozitivnih vzorcev in sledenje spremembam v genomu virusa PRRS. Seveda pa brez odvzetih vzorcev, v katerih dokažemo prisotnost virusa PRRS in določimo zaporedje nukleotidov, ne moremo izvesti molekularno epidemiološke študije. Molekularno epidemiološke študije lahko razjasnijo nekatera dejstva, ki so pomembna za razumevanje pojavljanja, širjenja, ohranjanja in vplivajo na uspešnost zatiranja PRRS v posamezni reji, regiji ter pojasnijo tudi prenose virusov PRRS med različnimi državami.

1.6 PODATKI ZA IZVEDBO MOLEKULARNO EPIDEMIOLOŠKE ŠTUDIJE PRRS

V nadaljevanju so predstavljeni rezultati molekularno epidemiološke študije, ki pojasnjujejo pojavljanje različnih sevov virusov PRRS v slovenskih prašičjih rejah med leti 2009 in 2015. Podatke za izvedbo študije smo pridobili iz določitve nukleotidnega zaporedja v dolžini 258 nukleotidov posameznih pozitivnih vzorcev v regiji ORF 7 virusnega genoma, v pozitivnih rejah, v katerih smo dokazali in tipizirali viruse PRRS. Po številu vključenih virusnih sevov je izvedena molekularno epidemiološka študija največja tovrstna študija pri nas. Na podlagi 394 virusnih sevov, ki smo jih ugotovili v 178 različnih prašičjih rejah, smo pridobili številne podatke o pojavljanju različnih virusnih sevov v okuženih prašičjih rejah, ki jih pred tem nismo poznali. Primer omenjene študije študentu podaja tudi nekatera izhodišča o uporabnosti molekularno epidemioloških študij, ki jih podobno, kot je predstavljeno v tej študiji, lahko uporabimo za druge povzročitelje bolezni.

2 UGOTAVLJANJE OKUŽENIH REJ S PRRS

Za dobro molekularno epidemiološko študijo je pomembno, da zberemo čim več pozitivnih vzorcev iz iste reje in iz različnih rej, ki jih lahko v nadaljevanju primerjamo med seboj. V študijo lahko vključimo le tiste viruse PRRS, ki smo jih uspeli dokazati, zato je izbira občutljive in specifične metode za dokaz virusa PRRS prvi pomemben del študije, s katerim lahko vplivamo na rezultate. Virusom PRRS najprej v regiji ORF 5 ali ORF 7 določimo nukleotidno zaporedje in jih primerjamo med seboj. V primerjavo vključimo tudi podatke virusov iz predhodno ugotovljenih pozitivnih rej ali virusov PRRS ugotovljenih v drugih državah. Med seboj lahko primerjamo le zaporedje iste regije virusnega genoma in vključimo tiste podatke, ki jih imamo takrat na razpolago, zato je kvaliteta izvedene študije odvisna tudi od števila vključenih vzorcev. Vsekakor je potrebno poudariti, da se je cena določanja nukleotidnega zaporedja (sekvenciranja) v kratkem odseku virusnega genoma v zadnjih letih zelo znižala, tako da tovrstne študije postajajo v bolj razvitih državah vse bolj dostopne in vse pogosteje uporabljene tudi v veterinarski medicini.

2.1 VZORČENJE V POSAMEZNI REJI

V reji, za katero sumimo, da se je okužila z virusom PRRS, lahko vzorčimo prašiče vseh starostnih skupin in kategorij. Dokaz virusa PRRS v okuženi reji je neposredna potrditev prisotnosti povzročitelja bolezni. Ob prvem vnosu virusa PRRS v rejo se odvzame vzorce pri živalih, ki so klinično prizadete in kažejo enega ali več znakov bolezni: neješčnost, težko dihanje, povišano telesno temperaturo, abortirajo, kotijo mrtvorrojene pujske in beležijo povišano smrtnost pri pujskih. Pri živih, klinično prizadetih ali zdravih prašičih, se odvzame vzorec krvi, brez antikoagulanta. V posamezni reji lahko vzorčimo več prašičev in vzorčenja ponavljamo v krajšem ali daljšem časovnem obdobju ter potem izvedemo primerjavo ugotovljenih virusov iz iste reje. V zadnjih letih postaja za dokaz prisotnosti virusa zelo priročna in ekonomsko sprejemljivejša tudi uporaba skupnega vzorca odvzete slin pri prašičih v posameznem boksu. Pri poginjenih prašičih se za dokaz virusa PRRS najpogosteje odvzame pljuča, vranico, ledvica in bezgavke.

2.2 NAJPOGOSTEJŠA VRSTA VZORCEV ZA DOKAZ VIRUSA PRRS

Za dokaz virusa PRRS v okuženi reji so najprimernejši vzorci za laboratorijsko preiskavo serum, pljuča, srce, ledvice, bezgavke, vranica, timus in slina (24, 25, 28).

2.3 RAZLIČNE METODE ZA DOKAZ VIRUSA PRRS

Glede na to, da imajo metode različno občutljivost in specifičnost, bi bilo idealno, da bi v laboratoriju na vseh vzorcih v preiskavi uporabili več različnih metod. Zaradi časovnih in cenovnih omejitev pa v laboratoriju za dokaz virusa PRRS največkrat uporabimo le predhodno preizkušene in že validirane metode.

2.3.1 Izolacija virusa PRRS

Virus PRRS je zelo občutljiv na temperaturne spremembe in v okolju hitro izgubi kužnost, zato je za uspešno izolacijo virusa na celični kulturi pomembno, da je material, ki ga prejmemo v laboratorij, dostavljen v najkrajšem možnem času, ter da je poslan čim bolj svež, v hladilni torbi, ohlajeni na + 4 °C. Za izolacijo virusa na celični kulturi lahko uporabljamo prašičje alveolarne makrofage ali celično linijo (MARC 145) ledvic opice (2). Znana je različna občutljivost posameznih vrst celic za različne virusne seve, zato izolacija virusa PRRS ne spada med najbolj občutljive metode za dokaz virusa v okuženi reji. Pridobitev čistega izolata virusa PRRS pa je, kljub stroškom in težavnosti uspešne izolacije, v posameznih primerih še vedno pomembna, saj z izolatom lahko nadalje izvedemo nekatere dodatne preiskave (virus nevtralizacijski test, določanje nukleotidnega zaporedja celotnega genoma), ki nam lahko podajo dodatne podatke o značilnostih virusa PRRS v okuženi reji.

2.3.2 Dokaz virusa PRRS z molekularnimi metodami

Molekularne metode v zadnjem desetletju postajajo vse bolj uporabne tudi v diagnostiki PRRS. Novejše metode so hitre, občutljive in omogočajo pregled velikega števila vzorcev. Za testiranje lahko uporabimo različne vrste vzorcev, v katerih dokazujemo prisotnost nukleinske kisline virusa PRRS. Genetsko zelo različni in vedno novo porajajoči se sevi virusov PRRS iz genotipa 1 in 2 predstavljajo veliko težavo v diagnostičnih laboratorijih, saj zmanjšujejo specifičnost in

občutljivost različnih, že uvedenih in preizkušenih molekularnih metod. Zato je potrebno te metode neprestano posodablјati, pred uporabo nove molekularne metode pa le te validirati na pozitivnih sevih PRRS in vzorcih, ki jih lahko v laboratoriju iz neke geografske regije pričakujemo (29). Večina molekularnih testov ima za tarčno mesto pomnoževanja virusnega genoma zelo ohranjeno regijo virusnega genoma ORF 7, lahko pa tudi katerokoli drugo regijo virusnega genoma. Nekateri molekularni testi že omogočajo hkratno pomnoževanje več različnih tarčnih regij virusnega genoma in na ta način se poveča občutljivost metode. Specifični dokaz prisotnosti nukleinske kisline virusa PRRS v vzorcu je šele prvi del preiskave, ki ga moramo uspešno izvesti, če želimo pozitivne vzorce nato primerjati v molekularno epidemiološki študiji.

2.3.2.1 Dokaz virusa s klasično metodo RT-PCR

Prisotnost virusnega genoma v preiskovanem vzorcu lahko dokažemo z različnimi izpeljavami metode reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (angl. reverse transcription and polymerase chain reaction - RT-PCR) (30). Iz produkta PCR posameznega vzorca lahko z direktnim določanjem nukleotidnega zaporedja dobimo podatke, ki jih v nadaljevanju uporabimo za molekularno epidemiološko študijo.

V naši študiji smo uporabili validirano metodo RT-PCR, ki omogoča dokazovanje virusov PRRS iz genotipa 1 in 2 v regiji ORF 7 virusnega genoma PRRS (23). V preiskavi smo uporabili vzorce serumov, odvzetih od živih prašičev in različnih organov poginjenih prašičev. Iz vzorcev organov (pljuča, bezgavke, vranica, ledvice) smo najprej pripravili suspenzijo vzorca. Iz posameznih vzorcev smo nato izvedli izolacijo RNA s komercialnim kompletom (QIAamp[®] viral RNA Mini, Qiagen Nemčija) po navodilih proizvajalca kita. Za izvedbo RT-PCR smo pripravili reakcijsko mešanico z reagenti kompleta QIAGEN[®] OneStep RT-PCR tako, da smo zmešali vodo, RT-PCR pufer, dNTP mešanico, par oligonukleotidnih začetnikov P1 in P2 (30), RT-PCR mešanico encima in na koncu smo mešanici dodali izolirano RNA preiskovanega vzorca. V vsako izvedbo metode RT-PCR smo vključili tudi pozitivno in negativno kontrolo. Pomnoževanje nukleinske kisline je potekalo v avtomatskem termopomnoževalniku. Za določitev specifične velikosti produkta RT-PCR (291 nt za genotip 1 in 301 nt za genotip 2 virusa PRRS) smo uporabili metodo elektroforeze v 1,8 % agaroznem gelu. Posamezne vzorce RT-PCR smo po

pomnoževanju nanesti v žepke agaroznega gela skupaj z označevalcem velikosti produktov ter vključili elektroforezo. Rezultate smo odčitali na UV transiluminatorju in sliko dokumentirali z napravo za slikanje gela.

2.3.2.2 Dokaz virusa z metodo RT-PCR v realnem času

Metoda RT-PCR v realnem času je različica metode RT-PCR, pri kateri poleg oligonukleotidnih začetnikov uporabimo še eno ali več specifičnih sond (23, 29, 31, 32). Metoda omogoča pregled velikega števila vzorcev, je hitra, specifična in občutljiva. Na trgu so že dostopni številni komercialni testi, ki omogočajo dokazovanje različnih virusov PRRS, z nekaterimi pa je mogoče tudi hitro razlikovati viruse PRRS genotipa 1 in 2 (31, 32). Posameznih sevov PRRS pa komercialni testi ne zaznajo, kar potrjuje, da na trgu trenutno ni molekularnega testa, ki bi imel 100 % občutljivost in specifičnost (23, 29). Različne komercialne metode RT-PCR v realnem času smo uporabili za pregled preiskovanih rej, kasneje pa smo za potrebe določanja nukleotidnega zaporedja pozitivne vzorce dokazali še s klasično metodo RT-PCR opisano v prejšnji točki (29).

2.4 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA POZITIVNIM VZORCEM PRRS

Določanje nukleotidnega zaporedja smo izvedli na 394 pozitivnih vzorcih virusov PRRS, ugotovljenih v 178 različnih prašičjih rejah, v katerih smo s klasično metodo RT-PCR potrdili prisotnost nukleinske kisline virusa PRRS. Uporabili smo metodo direktnega sekveniranja produktov PCR po Sangerju. Posamezne produkte pomnoževanja v ORF 7 regiji virusnega genoma v velikosti okrog 300 nukleotidov smo izrezali iz gela in jih prečistili s komercialnim reagentom. Vsakemu pozitivnemu vzorcu smo določili nukleotidno zaporedje v obe smeri (angl. forward and reverse) z uporabo istih oligonukleotidnih začetnikov P1 in P2, ki smo jih uporabili v metodi RT-PCR. Za sekvenčno reakcijo smo uporabili encim Taq polimerazo-DNA in s fluorescentnimi barvili označene dideoxy nukleotide (ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, PE Biosystems, ZDA). Posamezna nukleotidna zaporedja smo analizirali z avtomatskim sekvenatorjem ABI PRISM 310 Genetic Analyser (PE Biosystems, ZDA).

2.5 ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ IN PRIMERJAVA MED VIRUSI PRRS

Za obdelavo rezultatov po sekvenciranju smo uporabili paket programov Lasergen (DNASTAR, ZDA), ki nam omogočajo natančno analizo posameznega nukleotidnega zaporedja. V omenjenem programu smo poravnali obe nukleotidni zaporedji istega vzorca, ki smo ju dobili pri sekveniranju z dvema začetnima nukleotidoma (P1 in P2). Primerjava zaporedij 394 pozitivnih vzorcev v dolžini 258 nukleotidov je bila izvedena v območju virusnega genoma PRRS regije ORF 7, od mesta 14.673 do 14.927, glede na referenčni sev PRRS Lelystad (številka v genski banki, M96262). Posamezne pozitivne vzorce iz določene reje smo označili s pripadajočo zaporedno številko reje (od 1 do 178) in imenom vzorca, da smo lažje sledili primerjavam vzorcev iz istih rej in prikazom vzorcev iz različnih rej. Vsak vzorec smo označili tudi z letnico ugotovitve virusa PRRS v okuženi reji (zadnja številka).

Za urejanje posameznega nukleotidnega zaporedja smo uporabljali program BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), s katerim smo lahko primerjali nukleotidno zaporedje, ugotovljeno pri naših vzorcih, z nukleotidnimi zaporedji, ki so dostopna v genski banki (GenBank). S programom BLAST smo preverili prisotnost morebitne insercije, delecije ali zamenjave posameznih nukleotidov ter ugotavljali odstotek homologije med našimi in primerjanimi zaporedji v genski banki podatkov. Urejeno zaporedje smo shranili v programu EditSeq pod zaporedno številko reje in imenom vzorca.

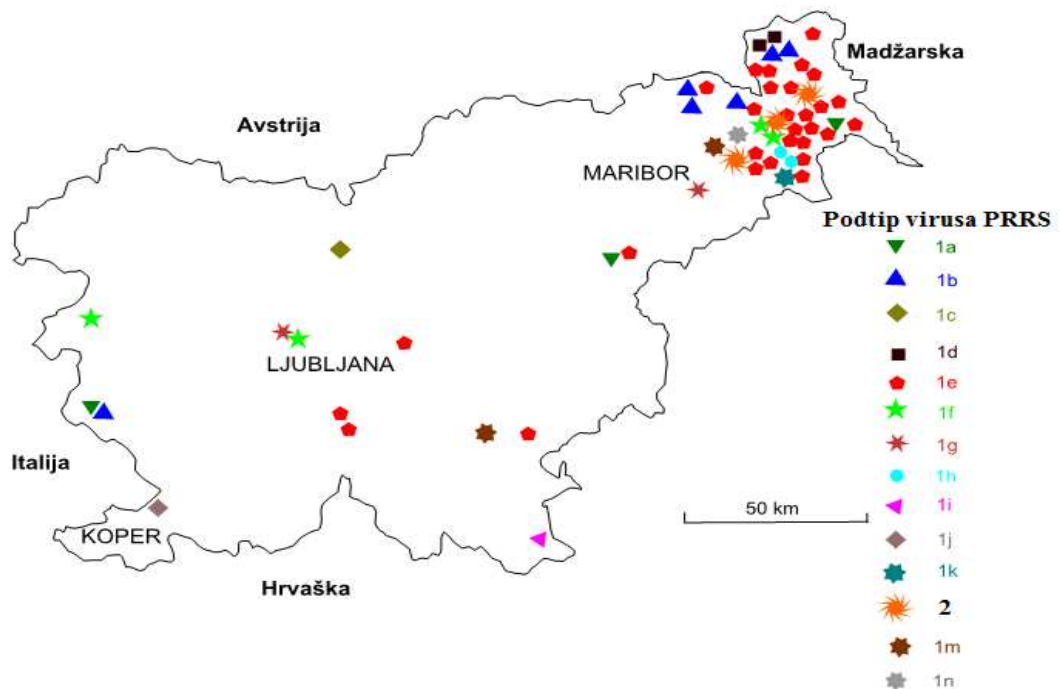
Program MegAlignTM (Lasergen, DNASTAR, ZDA) omogoča poravnavo dveh ali več izbranih zaporedij nukleotidov ali aminokislin virusov PRRS. Program grafično prikaže filogenetsko drevo - sorodnost primerjanih nukleotidnih zaporedij ali zaporedja aminokislin in v tabeli prikaže odstotke podobnosti in različnosti med njimi. Za poravnavo zaporedij smo uporabili metodo Clustal W in posamezne vzorce prikazali na filogenetskem drevesu skupaj z imenom reje.

3 MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA SEVOV VIRUSOV PRRS, DOKAZANIH V SLOVENIJI V LETIH OD 2009 DO 2015

Po prvi ugotovitvi pozitivnih rej prašičev v letu 2009 smo v nadaljevanju do leta 2015 sproti vse viruse PRRS tipizirali z določanjem nukleotidnega zaporedja in s primerjavo zaporedja 258 nt spremljali pojavljanje različnih sevov v okuženih slovenskih prašičjih rejah. Podatke smo vsako posamezno leto nadgrajevali z novimi spoznanji in potrjevali že predhodne ugotovitve. Spremljali smo trend pogostosti pojavljanja različnih sevov PRRS v okuženih rejah v Sloveniji v posameznem letu, posamezne reje pa smo spremljali tudi več let zaporedoma. V nadaljevanju bomo posamezne podatke predstavili na značilnih primerih, ki podajajo najpomembnejše odgovore in odražajo uporabnost izvedene molekularno epidemiološke študije. Namen izvedene študije je bil, da dobimo odgovore na naslednja vprašanja: ali spada posamezni ugotovljen virus v genotip 1 ali 2, se je reja okužila z virusom PRRS s sevom iz tujine ali s sevom, ki je razširjen v Sloveniji, se je posamezni sev virusa PRRS v okuženih rejah pojavljal pogosteje kot drugi sevi, kakšna je genetska stabilnost virusa v nekem časovnem obdobju znotraj iste reje, kakšna je različnost virusov znotraj iste reje, kakšna je uporabna vrednost cepljenja.

3.1 GENETSKA RAZNOLIKOST SEVOV PRRS UGOTOVLJENIH V SLOVENIJI

V obdobju od leta 2009 do 2015 smo genetsko tipizirali 394 PRRS pozitivnih vzorcev, ki so bili odvzeti iz 178 okuženih prašičjih rej, pri prašičih različnih kategorij (Tabela 1). Pozitivne reje se nahajajo na celotnem območju Slovenije, največje število okuženih rej s PRRS je bilo ugotovljenih v regiji Pomurja in Štajerske, v teh dveh regijah se nahaja tudi največje število prašičjih rej v Sloveniji (Slika 4).

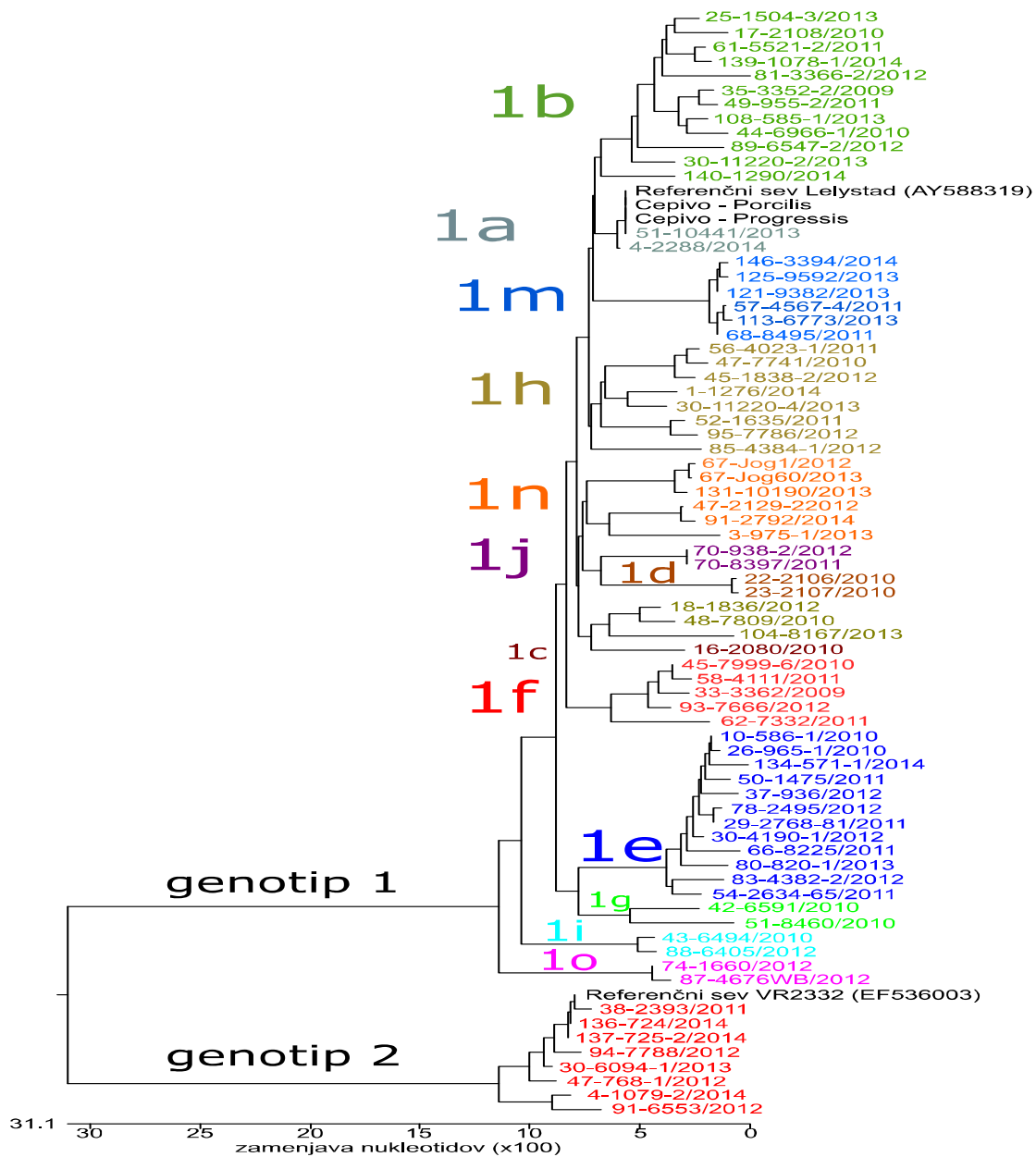


Slika 4: Prikaz lokacij okuženih rej z virusom PRRS in različnih podtipov virusov PRRS v pozitivnih rejah, ki smo jih ugotovili v Sloveniji v letih od 2009 do 2012.

Na podlagi nukleotidnih zaporedij lahko potrdimo, da so se reje okužile z uvozom okuženih prašičev (semena) iz različnih evropskih držav, prav tako pa smo dokazali širjenje ugotovljenih sevov virusa PRRS med slovenskimi rejami. V spremljanem 7-letnem obdobju ugotavljamo veliko genetsko raznolikost virusov PRRS, večina pozitivnih vzorcev spada v genotip 1. Znotraj genotipa 1 smo v Sloveniji ugotovili prisotnost 14 podtipov virusov PRRS, ki smo jih označili s črkami od 1a do 1o (Slika 5, Tabela 1). Razvrstitev ugotovljenih virusov PRRS v posamezne podtipe temelji na podlagi umestitve pozitivnih vzorcev na ločene veje filogenetskega drevesa, med posameznimi podtipi pa v primerjani regiji ORF 7 (primerjava 258 nt) ugotavljamo do 16,3 % razlik v nukleotidnem zaporedju.

Tabela 1: Prikaz skupnega števila virusov PRRS in okuženih rej s posameznim podtipom virusa PRRS v letih od 2009 do 2015* (*zbrani podatki do 1. julija 2015) za Slovenijo. Uvrstitev virusov v posamezni podtip je izvedena na podlagi primerjave nukleotidnih zaporedij 394 pozitivnih vzorcev, ki smo jih ugotovili v 178 različnih pozitivnih rejah. 372 pozitivnih vzorcev virusov PRRS se je uvrstilo v 14 različnih podtipov genotipa 1 (označeni s podtipi od 1a do 1o), 22 pozitivnih vzorcev iz 12 rej pa spada v genotip 2 (označeni z oznako 2).

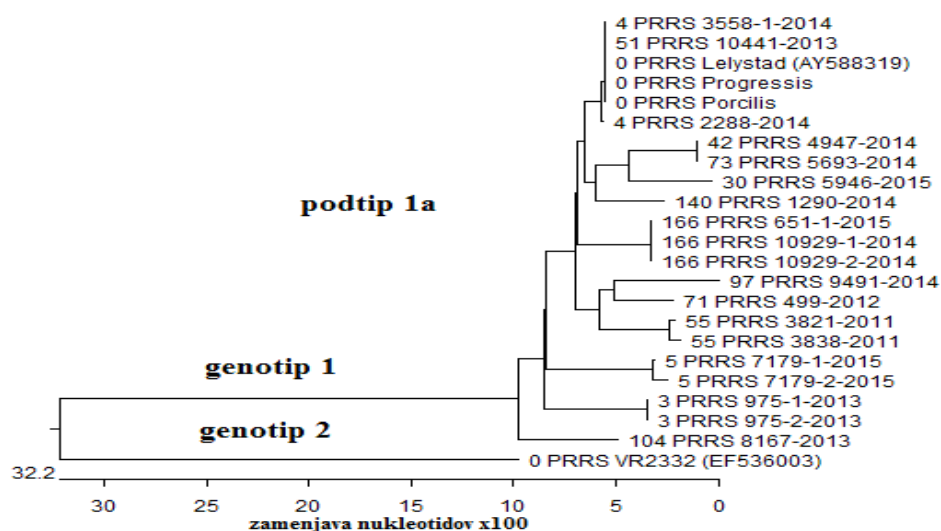
| Podtip Leto | 1a | 1b | 1c | 1d | 1e | 1f | 1g | 1h | 1i | 1j | 1k | 1m | 1n | 1o | 2 |
|----------------|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 2009 | 0 | 2 | 0 | 0 | 12 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2010 | 0 | 4 | 1 | 2 | 32 | 5 | 2 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2011 | 2 | 6 | 1 | 0 | 33 | 3 | 0 | 4 | 0 | 2 | 1 | 5 | 1 | 0 | 4 |
| 2012 | 1 | 12 | 3 | 0 | 28 | 2 | 0 | 5 | 1 | 5 | 0 | 7 | 4 | 2 | 6 |
| 2013 | 4 | 12 | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 20 | 3 | 0 | 2 |
| 2014 | 8 | 10 | 0 | 0 | 7 | 2 | 0 | 1 | 0 | 12 | 0 | 28 | 0 | 0 | 6 |
| 2015* | 3 | 1 | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 9 | 0 | 0 | 4 |
| Skupaj | 18 | 47 | 6 | 2 | 140 | 14 | 2 | 12 | 4 | 29 | 1 | 69 | 8 | 2 | 22 |
| Rej | 13 | 33 | 4 | 2 | 67 | 11 | 2 | 7 | 3 | 22 | 1 | 49 | 2 | 2 | 12 |



Slika 5: Filogenetsko drevo prikazuje različne podtipse virusov PRRS, ki smo jih od leta 2009 do leta 2015 ugotavljali v Sloveniji. Primerjava je izvedena na podlagi 258 nukleotidov regije ORF 7 virusnega genoma. Posamezni pozitivni vzorci virusov PRRS so na drevesu prikazani z zaporedno številko reje, imenom vzorca in letnico ugotovitve pozitivnega vzorca. Primer pozitivnega vzorca virusa PRRS z oznako "91-6553/2012": 91 - zaporedna številka reje 91, 6553 - je ime pozitivnega vzorca, /2012 - pozitivni vzorec virusa PRRS, ugotovljen v letu 2012.

3.1.1 Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1a

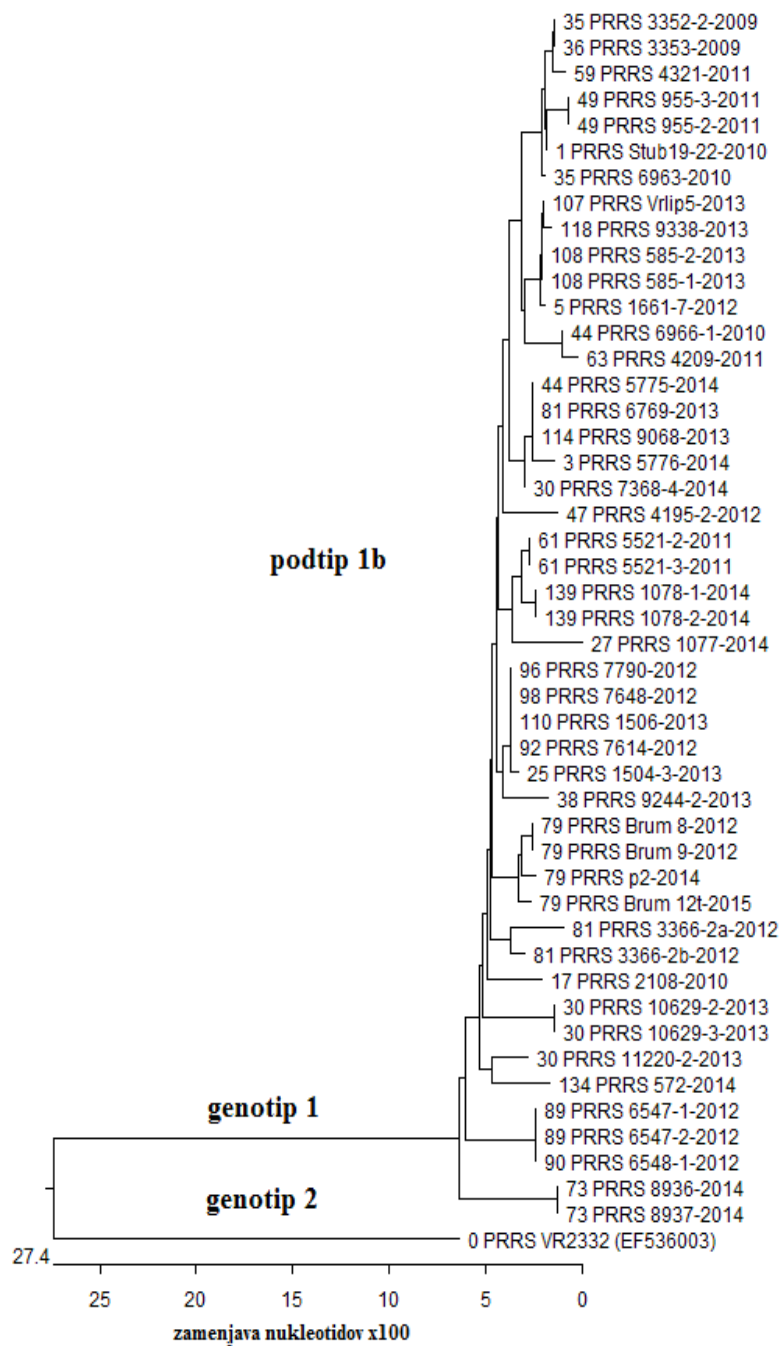
Znotraj podtipa 1a smo uvrstili 19 pozitivnih vzorcev, dokazanih v pozitivnih rejah, v letih od 2011 do 2015. Vzorce podtipa 1a smo ugotovili v 13 različnih rejah, med seboj pa imajo od 87,2 do 100 % identičnost v nukleotidnem zaporedju (slika 6). Primerjava 19 pozitivnih vzorcev podtipa 1a v dolžini 258 nt je pokazala, da so nekateri ugotovljeni pozitivni vzorci PRRS posledica cepljenja. Zaradi uporabe cepljenja v reji proti PRRS, s cepivom Porcilis ali Progressis (obe cepivi vsebujeta sev PRRS Lelystad), smo cepnemu virusu PRRS identične seve ugotovili v reji 4 in reji 51 (od 99,6 do 100 % identičnost nukleotidov s cepnim sevom), v vseh ostalih rejah pa smo ugotovili divje seve PRRS, ki spadajo v isti podtip 1a, kot cepni virus. Velika genetska različnost virusov PRRS (do 12,8 % razlik), ki smo jo ugotovili znotraj podtipa 1a, je v Sloveniji posledica vnosa virusov PRRS iz najmanj 10 različnih virov okužbe. V rejah 42 in 73 smo v letu 2014 ugotovili isti sev virusa, kar je lahko posledica okužbe med rejama ali posledica vnosa virusa v reji iz istega vira okužbe. V kolikor smo v isti reji tipizirali večje število pozitivnih vzorcev, smo ugotovili od 99,2 do 100 % identičnost zaporedja pri primerjanih pozitivnih vzorcih (na primer reje 3, 5 in 166).



Slika 6: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz podtipa 1a, skupaj z referenčnim sevom Lelystad in VR2332.

3.1.2 Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1b

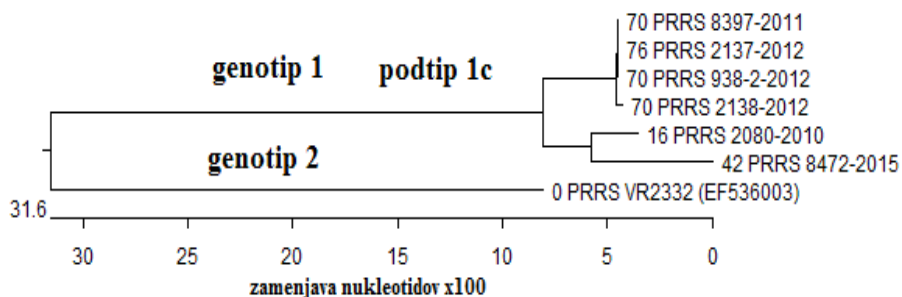
V letih od 2009 do 2015 smo viruse PRRS, ki so se uvrstili v podtip 1b, ugotovili v 47 pozitivnih vzorcih, odvzetih v 33 različnih rejah. Pri primerjavi 47 virusov PRRS znotraj podtipa 1b ugotavljamo od 91,5 do 100 % identičnost nukleotidov, na podlagi razvrstitve na filogenetskem drevesu pa lahko zaključimo, da so se te reje okužile iz najmanj 17 različnih virov okužbe, po vsej verjetnosti z uvozom prašičev (slika 7). Po vnosu virusov podtipa 1b v našo državo smo dokazali tudi širjenje posameznega seva virusa med našimi rejami. Prav tako lahko na podlagi dobljenih rezultatov domnevamo, da so se v letih od 2009 do 2011 reje 1, 35, 36, 49 in 59 v Sloveniji med seboj okužile z istim sevom virusa PRRS podtipa 1b. Podobno so se med seboj okužile reje 5, 107, 108 in 118, če pa upoštevamo letnico ugotovitve virusa v posamezni reji, pa je bila reja 5, okužena v letu 2010, vir okužbe za ostale tri reje, v katerih smo virus PRRS dokazali v letu 2011. Reja 44, okužena v letu 2010, je bila vir okužbe za rejo 63, v kateri smo pozitivne vzorce dokazali v letu 2011. Na podlagi topologije na filogenetskem drevesu lahko podobno sklepamo, da so se reje 3, 30, 44, 81, 114 medsebojno okužile, prav tako lahko podobno zaključimo za reje 25, 92, 96, 98 in 110. Podatka o morebitnem trgovanju med prašičjimi rejami nismo pridobili ali načrtno zbirali, sklepamo pa lahko, da bi takšni podatki dodatno potrdili rezultate, ki smo jih dobili s filogenetsko analizo. Vsekakor je vsakoletno pojavljanje in uvažanje vedno novih sevov podtipa 1b v Slovenijo odraz, da so različni sevi PRRS podtipa 1b zelo razširjeni tudi v evropskih državah, iz katerih uvažamo prašiče.



Slika 7: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz podtipa 1b, skupaj z referenčnim sevom VR2332.

3.1.3 Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1c

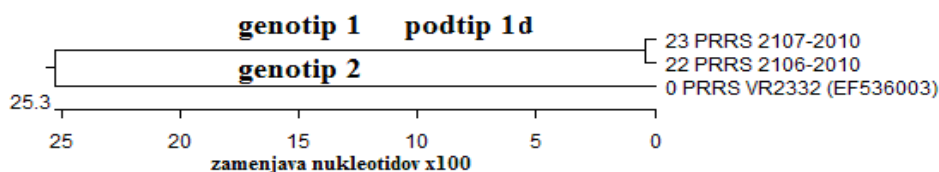
Šest pozitivnih vzorcev virusov PRRS je vsebovalo viruse uvrščene v podtip 1c, med virusi znotraj podtipa 1c pa ugotavljamo od 89,1 do 100 % identičnost v nukleotidnem zaporedju. Viruse podtipa 1c smo ugotovili v 4 različnih rejah. Na podlagi razlik lahko sklepamo, da so se v našo državo vnesli trije različni sevi virusa iz podtipa 1c, iz treh različnih virov okužbe. Prvič smo podtip 1c ugotovili v letu 2010 v reji 16 (slika 8). V rejo 70 (občina Sveti Jurij ob Ščavnici) se je v letu 2011 vnesel nov sev virusa iz podtipa 1c, reja 70 pa je v letu 2012 po vsej verjetnosti bila vir okužbe za rejo 76 (občina Puconci), med virusi PRRS obeh rej smo ugotovili 99,6 % identičnost nukleotidnega zaporedja. Sev virusa PRRS ugotovljen v reji 16 se razlikuje za 10,9 % od seva ugotovljenega v reji 70, kar je dokaz, da gre dva različna seva. V letu 2015 smo sev virusa PRRS iz podtipa 1c ugotovili še v reji 42, ki pa se od predhodno dveh ugotovljenih sevov razlikuje za 7,4 %, kar potrjuje, da gre za vnos novega seva virusa PRRS iz podtipa 1c v Slovenijo.



Slika 8: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz podtipa 1c, skupaj z referenčnim sevom VR2332.

3.1.4 Okuženi reji s sevi virusov PRRS iz podtipa 1d

V letu 2010 smo v rejah 22 in 23 ugotovili neobičajni sev virusa PRRS, uvrščen v podtip 1d, ki ga potem nismo ugotovili več v nobeni drugi reji. Pozitivna vzorca iz rej 22 in 23 imata 99,6 % identičnosti nukleotidov, kar potrjuje da sta se reji okužili med seboj, oziroma iz istega vira okužbe (slika 9).

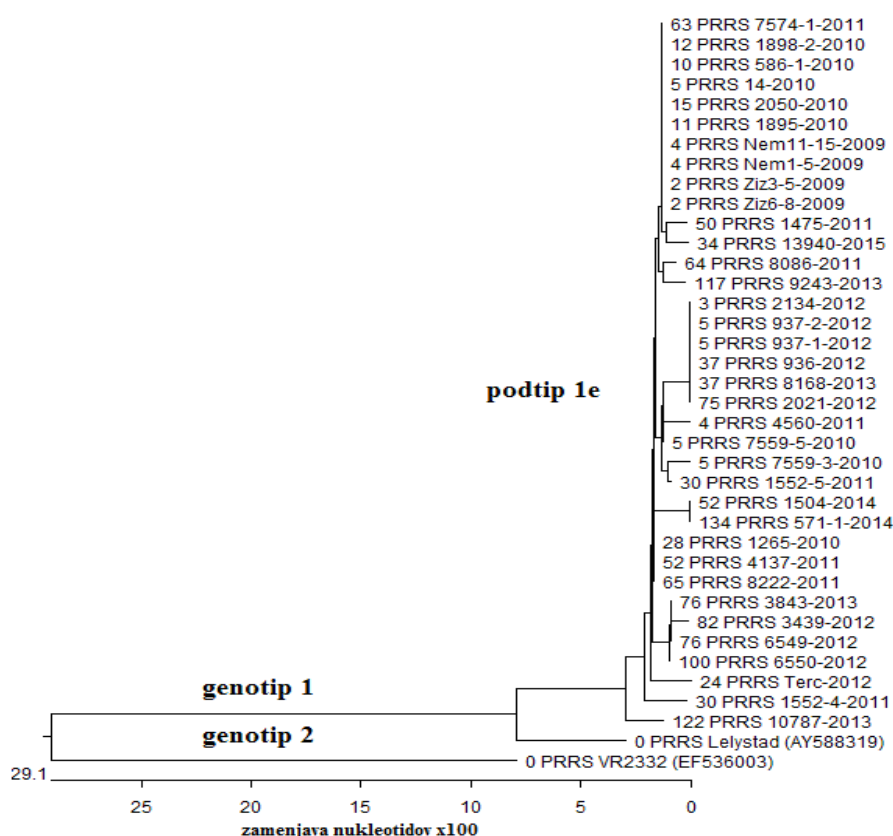


Slika 9: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz podtipa 1d, skupaj z referenčnim sevom VR2332.

3.1.5 Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1e

Za seve virusov PRRS, ki so uvrščeni v podtip 1e lahko potrdimo, da so se po vnosu v Slovenijo prav gotovo od vseh vnesenih podtipov virusov PRRS najuspešneje razširili med našimi prašičjimi rejami. Najvišji odstotek okuženih rej z virusi PRRS iz tega podtipa smo ugotovili v letu 2010, ko smo viruse PRRS iz podtipov 1e ugotovili v 70 % od 20 tipiziranih pozitivnih vzorcev (22). Od leta 2009 pa do sredine leta 2015, je od 394 tipiziranih pozitivnih vzorcev PRRS, 140 pozitivnih vzorcev (35,53 %) vsebovalo viruse PRRS iz podtipa 1e, vzorce tega podtipa pa smo v tem obdobju ugotovili v 67 različnih rejah. Točnega razloga, kaj je povzročilo hitro širjenje virusov podtipa 1e med našimi rejami prašičev, v letih od 2009 do 2012, nismo ugotovili, lahko pa je to širjenje posledica takrat še popolnoma občutljive populacije domačih prašičev in povečane prodaje prašičev med rejami, kar bi lahko pripomoglo k hitremu širjenju tega seva. Genetsko 100 % identične viruse PRRS smo ugotovili v letih od 2009 do 2011 v rejah 2, 4, 5, 10, 11, 12, 15 in 63, vse okužene reje z istim sevom PRRS pa se nahajajo v istih ali sosednjih občinah v Pomurju. Na podlagi 100 % identičnosti zaporedja nukleotidov lahko potrdimo, da so se reje 28, 52 in 65 med seboj okužile, prav tako reje 3, 5, 37 in 75, pozitivne reje okužene v letih od 2012 do 2013 z istim sevom so se nahajale v isti občini (Beltinci). V letu 2014 smo ugotovili 100 % identično zaporedje v dveh rejah, kar je verjetno posledica prenosa virusa PRRS iz podtipa 1e iz reje 134 (Apače) iz Pomurja v rejo 52 iz občine Črni Kal v Primorski regiji. Iz uvrstitve virusov na isto vejo filogenetskega drevesa lahko domnevamo, da je bila reja 50 (okužena 2011) vir okužbe za rejo 34, v kateri smo okužbo ugotovili v letu 2015. Podobno velja za rejo 64, ki je bila vir okužbe za rejo 117, obe okuženi reji se nahajata v isti občini. V

rejah 76 (Puconci) in 100 (Murska Sobota) smo ugotovili identične viruse PRRS, kar potrjuje medsebojno okužbo, v reji 82 (Šenčur) pa zelo podoben virus (99,2 % identičnosti), kot je bil istega leta ugotovljen v rejah 76 in 100. Zaradi velikega števila pozitivnih vzorcev virusov PRRS, uvrščenih v podtip 1e, smo večino virusov tega podtipa prikazali na dveh ločenih filogenetskih drevesih (slika 10a in slika 10b).

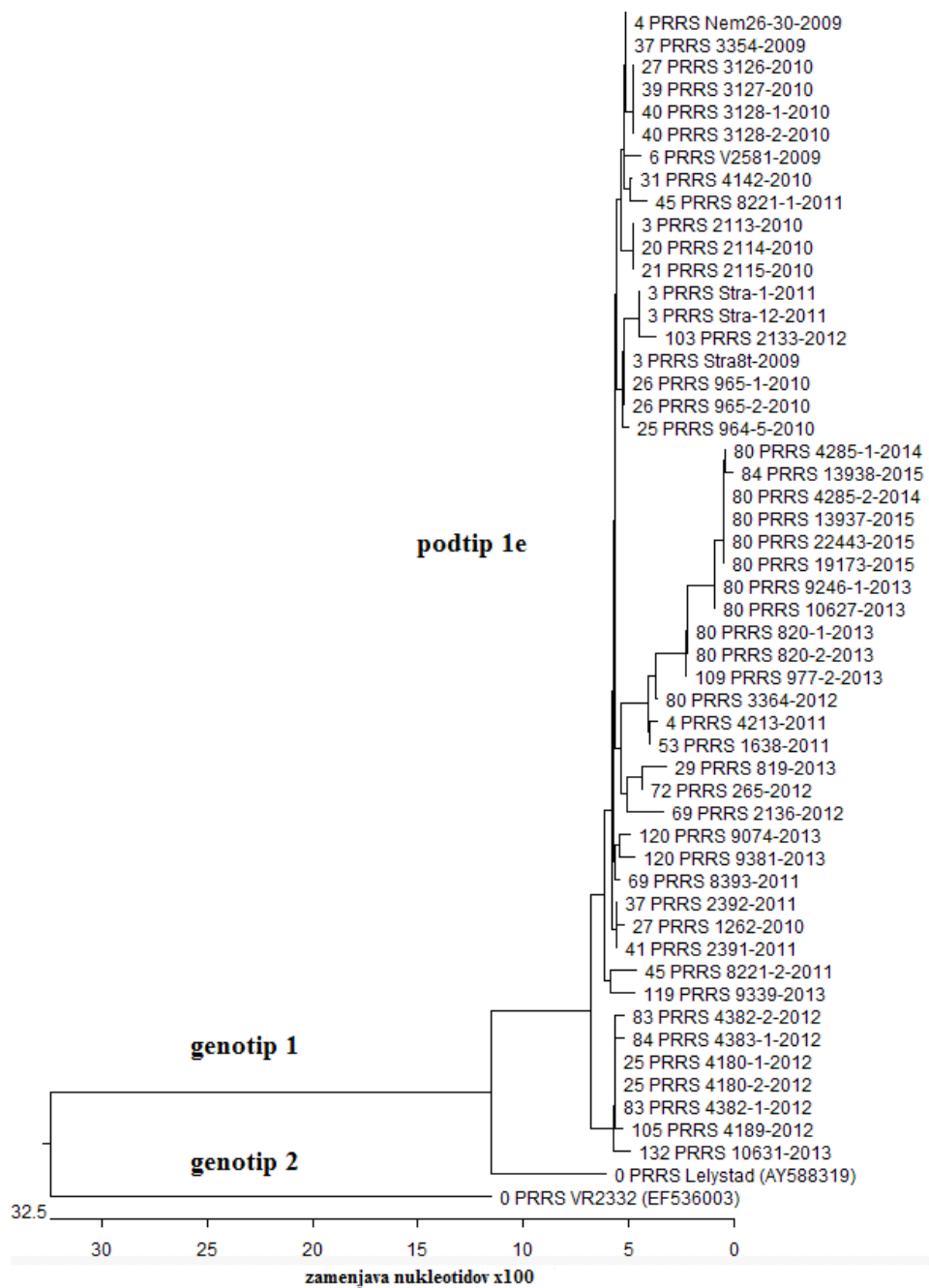


Slika 10a: Filogenetsko drevo z nekaterimi sevi PRRS iz podtipa 1e, skupaj z referenčnim sevom Lelystad in VR2332.

Na drugem filogenetskem drevesu razvrščenih sevov PRRS iz podtipa 1e lahko pri reji 80 v obdobju od 2012 do 2015 spremljamo, kako se virus postopoma v isti reji spreminja in kako se je v tem obdobju prenašal med rejami. Vir okužbe za rejo 80 (okužena v letu 2012) je bila reja 53 ali reja 4, obe okuženi v letu 2011. V reji 109 smo v letu 2013 ugotovili identičen virus, kot v

reji 80. V letu 2015 pa zelo podoben virus, kot v reji 80 še v reji 84, obe reji se nahajata v isti občini. Podobne seve smo ugotovili v rejah 29, 41, 69, 72 in 120 (reje iz občin Murska Sobota, Tišina, Križevci pri Ljutomeru in Beltinci) med leti 2012 in 2013, ki so se po vsej verjetnosti okužile z nakupom prašičev iz ene od prej okuženih rej s tem sevom virusa PRRS. Glede na veliko genetsko podobnost (98 %) ugotovljenih virusov PRRS je bila reja 45 vir okužbe (nakup pozitivnega prašiča) za rejo 119, geografska razdalja med rejama pa je 25 km. V letu 2012 smo identični sev virusa ugotovili v rejah 25, 83, 84 in 105 (vse reje v Pomurju), leta 2013 pa še zelo podoben virus v reji 132 na Štajerskem, iz velike podobnosti (99,2-100% identičnosti nukleotidnega zaporedja) pa so se verjetno te reje med seboj okužile. Reja 3, v kateri smo virus PRRS prvič dokazali v letu 2009, je bila vir okužbe za reje 25, 26 in 103. Zelo podobne seve virusov PRRS smo med leti 2009 in 2011 ugotavljali v rejah 3, 4, 6, 20, 21, 27, 31, 37, 40 in 45, vse reje pa se geografsko nahajajo zelo skupaj v Pomurju, v razdalji znotraj 30 km, razen reje 31, ki se nahaja v občini Dol pri Ljubljani. Po vsej verjetnosti se je virus v rejo 31 vnesel z nakupom živega okuženega prašiča iz Pomurske regije.

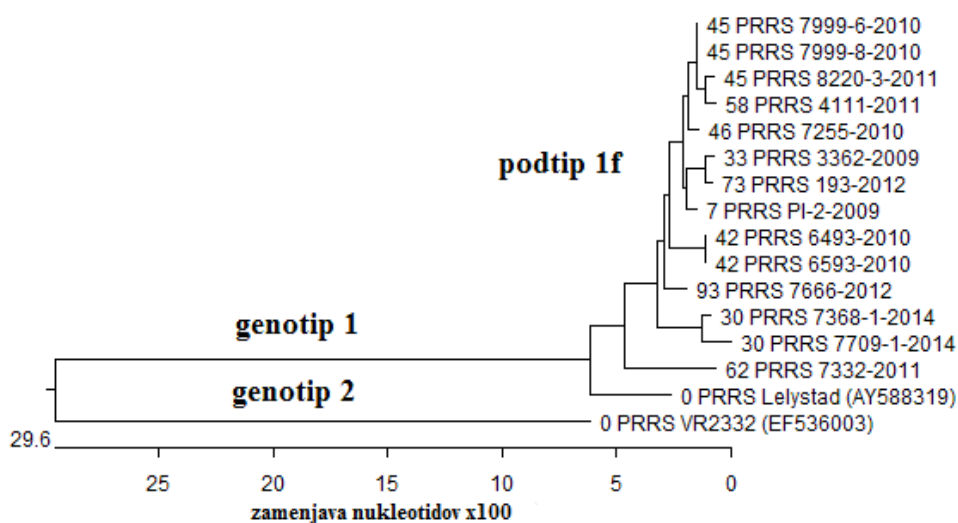
Viruse iz podtipa 1e ugotavljamo na celotnem ozemlju Slovenije. Ugotovitev do 7,8 % razlik v nukleotidnem zaporedju med ugotovljenimi sevi znotraj podtipa 1e potrjuje, da je šlo tudi tukaj za več vnosov različnih sevov virusov podtipa 1e v Slovenijo. Iz primerjave pozitivnih vzorcev ugotovljenih znotraj iste reje smo natančneje ugotovili, kako stabilen je del virusnega genoma v regiji ORF 7 in kako hitro se virus PRRS v tej regiji spreminja. Zbrani podatki za pozitivne vzorce iz podtipa 1e so pomemben del molekularno epidemiološke študije, saj nam ista topologija vzorcev iz posamezne reje na filogenetskem drevesu potrjuje zanesljivost in ponovljivost rezultatov, nekatere pomembnejše ugotovitve pa so natančneje opisane v drugih poglavjih v nadaljevanju.



Slika 10b: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz podtipa 1e, skupaj z referenčnim sevom Lelystad in VR2332.

3.1.6 Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1f

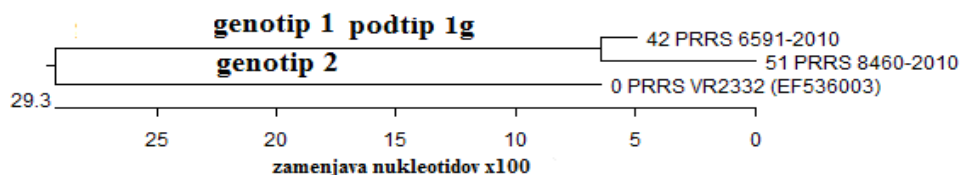
V letih od 2009 do 2014 smo 14 pozitivnih vzorcev z virusi PRRS, ki so uvrščeni v podtip 1f, ugotovili v 10 različnih rejah (slika 11). Ugotovljeni pozitivni vzorci se med seboj razlikujejo do 8,5 %, iz razlik pa lahko sklepamo o najmanj treh različnih vnosih virusov iz podtipa 1f v Slovenijo. Če smo največje število pozitivnih vzorcev z virusi iz podtipa 1f ugotovili med leti 2009 in 2011, pa v zadnjih letih viruse iz tega podtipa ugotovimo le še občasno. Med pozitivnimi vzorci iz devetih rej: 7, 42, 33, 42, 45, 46, 58, 73, 93, ugotavljamo od 96,9 do 100 % identičnost nukleotidov, kar potrjuje medsebojno okužbo rej z istim sevom virusa podtipa 1f v letih od 2009 do 2011. Seva iz rej 30 in 62 se od preostalih sevov PRRS, uvrščenih v podtip 1f, razlikujeta za 3,9 do 8,5 %, kar potrjuje, da gre za ločene vnose virusa PRRS, iz drugih virov, glede na preostale reje.



Slika 11: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz podtipa 1f, skupaj z referenčnim sevom Lelystad in VR2332.

3.1.7 Okuženi reji s sevi virusov PRRS iz podtipa 1g

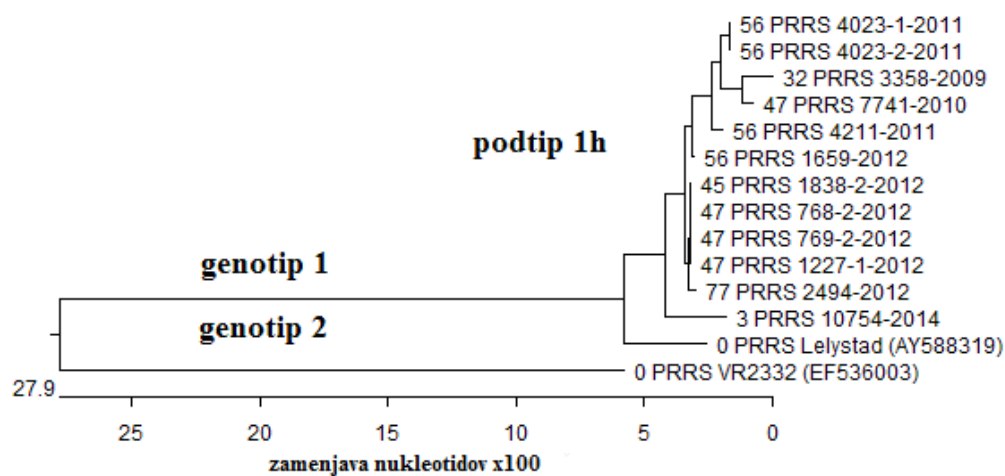
V letu 2010 smo ugotovili dva različna vnosa sevov PRRS iz podtipa 1g v Slovenijo, v rejo 42 in 51. Med pozitivnimi vzorci smo ugotovili 92,9 % identičnost nukleotidnega zaporedja, kar potrjuje, da gre za genetsko podobna virusa, vendar za dva ločena vnosa v dve okuženi reji v istem letu (slika 12). Do leta 2015 podobnih sevov nismo ugotovili v nobeni drugi okuženi reji prašičev v Sloveniji.



Slika 12: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz podtipa 1g, skupaj z referenčnim sevom VR2332.

3.1.8 Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1h

V letih od 2010 do 2014 smo v sedmih različnih rejah dokazali 12 pozitivnih vzorcev, ki so se uvrstili v podtip 1h. Med virusi podtipa 1h ugotavljamo od 92,2 do 100 % identičnost nukleotidnega zaporedja. Iz topologije na filogenetskem drevesu lahko sklepamo, da so se virusi tega podtipa vnesli iz dveh različnih virov okužbe, najprej v letu 2009 v rejo 32, ta pa je bila vir okužbe reje 47, obe reji se nahajata v isti občini (Križevci pri Ljutomeru). V letu 2011 smo viruse podtipa 1h ugotovili v reji 56, iz te reje pa se je virus PRRS razširil še v reje 45, 47 in 77 (slika 13). V letu 2014 se je nov sev virusa iz podtipa 1h vnesel v rejo 3, do leta 2015 pa genetsko podobnega virusa nismo ugotovili v nobeni od okuženih rej, iz katerih smo tipizirali pozitivne vzorce.

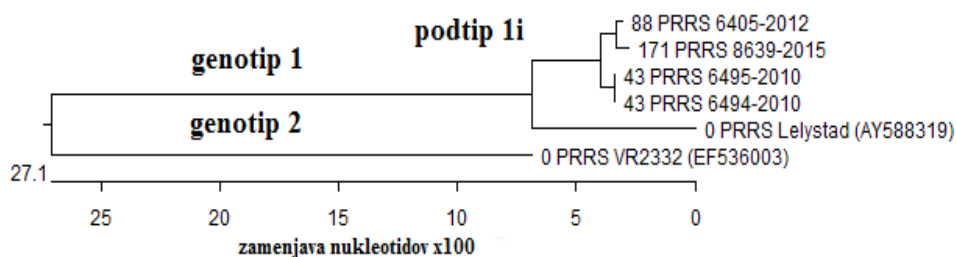


Slika 13: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz podtipa 1h, skupaj z referenčnim sevom Lelystad in VR2332.

3.1.9 Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1i

Viruse iz podtipa 1i ugotavljamo le občasno v okuženih slovenskih rejah prašičev. Prvič smo virus PRRS, uvrščen v podtip 1i, ugotovili v dveh zaporednih odvzemih leta 2010 v reji 43, ki se nahaja v občini Metlika na Dolenjskem. Leta 2012 smo genetsko zelo podoben virus (98,4 % identičnost nukleotidnega zaporedja) ugotovili v reji 88 v Pomurski regiji (občini Kuzma). V letu 2015 smo virus PRRS iz podtipa 1i dokazali še v reji 171 v občini Dobova, ponovno na Dolenjskem, ugotovljen virus PRRS pa ima 98,4 % identičnost nukleotidnega zaporedja z rejo 43 in 99,2 % identičnost z rejo 88 (slika 14). Iz podatkov nukleotidnega zaporedja štirih vzorcev iz treh okuženih rej lahko potrdimo, da gre samo za en vnos virusa podtipa 1i v Slovenijo, verjetno pa je virus prisoten še v manjših neidentificiranih pozitivnih rejah, ki imajo manj stikov z drugimi rejami, posledično se ta sev virusa PRRS ni razširil na večje število rej. Ugotovitev dveh okuženih rej na Dolenjskem v razdobju petih let potrjuje, da se posamezni manj pogosto ugotovljeni virusi PRRS lahko ohranjajo nekaj let na določenem območju, občasno pa se lahko vnesejo tudi v druge regije. Okužba reje 171 je po vsej verjetnosti posledica prodaje okuženih

prašičev ali drugega stika med rejo 43 (ali rejo 88) in rejo 171, kar je imelo za posledico prenos istega virusa PRRS iz podtipa 1i med rejami.

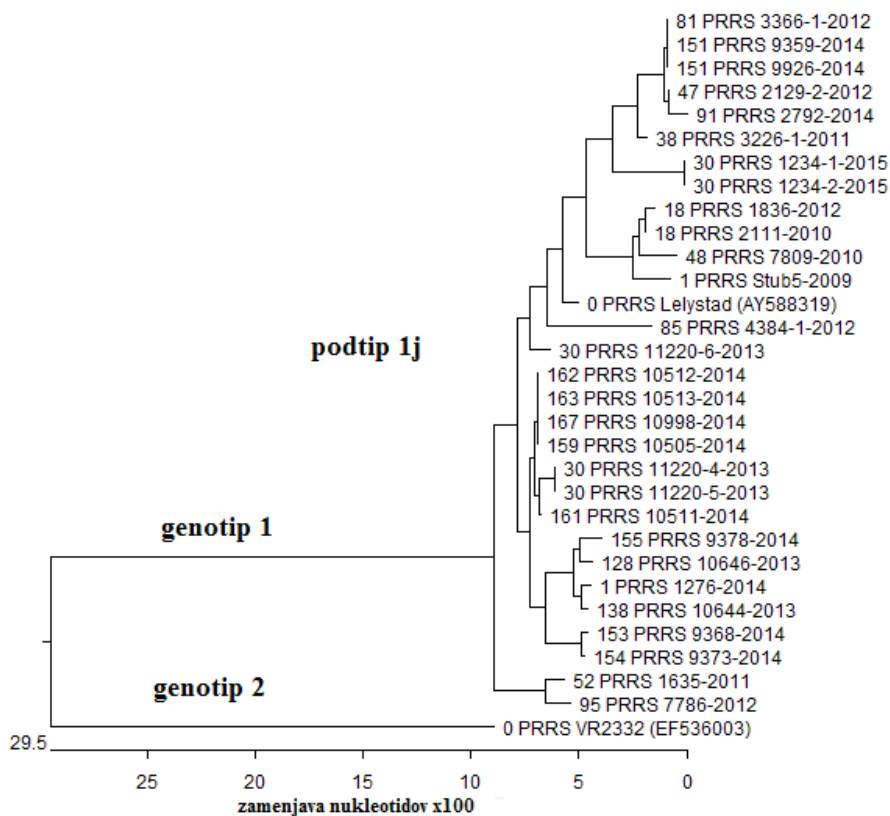


Slika 14: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz podtipa 1i, skupaj z referenčnim sevom Lelystad in VR2332.

3.1.10 Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1j

Seve PRRS iz podtipa 1j smo ugotovili med leti 2009 in 2015 v 22 različnih rejah, viruse tega podtipa pa smo ugotavljali v vseh šestih letih. Primerjava nukleotidnega zaporedja 29 pozitivnih vzorcev, uvrščenih v podtip 1j, je pokazala od 89,9 do 100 % identičnost, na podlagi razlik pa domnevamo, da so se virusi tega podtipa vnašali v Slovenijo iz najmanj sedmih različnih virov okužbe. V reji 1 smo v letu 2009 prvič ugotovili sev iz podtipa 1j, v letu 2010 pa genetsko zelo podoben virus še v reji 18 in 48, iz česar lahko zaključimo, da je bila reja 1 vir okužbe za ostali dve reji. V reji 38 smo virus PRRS iz podtipa 1j prvič ugotovili v letu 2011, isti sev virusa PRRS pa še v letu 2012 v rejah 47 in 81, v letu 2014 v rejah 91 in 151, identičnost nukleotidnega zaporedja virusov PRRS, ugotovljenih v teh petih rejah, je znašala od 97,5 do 100 %. V letu 2015 smo v reji 30 (PRRS 1234-1 in 2) ugotovili podoben virus, vendar lahko zaključimo, da gre za vnos virusa PRRS v to rejo iz drugega vira okužbe, ker je primerjava nukleotidnega zaporedja pokazala le 93,8 do 95 % identičnost zaporedja. Podobno smo v reji 30 v letu 2013 dokazali virus PRRS, ki bi lahko bil vir okužbe za reje 159, 161, 162, 163 in 167. Na podlagi ugotovljene identičnosti zaporedja lahko sklepamo, da so se reje 1, 128, 138 in 155 med seboj okužile. Reja 52 je bila vir okužbe za rejo 95 (slika 15). Sevi podtipa 1j so na filogenetskem drevesu razvrščeni najbližje sevom podtipa 1a, zato ugotovitev in vnos številnih različnih sevov podtipa 1j v

Slovenijo ni presenečenje, saj gre za genetsko sorodne seve najstarejšemu sevu PRRS Lelystad, ki so ga prvič dokazali že leta 1991 na Nizozemskem.



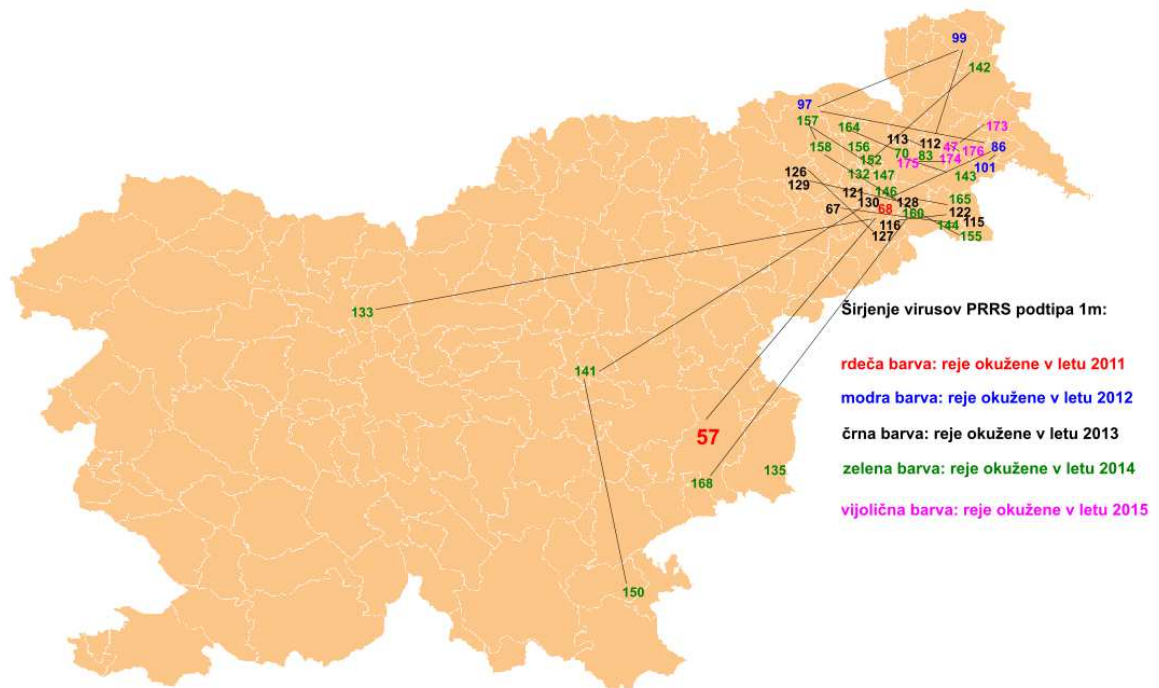
Slika 15: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz podtipa 1j, skupaj z referenčnim sevom Lelystad in VR2332.

3.1.11 Okužena reja s sevom virusa PRRS iz podtipa 1k

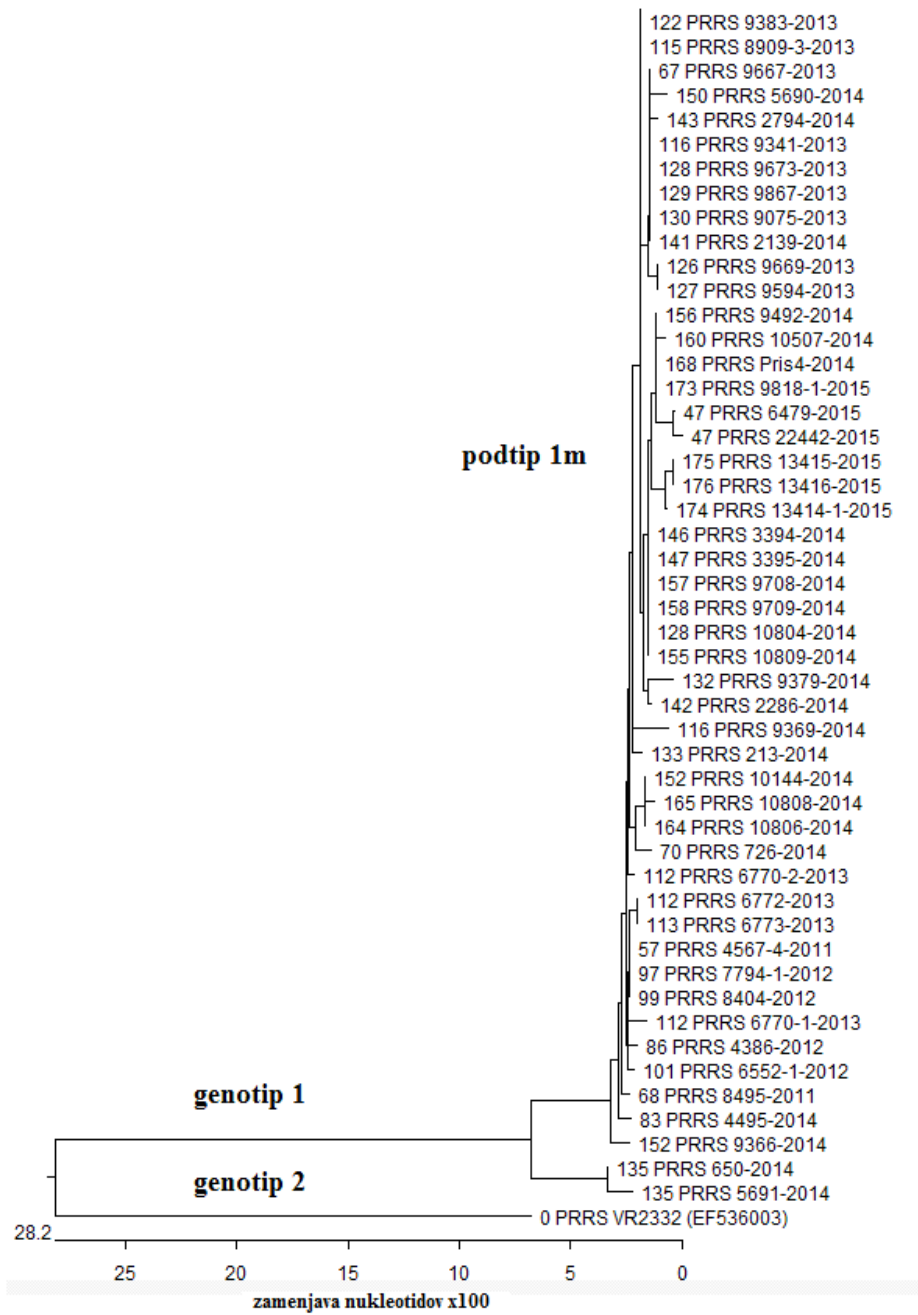
Sev podtipa 1k smo ugotovili le v reji 54 leta 2011, istočasno pa smo v tej reji leta 2011 dokazali seve iz podtipa 1e. Med sevi PRRS podtipa 1k in 1e beležimo 89,4 % identičnost v nukleotidnem zaporedju, zato ta razlika potrjuje, da gre za prisotnost dveh različnih sevov v reji. V nobeni drugi reji seva, ki bi bil uvrščen v podtip 1k v nadaljevanju nismo ugotovili.

3.1.12 Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1m

Prvi primer okužbe s sevom iz podtipa 1m smo ugotovili leta 2011 v reji 57, v naslednjih letih pa še v 48 različnih rejah. Ugotovitev novega seva iz podtipa 1m v letu 2011 ni dajala slutiti, da se bo ta sev v nekaj letih v Sloveniji razširil na zelo veliko število prašičjih rej in v letu 2013 prvič celo presegel pojavljanje do takrat najpogosteje ugotovljenih sevov iz podtipa 1e. Verjetno je razlog za hitro širjenje podoben, kot smo ga navedli pri podtipu 1e, vsekakor pa gre za en vnos virusa PRRS v Slovenijo v letu 2011 in v naslednjih letih uspešno prenašanje tega seva virusa PRRS v številne, še neokužene reje znotraj Slovenije, kar potrjuje ugotovljena identičnost nukleotidnega zaporedja med 48 okuženimi rejami, ki znaša od 96,1 do 100 %. Ugotovljena velika podobnost med tipiziranimi virusi v obdobju 2011 do 2015 torej dokazuje širjenje tega seva virusa znotraj slovenskih rej, ne pa novih vnosov iz tujine (slika 16). Velika uspešnost širjenja seva iz podtipa 1m prav gotovo ni naključje, potrjuje pa, da imajo nekateri sevi virusa PRRS ob ugodnih razmerah večji potencial kot drugi in se lahko razširijo na veliko število rej. V letu 2014 smo ugotovili vnos še enega novega seva virusa PRRS podtipa 1m iz tujine in sicer v reji 135, ki pa ima s preostalimi ugotovljenimi sevi podtipa 1m le od 90,3 do 94 % identičnost nukleotidov (slika 17). V reji 135 smo v letu 2014 pri dveh različnih odvzemih vzorcev dokazali isti sev virusa, saj med dvema pozitivnima vzorcema znotraj iste reje ugotavljamo 98,8 % identičnost zaporedja nukleotidov. Vsekakor bi v prihodnje bilo smiselno natančneje proučiti tudi nekatere druge značilnosti sevov podtipov 1e in 1m (klinično sliko, virulenco, najpogostejši način prenosa) ter natančneje ugotoviti razloge za nadpovprečno uspešno širjenje teh dveh sevov v neokužene reje.



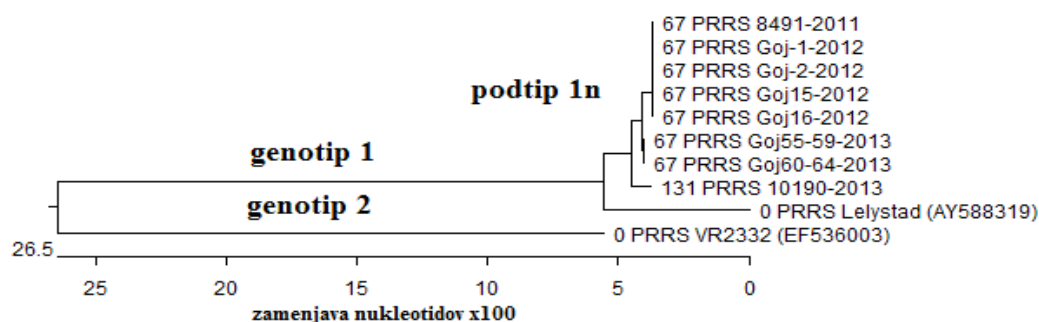
Slika 16: Časovni prikaz in poti širjenja virusov PRRS iz podtipa 1m v letih od 2011 do 2015, prikazano na podlagi leta ugotovitve in podobnosti med virusi PRRS na filogenetskem drevesu. Navedene številke v različnih barvah na zemljevidu predstavljajo zaporedno številko okužene reje, različne barve pa leto ugotovitve, ko smo virus PRRS v okuženi reji dokazali.



Slika 17: Filogenetsko drevo z nekaterimi sevi PRRS iz podtipa 1m, skupaj z referenčnim sevom VR2332.

3.1.13 Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1n

Viruse iz podtipa 1n smo pri nas redko ugotovili, do leta 2015 pa smo s tem podtipom virusa PRRS ugotovili okužbo le v rejah 67 in 131, s tem da je reja 67 po vsej verjetnosti bila vir okužbe za rejo 131, kar potrjuje od 98,4 do 100 % identičnost zaporedja nukleotidov med sevi, ugotovljenih v obeh rejah (slika 18). Ugotovitev pozitivnih vzorcev in istega seva virusa v reji 67 (99,6-100 % identičnost) med leti 2011 in 2013 potrjuje, da se je isti sev virusa vsaj tri leta uspešno ohranjal v reji, podobno kot ugotavljamo pri ostalih podtipih virusa PRRS.

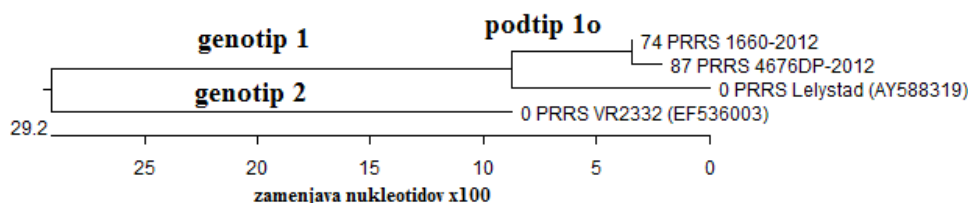


Slika 18: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz podtipa 1n, skupaj z referenčnim sevom Lelystad in VR2332.

3.1.14 Okužene reje s sevi virusov PRRS iz podtipa 1o

Viruse PRRS iz podtipa 1o smo ugotovili le na dveh lokacijah, v reji 74 in pri divjem prašiču, leta 2012 (slika 19). Ugotovitev podtipa 1o v reji 74 v občini Cankova v Pomurju je prav gotovo posledica vnosa novega seva virusa PRRS v Slovenijo iz tujine, saj genetsko podobnih sevov ne prej ne pozneje nismo ugotavljali. V letu 2012 pa smo pri divjem prašiču, ki je bil ustreljen v občini Dobova, ugotovili isti sev virusa, s sevom iz reje 74 pa ima 99,2 % identičnost zaporedja nukleotidov. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je pojav istega seva v dveh različnih regijah Slovenije posledica medsebojnega prenosa virusa v istem letu. S tem sevom pa bi lahko bilo na Dolenjskem okuženih še več rej. Ena od možnosti pojava istega seva pri divjem prašiču je prenos okužbe preko gnojevke, ki jo rejci razvažajo na kmetijske površine in preko katere bi se divji prašič lahko okužil. Druga možnost prenosa virusa PRRS na divjega prašiča je preko direktnega

stika z okuženim domačim prašičem. To bi se lahko zgodilo v primeru, če so domači prašiči občasno prosto spuščeni iz hleva in bi tako lahko prišli v stik z divjimi prašiči.

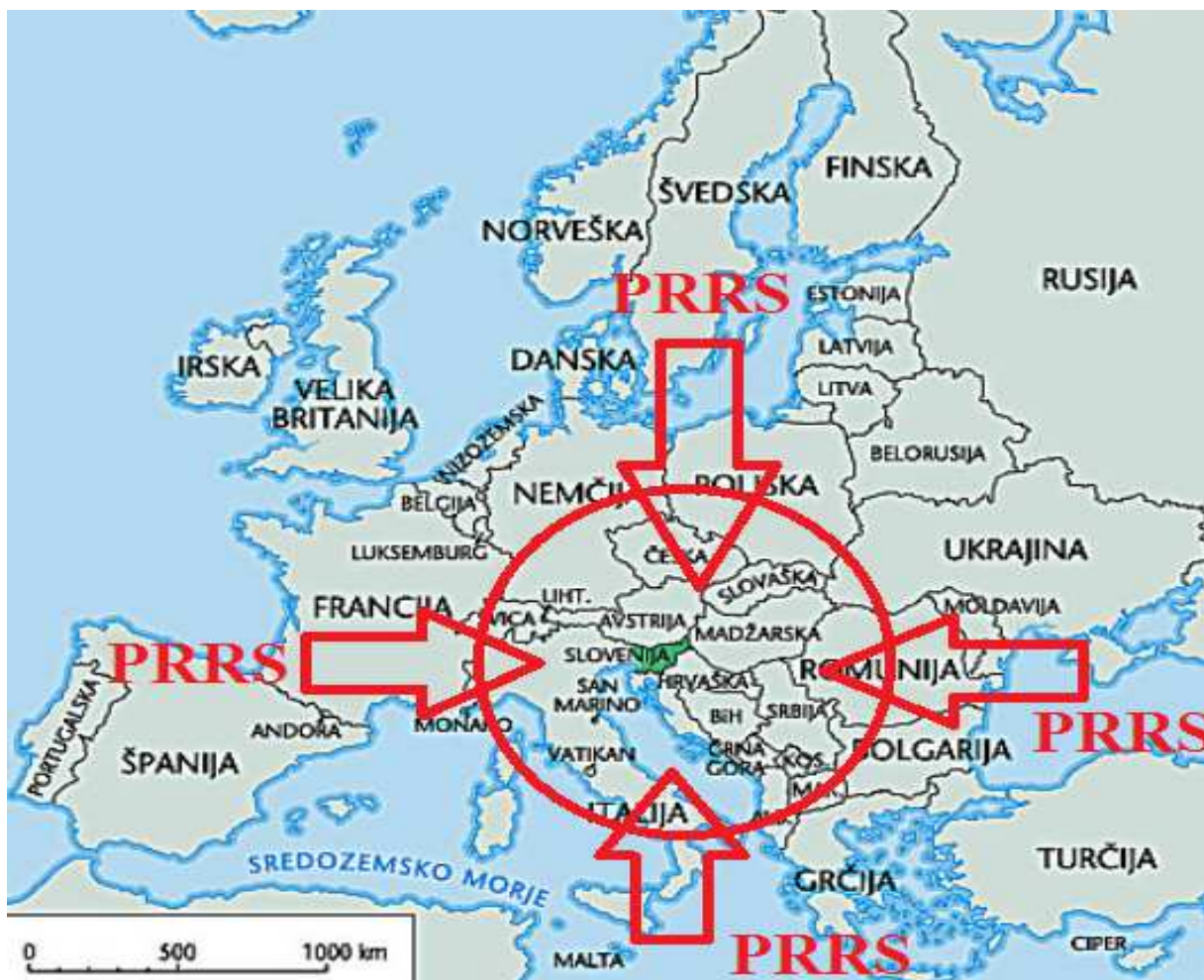


Slika 19: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz podtipa 1o, skupaj z referenčnim sevom Lelystad in VR2332.

3.2 PRIMERJAVA NAŠIH SEVOV PRRS S SEVI IZ DRUGIH DRŽAV

Primerjavo nukleotidnih zaporedij 394 pozitivnih vzorcev PRRS smo izvedli preko spletnega strežnika BLAST (angl. Basic Local Alignment Search Tool, NCBI, ZDA), da bi primerjali naše podatke s tistimi, ki so že dostopni v genski banki. Na podlagi večletnega spremljanja dinamike nastajanja sprememb v regiji ORF 7 virusnega genoma in primerjav nukleotidnega zaporedja virusov PRRS znotraj iste reje ocenjujemo, da bi lahko govorili o nedavnem prenosu okužbe, če bi med dvema sevoma virusa PRRS ugotovili manj kot 2 % razlik v nukleotidnem zaporedju. Izvedba takšne primerjave bi bila uporabna za neposreden dokaz o prenosu okužbe med dvema rejama. Ugotavljamo, da so nekatere podobne seve PRRS predhodno že dokazali v drugih evropskih državah (v Avstriji, Nemčiji, Danski, Franciji, Belgiji, Hrvaški, Italiji, Slovaški, Poljski, Španiji...), vendar so v večini primerov razlike večje od 2 %. V naši študiji ugotavljamo tudi številne nove seve, zato lahko potrdimo, da nukleotidna zaporedja številnih sevov PRRS, ki krožijo v Evropi še niso dostopna v genski banki podatkov. Podobne seve virusov PRRS iz podtipa 1e kot smo jih ugotovili v Sloveniji, so ugotovili tudi v Italiji, vendar je med našimi in najbližjimi italijanskimi sevi PRRS le 95 % identičnost zaporedja nukleotidov. Našim sevom iz podtipa 1m so v genski banki najbližji sevi iz Danske in Hrvaške, vendar imajo tudi ti z našimi sevi le 93 % identičnost zaporedja. Vendarle je sev PRRS, ugotovljen v reji 135 (podtip 1m) leta 2014, genetsko bližje sevu iz Danske DK-2012-01-05-2 (KC862574), s katerim ima 96 %

identičnost nukleotidnega zaporedja v primerjani regiji ORF 7. Sevom iz podtipa 1n so v genski banki najbližji (94 % identičnost) sevi iz Danske in Francije. Našemu sevu PRRS iz podtipa 1j, ki bil ugotovljen leta 2015 v reji 3, je najbližji sev 07VO63 (GU737264) iz Belgije, s katerim ima 95 % identičnost nukleotidnega zaporedja. Sevom iz reje 47 iz podtipa 1h je najbolj soroden (94 %) sev iz Danske. Sevom iz podtipa 1o iz reje 74 je najbolj podoben (93 %) sev iz Slovaške P14 (KF134442). Sevom iz podtipa 1i je v genski banki najbolj podoben sev Cresa3262 (JF276431) iz Španije. Natančnejših primerjav s sevi, ugotovljenimi v drugih evropskih državah, z namenom, da bi določili ime države, ki je vir okužbe zaradi navedenih razlik, nismo mogli izvesti. Številne države, izvoznice prašičev, podatkov o pojavljanju posameznih sevov PRRS zaradi ekonomskih interesov ne želijo javno razkriti (poslati podatke v gensko banko), saj bi s podobnimi študijami drugi raziskovalci lahko nedvoumno dokazali prenose posameznih sevov virusa PRRS med državama. Iz tega razloga smo si ustvarili svojo zbirko podatkov (podobno delajo tudi v drugih državah) in jo od leta 2009 naprej ves čas dopolnjevali ter spremljali pojavljanje istih sevov v različnih rejah znotraj Slovenije. Iz filogenetskega drevesa, v katerega smo vključili primerjavo 394 zaporedij naših pozitivnih vzorcev, pa lahko glede na ugotovljene razlike v zaporedju nukleotidov zaključimo, da so slovenski prašičerejci pozitivne prašiče uvažali iz najmanj 70 različnih virov okužbe (okuženih rej s pozitivnimi prašiči), ki se nahajajo v več različnih evropskih državah (slika 20). Zaradi poslabšanja razmer v slovenski prašičereji, se v zadnjem desetletju zmanjšuje samooskrba s prašičjim mesom, posledično pa se zaradi potreb trga povečuje tudi uvoz živih prašičev. Seveda se z uvozom živih prašičev v državo vnašajo tudi številni patogeni mikroorganizmi. Virus PRRS je le eden od teh patogenov, ki smo ga v tej študiji natančneje spremljali in nedvoumno dokazali številne prenose virusa iz različnih virov okužbe. Vsekakor pa ti patogeni povzročajo nadaljnje okužbe rej in posledično ekonomske škode. Zahteva kupca, da želi kupiti zdrave prašiče in ponovna uvedba karantenskih pregledov, bi zmanjšala tudi nevarnost vnosa novih sevov virusov PRRS v Slovenijo, vendar pa je ob nakupih več tisoč odojkov za pitanje to zelo težko izvesti in ekonomsko upravičiti, posledično pa so rejci, ki ne izvajajo preventivnih ukrepov, vnos bolezni popolnoma prepustili naključju. Tako z nakupom prašičev iz ene reje dobijo negativne prašiče iz druge pa pozitivne in ko se živali skupaj združijo v istem hlevu, se virus med prašiči zelo hitro prenese.

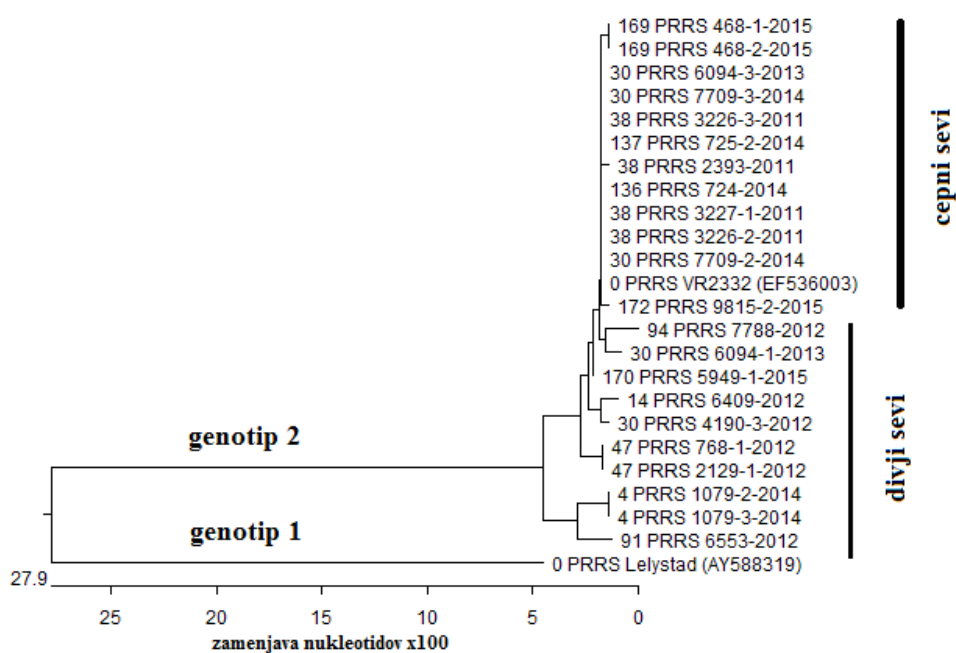


Slika 20: Vnos različnih virusov PRRS je med leti 2009 in 2015 v Slovenijo potekal iz večjega števila virov okužbe. Filogenetska primerjava nukleotidnega zaporedja 394 virusov PRRS med seboj, skupaj z najbolj sorodnimi virusi PRRS v genski banki dokazuje, da so se virusi PRRS v Slovenijo vnesli iz najmanj 70 različnih virov okužbe.

3.3 UGOTOVITEV SEVOV PRRS IZ GENOTIPA 2

V letu 2011 smo v reji 38 v Sloveniji prvič ugotovili viruse PRRS, ki spadajo v genotip 2, v naslednjih štirih letih pa smo viruse iz genotipa 2 ugotavljali le še v posameznih okuženih rejah. V letih od 2011 do 2015 smo skupno ugotovili 22 pozitivnih vzorcev, v katerih smo dokazali prisotnost virusov PRRS iz genotipa 2, v skupno 12 različnih rejah (slika 21). Med ugotovljenimi

sevi, ki spadajo v genotip 2, ugotovljamo 92,5 do 100 % identičnost nukleotidnega zaporedja. Ugotovitev virusov genotipa 2 v okuženih slovenskih rejah potrjuje predhodne ugotovitve, da so virusi genotipa 2 prisotni tudi v evropskih državah. Čeprav smo ugotovili le manjše število virusov genotipa 2 v posameznem letu, pa ima lahko prisotnost virusov genotipa 2 daljnosežne posledice, saj gre za povsem različne viruse PRRS, ki se genetsko zelo razlikujejo od virusov genotipa 1.



Slika 21: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz genotipa 2, skupaj z referenčnim sevom Lelystad in VR2332. Na drevesu so zgoraj prikazani sevi virusov PRRS, ki so posledica cepljenja s cepivom genotipa 2, v spodnjem delu drevesa pa so prikazani divji sevi PRRS genotipa 2.

3.3.1 Ugotovitev cepnega seva VR-2332 v pozitivnih rejah

Kakor je bilo že prej opisano, se ugotovljeni virusi genotipa 2 precej razlikujejo od virusov genotipa 1, s katerimi imajo le od 64 do 66,3 % identičnost nukleotidnega zaporedja. V letih od 2011 do 2015 smo v 6 rejah ugotovili genetsko zelo podobne seve virusu PRRS VR2332, ki se

nahaja v cepivu. S primerjavo nukleotidnega zaporedja 12 pozitivnih vzorcev iz 6 rej ugotavljamo od 98,1 do 100 % identičnost, zato lahko sklepamo, da gre v teh rejah za ugotovitev cepnega virusa iz uporabljenega živega cepiva, ki vsebuje sev virusa PRRS VR2332. Zakaj so se rejci odločili za uporabo cepiva proti virusu genotipa 2, s študijo ne moremo natančneje pojasniti, lahko pa domnevamo, da gre za cepljenje "na slepo", v kolikor rezultati prvega cepljenja proti virusom genotipa 1 niso dali zadovoljivih rezultatov.

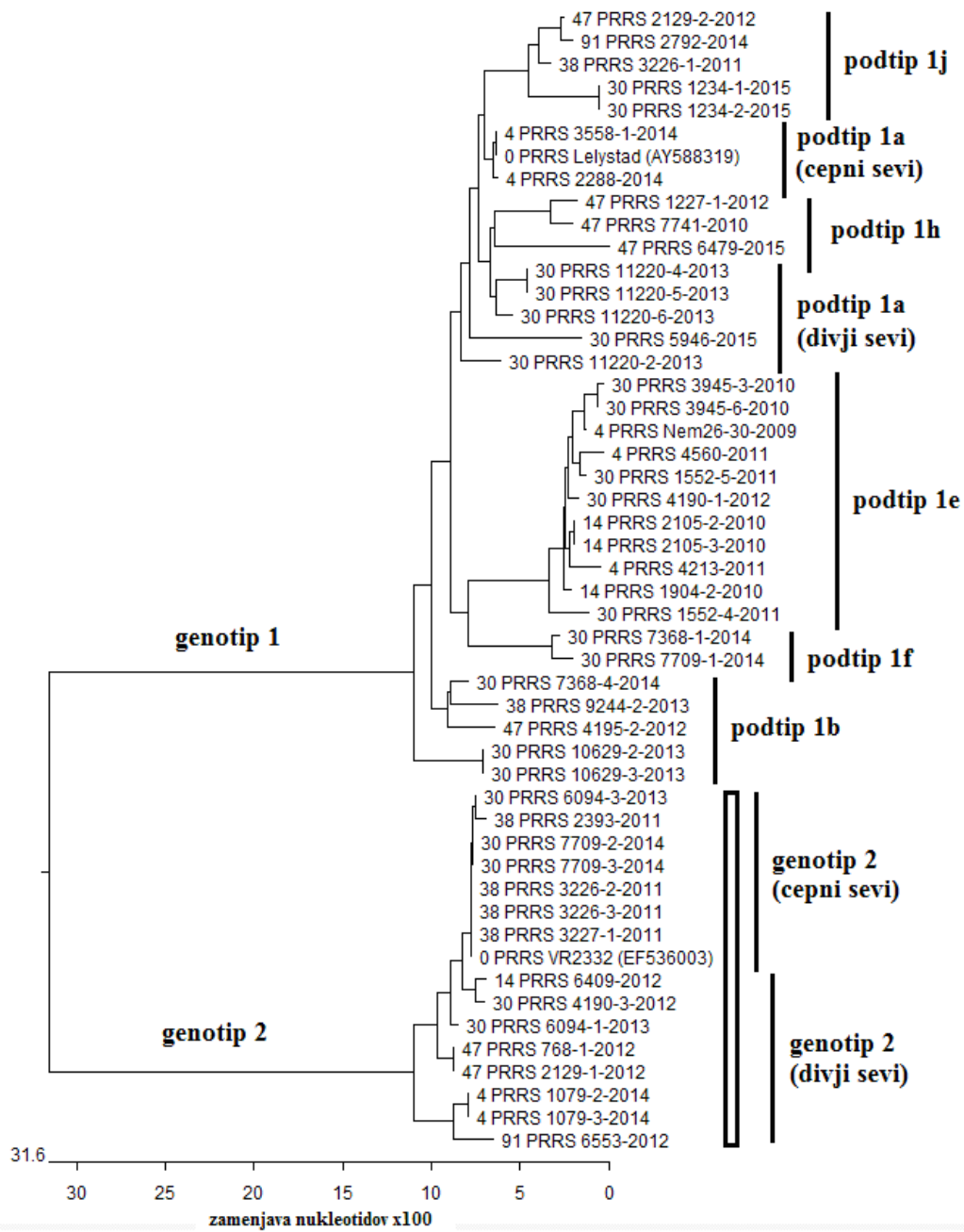
3.3.2 Ugotovitev divjih sevov virusov PRRS genotipa 2

V okuženih rejah smo ugotovili tudi divje seve virusov PRRS genotipa 2, ki pa imajo le od 94,3 do 98 % identičnost zaporedja nukleotidov s sevom virusa PRRS VR2332. Večletno kroženje cepnih sevov virusov PRRS iz genotipa 2 so po cepljenju v rejah prvič opisali leta 1995 na Danskem. Tako ni izključeno, da so nekateri ugotovljeni sevi genotipa 2 posledica uporabe cepljenja z virusi genotipa 2 že pred več leti, cepni virus pa se je potem še naprej množil in se postopoma spreminjal v okuženih rejah, k nam pa smo pozitivne prašiče z divjim sevom PRRS genotipa 2 uvozili. Nadaljnjega širjenja virusov genotipa 2 med slovenskimi rejami nismo zaznali. Smo pa leta 2012 zelo podoben divji sev virusa PRRS iz genotipa 2 ugotovili v rejah 14 in 30, kar bi lahko bila posledica prenosa virusa genotipa 2 med obema rejama ali vnos virusa PRRS v obe reji iz istega vira.

3.3.3 Istočasna prisotnost sevov virusov PRRS genotipa 1 in genotipa 2 v okuženi reji

Ugotovitev istočasne prisotnosti sevov PRRS genotipa 1 in genotipa 2 (razlike v nukleotidnem zaporedju med genotipom 1 in 2 so večje od 35 %) v 6 rejah potrjujejo, da v isti reji lahko ugotovimo tudi dva genetsko zelo različna virusa PRRS v kratkem časovnem obdobju. To smo potrdili v reji 4, ko smo v letu 2014 zraven virusa genotipa 2 (divji sev) ugotovili prisotnost cepnih virusov PRRS iz podtipa 1a, v reji 14 smo v letu 2010 ugotovili viruse genotipa 1e, v letu 2012 pa še viruse genotipa 2 (divji sev). V reji 30 smo v letu 2011, 2013 in 2014 ugotovili cepni sev virusa PRRS iz genotipa 2, v letu 2013 tudi divji sev iz genotipa 2 in različne podtipe virusov PRRS (podtip 1e, 1a, 1j, 1f 1b) iz genotipa 1. V reji 38 smo zraven cepnih sevov genotipa 2 ugotavljali še seve podtipa 1j, v reji 47 v istem obdobju skupaj z divjimi virusi genotipa 2 še

viruse podtipa 1j in v reji 91 v istem letu viruse genotipa 2 (divji sev) ter viruse PRRS podtipa 1j (slika 22). V študiji sicer nismo ugotavljali nastanka rekombinacij med virusi genotipa 1 in genotipa 2, vendar je zaradi sočasne prisotnosti virusov PRRS iz obeh genotipov velika možnost za nastanek novih virusov PRRS, ki so posledica rekombinacije, kar so potrdili že v predhodnih študijah v Italiji (35). To v praksi pomeni, da lahko z rekombinacijo nastanejo popolnoma novi sevi PRRS, za katere pa ne vemo, kakšno patologijo bodo povzročali.



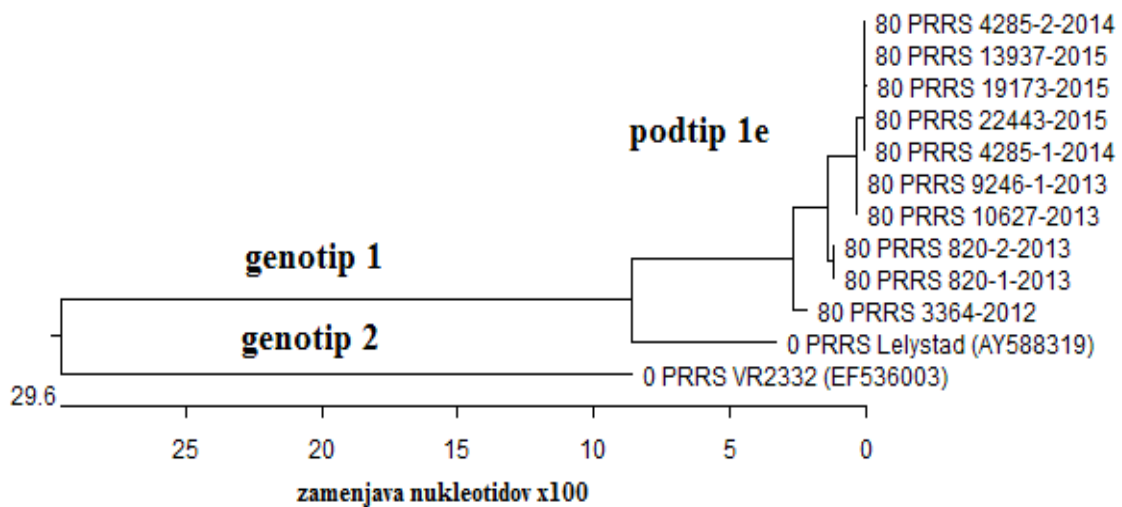
Slika 22: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz večjega števila pozitivnih rej, v katerih smo ugotovili prisotnost virusov PRRS iz genotipa 1 in genotipa 2.

3.4 PRIMERJAVA POZITIVNIH VZORCEV PRRS, ZNOTRAJ ISTE REJE

V posameznih rejah smo večje število okuženih prašičev z virusom PRRS ugotovili v času vzorčenja znotraj iste reje. Prav tako pa smo v istih rejah pozitivne vzorce ugotavljali ob več zaporednih odvzemih ali celo več let zaporedoma. Izvedena primerjava nukleotidnih zaporedij virusov PRRS iz iste reje je še posebej zanimiva, saj na ta način lahko ugotovimo ali znotraj iste reje ves čas kroži isti sev virusa PRRS, prav tako pa lahko ugotavljamo hitrost nastanka sprememb v nukleotidnem zaporedju virusa PRRS znotraj iste reje. S primerjavo med pozitivnimi vzorci lahko ugotovimo tudi vnos novih sevov virusov PRRS v rejo.

3.4.1 Ugotovitev zelo podobnih virusov PRRS v reji 80 v obdobju od 2012 do 2015

V reji 80 smo v letu 2012 prvič dokazali prisotnost virusa PRRS, ki je bil uvrščen v genotip 1e. V letu 2013 smo isti sev virusa PRRS ugotovili v pozitivnih vzorcih ob treh različnih vzorčenjih, v letu 2014 ob enem vzorčenju in v letu 2015 ob treh različnih vzorčenjih. Virus je torej v štiriletnem obdobju krožil znotraj reje med okuženimi prašiči in se med razmnoževanjem le malo spreminjal (ugotovljena največja razlika v zaporedju 258 nukleotidov med pozitivnimi vzorci PRRS iz leta 2012 in 2015 je znašala 3,1%). Iz primerjave nukleotidnih zaporedij sevov ugotovljenih v reji 80 med leti 2012 in 2015 smo potrdili, da je v spremljanem obdobju v reji 80 ves čas krožil isti sev virusa genotipa 1e in v rejo v tem obdobju niso bili vneseni novi sevi virusov PRRS (slika 23). Ta podatek potrjuje predhodne objave, da se virus PRRS v isti reji lahko ob ugodnih pogojih zadržuje in razmnožuje tudi več let (26).



Slika 23: Filogenetsko drevo s sevi virusov PRRS iz pozitivne reje 80, v kateri smo ugotovili prisotnost virusov iz podtipa 1e v letih od 2012 do 2015.

3.4.1.1 Genetsko spreminjanje virusa PRRS podtipa 1e v reji 80 v obdobju štirih let

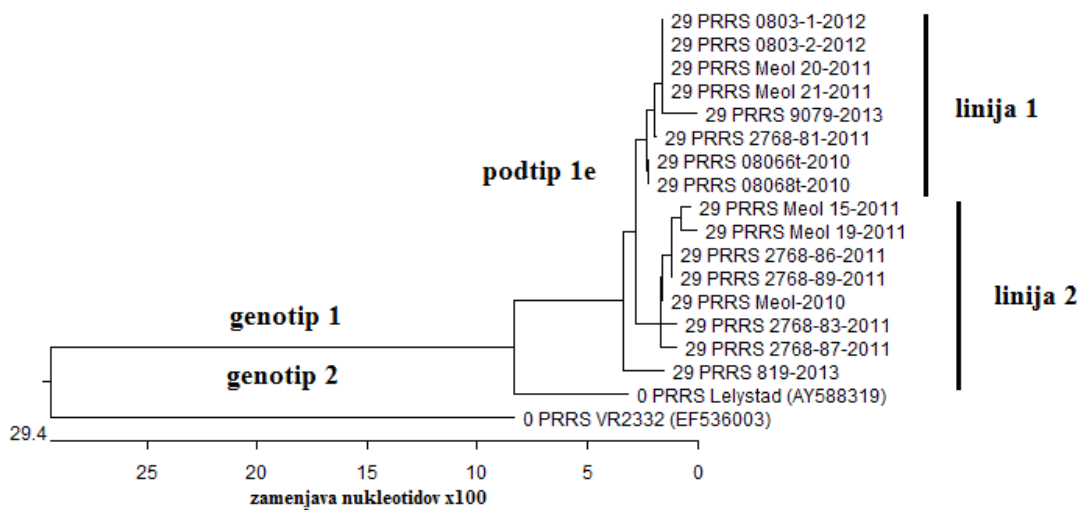
Določitev genetske stabilnosti virusov znotraj nekega obdobja (v našem primeru od leta 2012 do 2015) nam poda pomemben podatek o postopnem spreminjanju nukleotidnega zaporedja istega virusa PRRS v spremljani regiji virusnega genoma. Na filogenetskem drevesu lahko pri reji 80 vidimo primer spreminjanja istega seva virusa PRRS v časovnem obdobju štirih let. Pozitivni vzorci, ugotovljeni v letih od 2012 do 2013, se razlikujejo od 0 do 1,6 % nukleotidov, podobno nizek odstotek razlik pa ugotavljamo v naslednjih dveh letih. Primerjava zaporedja 258 nukleotidov v regiji ORF 7 ugotovljenih sevov PRRS v reji 80 iz leta 2012 in 2015 kaže 96,9 identičnost nukleotidov. Zaključimo lahko, da znotraj reje 80 ugotavljamo od 0 do 3,1 % razlik med sevi PRRS v štiriletnem obdobju.

3.4.2 Pojavljanje virusov PRRS v reji 29 v obdobju od 2010 do 2013

V reji 29 smo v spremljanem obdobju od 2010 do 2013 tipizirali 16 pozitivnih vzorcev. Iz filogenetskega drevesa lahko razberemo, da sta v reji prisotni dve genetski liniji zelo podobnih virusov PRRS, ki so uvrščeni v genotip 1e. Primerjava 9 pozitivnih vzorcev, ugotovljenih v letih od 2010 do 2011 je pokazala, da se znotraj linije 1 pozitivni vzorci med seboj razlikujejo od 0 do 1,5 % nukleotidov. Pozitivni vzorci, ugotovljeni v letih od 2010 do 2013, se znotraj linije 2 prav tako razlikujejo od 0 do 1,5 % nukleotidov.

3.4.2.1 Ugotovitev dveh linij genetsko zelo podobnih sevov PRRS v reji 29

Ob primerjavi podatkov iz leta 2010 ugotovimo, da sta v reji 29 tega leta bila prisotna dva zelo podobna seva PRRS, eden iz linije 1 in eden iz linije 2. Med linijama ugotavljamo 96,3 do 97,4 % identičnost nukleotidnega zaporedja (slika 24). Na podlagi predhodnih podatkov reje 80 lahko potrdimo, da so razlike med ugotovljenimi sevi prevelike, da bi se ta sprememba v spremljanem obdobju zgodila znotraj iste reje. Iz dobljenih podatkov lahko zaključimo, da gre za dva ločena vnosa zelo podobnega virusa PRRS iz podtipa 1e v rejo, ki sta najmanj dve leti istočasno krožila v reji. To potrjujejo tudi podatki, ki smo jih dobili v letu 2011, ko smo še vedno ugotavljali seve virusov PRRS iz obeh linij. V letu 2012 in 2013 pa smo v reji 29 ugotovili le še seve linije 2. Natančnejši pregled razvrstitve sevov iz 67 rej genotipa 1e potrjuje zgornje ugotovitve, saj sta obe liniji na filogenetskem drevesu na ločenih vejah, kar potrjuje, da gre za najmanj dva vnosa virusa PRRS v rejo (ni prikazano na filogenetskem drevesu).



Slika 24: Filogenetsko drevo s sevi virusov PRRS iz pozitivne reje 29, v katerih smo ugotavljali prisotnost virusov linije 1 in linije 2 iz podtipa 1e v letih od 2010 do 2013.

3.4.2.2 Primerjava večjega števila pozitivnih vzorcev iz reje 29, ugotovljenih ob istem vzorčenju

V posameznih rejah smo ob istem vzorčenju ugotovili in tipizirali večje število pozitivnih vzorcev. V primeru prisotnosti enega seva bi dobili genetsko zelo podobna zaporedja (> 97 % identičnost zaporedja), v primeru okuženosti reje za različnimi sevi pa bi dobili manjšo podobnost (< 96 % identičnost nukleotidov). Z rezultati primerjave nukleotidnega zaporedja pozitivnih vzorcev smo dokazali, da gre za dva ločena vnosa virusov PRRS v rejo. Na primeru reje 29 lahko potrdimo smiselno tipizacijo večjega števila pozitivnih vzorcev znotraj reje ob istem odvzemu, saj tako dobimo natančnejše podatke o dogajanju v sami reji. Seveda bi bilo najbolje, če bi tipizirali vse pozitivne vzorce, ki jih v reji ugotovimo, vendar po naših izkušnjah tipizacija več kot treh pozitivnih vzorcev istega odvzema iz okužene reje ne daje dodane vrednosti podatkom. Tipiziranje večjega števila od treh pozitivnih vzorcev ob istem odvzemu posledično ni ekonomsko upravičeno.

3.4.3 Spremljanje virusov PRRS v reji 67 v obdobju od 2011 do 2013

V reji 67 smo leta 2011 ugotovili neobičajen sev virusa PRRS iz genotipa 1n, ki smo ga 2013 ugotovili le še v reji 131. Primerjava sedmih pozitivnih vzorcev, ugotovljenih v reji 67 med leti 2011 in 2013, je pokazala od 99,6 do 100 % identičnost nukleotidov, kar potrjuje podobno stabilnost virusa PRRS v reji, kot smo to ugotavljali v rejah 29 in 80. Pozitiven vzorec virusa PRRS, ki smo ga v letu 2013 ugotovili v reji 131 se od sevov ugotovljenih v reji 67 razlikuje za 1,2 %, kar je neposredni dokaz, da se je reja 131 okužila od reje 67.

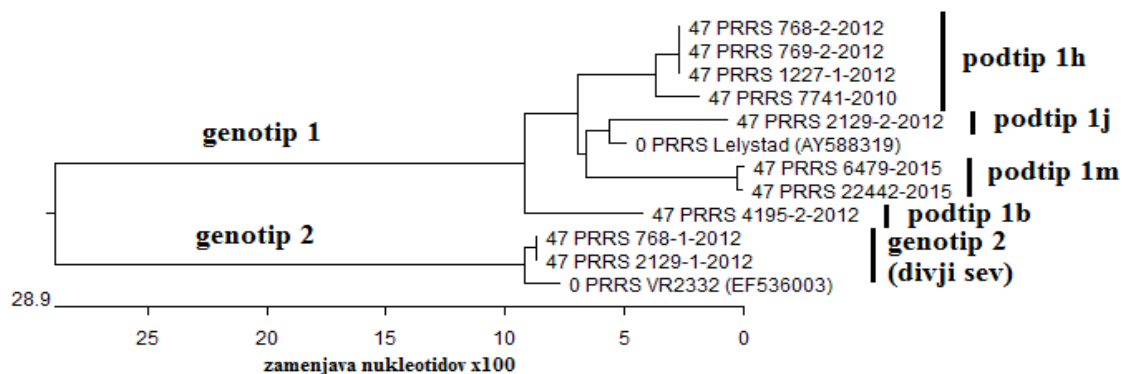
3.4.4 Ugotovitev različnih podtipov virusov PRRS znotraj iste reje

Ugotovitev različnih virusov PRRS znotraj iste reje nam potrjuje domnevo o splošnem neizvajanju ali pomanjkljivem izvajanju preventivnih ukrepov, ki ne preprečujejo vnosa virusov PRRS v rejo. V spremljanem obdobju smo od 178 pozitivnih rej ugotovili 27 (15,1 %) takšnih rej, v katerih smo med leti 2009 in 2015 ugotovili najmanj dva različna podtipa virusov PRRS. Hkrati nam ta podatek potrjuje, da se reja lahko z novim sevom virusa PRRS okuži kljub temu, da v reji že kroži genetsko različen sev virusa PRRS.

3.4.4.1 Ugotovitev petih različnih podtipov virusov PRRS v reji 47 v obdobju od 2010 do 2015

Reja 47 nam služi kot dober pokazatelj, kaj se v reji dogaja, v primeru, ko rejec ne izvaja preventivnih ukrepov za preprečitev vnosa virusa PRRS v že okuženo rejo. V reji 47 smo leta 2010 ugotovili prisotnost virusa PRRS, ki je bil uvrščen v podtip 1h. Isti podtip virusa smo leta 2012 v reji ugotovili še pri treh pozitivnih vzorcih, ugotovljenih v dveh ločenih zaporednih vzorčenjih (med njimi je bila 100 % identičnost). Z virusom PRRS, ugotovljenim v letu 2010, so imeli pozitivni vzorci iz leta 2012 97,3 % identičnost zaporedja nukleotidov, kar potrjuje kroženje istega seva virusa PRRS znotraj reje. Pri prvem vzorčenju leta 2012 smo zraven virusov PRRS iz podtipa 1h ugotovili še virus PRRS uvrščen v genotip 2, med katerima ugotavljamo le 65,1 % identičnost nukleotidov. Med ugotovljenim sevom genotipa 2 in sevom VR2332 smo dokazali 98,1 % identičnost zaporedja nukleotidov, kar je lahko posledica kroženja divjega seva virusa po uporabi cepiva, ki je vsebovalo sev genotipa 2. Glede na velike genetske razlike

(okrog 35 %) med sevi podtipa 1h in cepnim sevom genotipa 2, cepljenje v reji prav gotovo ni bilo uspešno, kar potrjujejo tudi podatki o ugotovitvi prvotnega seva iz podtipa 1h ob drugem vzorčenju v letu 2012. Istega leta (2012) smo pri tretjem vzorčenju ugotovili istočasno prisotnost virusa PRRS iz genotipa 2 (100 % identičnost zaporedja s sevom genotipa 2 iz prvega vzorčenja) in novega virusa PRRS v reji, uvrščenega v podtip 1j, med katerima je le 64,7 % identičnost nukleotidov. Iz teh podatkov lahko potrdimo, da je med prvim in tretjim odvzemom, v reji ves čas krožil virus genotipa 2, reja pa se je nato okužila še s tretjim različnim sevom PRRS v istem letu. Ob četrtem vzorčenju v letu 2012 smo ugotovili novo presenečenje, v reji smo dokazali še četrti sev virusa PRRS, ki spada v podtip 1b, s sevi genotipa 2 ima le 66,7 % identičnost, s sevi iz ostalih dveh podtipov pa od 87,6 do 89,1 % identičnost. V letu 2015 smo v reji 47 pri dveh ločenih vzorčenjih ugotovili sev iz podtipa 1m, med njima pa je 99,6 % identičnost, kar potrjuje, da se je v rejo vnesel nov sev virusa PRRS iz podtipa 1m, ki je tudi sicer najpogosteje ugotovljen sev v okuženih rejah v tem letu (slika 25). Reja 47 dokazuje, kako različna in kompleksna je lahko slika glede okužb z virusi PRRS v spremljanem šestletnem obdobju in koliko različnih sevov PRRS je v tem času v reji krožilo. Vsekakor je glavni razlog za vnašanje vedno novih sevov PRRS pomanjkljivo izvajanje preventivnih ukrepov in po vsej verjetnosti intenzivno nakupovanje živih pozitivnih prašičev v spremljanem obdobju. V letu 2009 smo v reji 32 ugotovili zelo podoben sev (98,4 % identičnost) virusa PRRS kot leta 2010 v reji 47, kar je lahko dokaz, da je bila reja 32 vir okužbe za rejo 47. To podpira tudi podatek, da se reja 32 nahaja v isti občini kot reja 47, poznano pa je, da si rejci lokalno izmenjujejo plemenski material in trgujejo z živimi prašiči. V letu 2012 smo identičen sev virusa ugotovili tudi v reji 56, zato bi lahko bila reja 47 vir okužbe za rejo 56, obe reji pa se nahajata v isti občini.

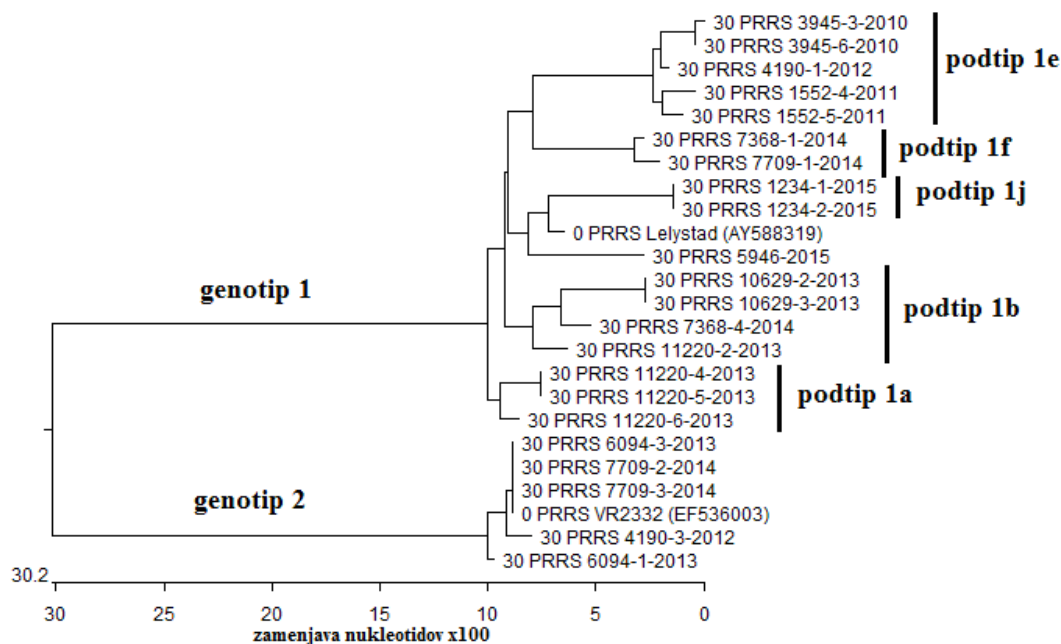


Slika 25: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz pozitivne reje 47, v katerih smo ugotovili prisotnost virusov iz podtipa 1h, 1j, 1m, 1b in genotipa 2, v letih od 2010 do 2015.

3.4.4.2 Ugotovitev šestih različnih podtipov virusov PRRS v reji 30 v obdobju od 2010 do 2015

Podobno kot v reji 47 smo v reji 30 v spremljanem obdobju ugotavljali večje število različnih podtipov virusov PRRS, kar je prav gotovo posledica pomanjkljivega izvajanja preventivnih ukrepov ali odraz nekontroliranega vnosa virusov PRRS v šest letnem obdobju. V obdobju od 2010 do 2012 smo v reji 30 tipizirali pet pozitivnih vzorcev, ki spadajo v podtip 1e, med njimi pa je od 95,7 do 97,7 % identičnost nukleotidov. Glede na to, da gre za rejo z več tisoč prašiči, je nekoliko večji odstotek razlik med pozitivnimi vzorci znotraj iste reje pričakovan in je lahko posledica intenzivnejšega razmnoževanja znotraj iste reje, ni pa tudi izključeno, da se je reja večkrat okužila z zelo podobnimi sevi PRRS iz podtipa 1e. V letu 2012 smo v reji skupaj s sevom iz podtipa 1e dokazali prisotnost virusa PRRS genotipa 2, ki ima 98,5 % identičnost zaporedja s sevom VR2332, kar potrjuje, da gre za cepni sev virusa. Uporaba cepljenja "na slepo" v reji seveda ni dala zadovoljivih rezultatov, saj smo med ugotovljenimi virusi PRRS podtipa 1e in genotipa 2 ugotovili le od 63,2 do 64,7 % identičnost nukleotidov. V reji 30 smo od 2013 do 2014 ugotavljali in tipizirali še štiri pozitivne vzorce virusov PRRS genotipa 2, kar lahko potrjuje večkratno zaporedno izvajanje cepljenja ali pa kroženje divjega virusa genotipa 2, kot posledico cepljenja znotraj reje. V letu 2013 smo v reji 30 na podlagi primerjave ugotovljenih pozitivnih

vzorcev potrdili vnos različnih podtipov virusov PRRS v istem letu. Pri prvem vzorčenju smo v dveh tipiziranih vzorcih ugotovili prisotnost virusov PRRS iz genotipa 2, pri drugem vzorčenju prisotnost virusov iz podtipa 1b, pri tretjem vzorčenju v letu 2013 istočasno prisotnost virusov iz podtipov 1b in 1j. V letu 2014 smo pri prvem vzorčenju dokazali istočasno prisotnost virusov iz podtipa 1b in dodatno še novega seva virusa PRRS, uvrščenega v podtip 1f, pri drugem vzorčenju pa sočasno prisotnost virusov iz podtipa 1f in genotipa 2. Kljub domnevnemu večkratnemu cepljenju (s cepivom, ki vsebuje sev virusa PRRS iz genotipa 2), to ni preprečilo vnašanja novih sevov virusov PRRS v rejo. V letu 2015 beležimo vnos novega seva v rejo, uvrščenega v podtip 1j, ki pa se razlikuje od sevov podtipa 1j, ki so bili v reji ugotovljeni v letu 2013 (med njima ugotavljamo le od 91,1 do 92,2 % identičnost nukleotidov). Ob drugem odvzemu smo v reji ugotovili še en nov sev virusa PRRS, ki spada v podtip 1a, s cepnim sevom genotipa 1 pa ima le 93,4 % identičnost nukleotidov, kar potrjuje, da v tem primeru ne gre za cepljenje, ampak vnos novega divjega seva virusa PRRS v rejo iz podtipa 1a (slika 26). Seveda se postavlja vprašanje, kakšne ukrepe je veterinar v tem času izvajal v reji in na kakšen način bi reševal nastale težave vedno novih okužb z virusom PRRS, če bi ves čas in sproti imel podatke o vnosu genetsko zelo različnih virusov. Dejstvo je, da smo v šestletnem obdobju v isti reji pri prašičih ugotovili kroženje šestih različnih podtipov virusov PRRS, ki so se med seboj razlikovali od 83,7 do 92,2 % (razlike med virusi podtipov 1a, 1b, 1e, 1f, 1j) in od 62 do 64,7 % med virusi genotipa 1 in 2. Vzorčenje smo opravljali le naključno, zato smo s tipiziranimi pozitivnimi vzorci na virus PRRS verjetno zajeli samo del intenzivnega dogajanja v reji, vsekakor pa je reja 30 dokaz, da je brez zaustavitve vnosa vedno novih virusnih sevov PRRS v rejo vsako drugačno zatiranje PRRS v okuženi reji neuspešno.



Slika 26: Filogenetsko drevo s sevi PRRS iz pozitivne reje 30, v katerih smo ugotovili prisotnost virusov iz podtipa 1e, 1f, 1j, 1b, 1a in virusov genotipa 2 v letih od 2010 do 2015.

3.5 POJAVLJANJE DVEH NAJPOGOSTEJE UGOTOVLJENIH PODTIPOV 1e in 1m

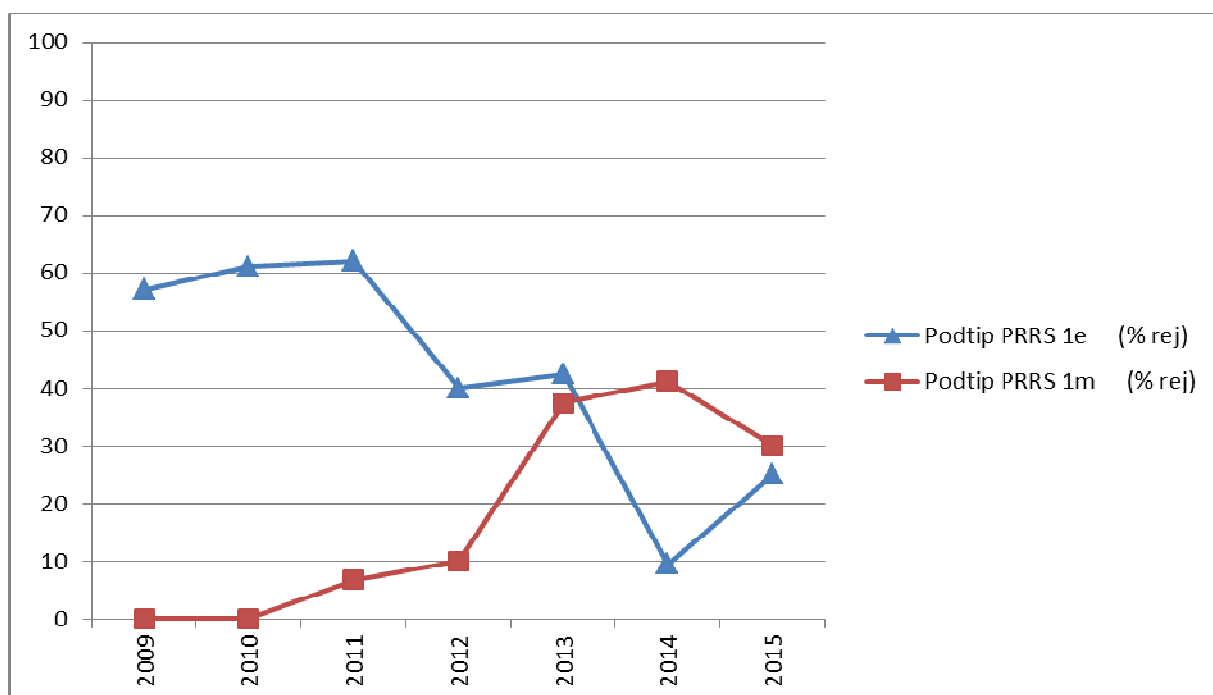
V spremljanem obdobju smo v podtip 1e uvrstili 140 od 394 tipiziranih vzorcev, v podtip 1m pa 69 od 394 tipiziranih vzorcev. Viruse PRRS iz podtipa 1e smo ugotovili v 67 rejah (37,5 %) viruse iz podtipa 1m pa v 49 rejah (27,5%) od 178 okuženih rej prašičev, kar skupaj znaša dve tretjini vseh okuženih rej v spremljanem obdobju od 2009 do 2015 v Sloveniji. Iz analiziranih podatkov ugotavljamo, da je v letu 2009 z virusi PRRS iz podtipa 1e bilo okuženih 57,1 % od pozitivnih rej, v letih 2010 in 2011 je ta odstotek rej še nekoliko narastel, v letu 2012 in 2013 pa upadel na 40 in 42,5 %, medtem ko je v letu 2014 ugotovljenih pozitivnih rej, okuženih s podtipom 1e bilo le še 9,5 %. V letu 2015 se je odstotek pozitivnih rej, v katerih smo ugotovili seve iz podtipa 1e, zopet zvišal na 25 % (tabela 2). To drastično znižanje odstotka po letu 2012 pa ni na račun izboljšanja stanja, glede okužb z virusom PRRS v naših rejah, ampak sovpada s hitrim naraščanjem odstotka okuženih rej s sevom virusa PRRS, uvrščenim v podtip 1m. Viruse PRRS iz podtipa 1m smo v Sloveniji prvič ugotovili v dveh pozitivnih rejah v letu 2011.

V letu 2012 beležimo naraščanje odstotka pozitivnih rej, okuženih s tem virusom, odstotek okuženih rej pa se je še bolj drastično zvišal v letu 2013, ko je že več kot tretjina ugotovljenih pozitivnih rej bila okuženih z virusom PRRS iz podtipa 1m. V letu 2014 se je odstotek pozitivnih rej prašičev okuženih z virusom 1m še nekoliko zvišal in je predstavljal 41,2 % od vseh ugotovljenih okuženih rej v tem letu (tabela 2). Iz spremljanja trendov v sedemletnem obdobju ugotovljamo, da je v naših rejah več let prevladoval sev virusa 1e (v obdobju 2009 - 2012), potem pa ga je nadomestil drug sev virusa iz podtipa 1m (v obdobju od 2013 do 2014). Odstotek pozitivnih rej okuženih s podtipom 1e pa se je v letu 2015 ponovno nekoliko povišal, glede na leto 2014, istočasno pa se je nekoliko znižal odstotek pozitivnih okuženih rej z virusi iz podtipa 1m (slika 27).

Tabela 2: Prikaz števila ugotovljenih pozitivnih rej v posameznem letu, skupaj s podatki o številu in odstotkih ugotovljenih rej, v katerih smo ugotovili viruse PRRS iz podtipa 1e in 1m.

| | Leto 2009 | Leto 2010 | Leto 2011 | Leto 2012 | Leto 2013 | Leto 2014 | Leto 2015* |
|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Vse pozitivne reje | 14 | 36 | 29 | 50 | 40 | 63 | 20 |
| Podtip PRRS 1e (število rej) | 8 | 22 | 18 | 20 | 17 | 6 | 5 |
| Podtip PRRS 1e (% rej) | 57,1 | 61,1 | 62,0 | 40,0 | 42,5 | 9,5 | 25 |
| Podtip PRRS 1m (število rej) | 0 | 0 | 2 | 5 | 15 | 26 | 6 |
| Podtip PRRS 1m (% rej) | 0 | 0 | 6,8 | 10,0 | 37,5 | 41,2 | 30,0 |

V dveh rejah smo ugotovili tudi sočasno okužbo z virusi PRRS iz podtipa 1e in 1m, večina okuženih rej s podtipom 1m, ugotovljenih po letu 2012, pa je popolnoma novih rej, v katerih nismo ugotovili prisotnosti drugih podtipov virusov PRRS. Domnevamo lahko, da gre pri teh rejah za drugačen način vzreje prašičev, ki imajo svoj zaprti krog trgovanja, zato se je virus PRRS iz podtipa 1m lahko v nekaj letih tudi tako uspešno razširil med 49 okuženimi rejami. Seveda pa je število okuženih rej s tem sevom v Sloveniji bistveno večje, kot smo jih ugotovili v naši študiji in v prihodnjih letih bomo lahko prav gotovo še naprej spremljali dinamiko pojavljanja, ohranjanja in širjenja teh sevov znotraj naših rej.



Slika 27. Pojavljanje virusov PRRS iz podtipa 1e in 1m v obdobju od 2009 do 2015. Grafa prikazujeta odstotek ugotovljenih pozitivnih rej v posameznem letu, okuženih z virusi PRRS iz podtipa 1e ali podtipa 1m. Večjo spremembo v pojavljanju smo zabeležili po letu 2012.

3.6 UPORABA CEPLJENJA PROTI VIRUSU PRRS V OKUŽENIH REJAH

Velika genetska raznolikost in hitro spreminjanje virusov PRRS zmanjšuje uspešnost cepljenja, kot enega izmed ukrepov za kontrolo PRRS v okuženih rejah. Cepljenje v okuženi reji z virusom PRRS bi bilo smiselno, v kolikor bi uporabili cepni sev, ki je v nukleotidnem zaporedju več kot 95 % identičen sevu, ki je okužil rejo. Kakor smo že prej ugotovili, izvedeno cepljenje "na slepo", v številnih okuženih rejah ne daje ustrezne zaščite in ne prepreči kroženja virusa PRRS v reji, ampak le nekoliko zmanjša ekonomske škode. Pred uporabo cepljenja bi bilo zato potrebno najprej preveriti genetsko podobnost s cepnim sevom, to je določiti, kateri sev virusa PRRS kroži v posamezni reji in šele potem izbrati ustrezno cepivo, če to obstaja, oziroma k zdravljenju reje pristopiti z uporabo drugih bolj uspešnih načinov, brez uporabe cepljenja.

3.6.1 Cepljenje pozitivnih rej s cepivom, ki vsebuje virus PRRS genotipa 1

Primerjava zaporedij 394 virusov PRRS, v dolžini 258 nukleotidov zelo ohranjene regije virusnega genoma ORF 7 je pokazala veliko genetsko različnost glede na cepni sev virusa PRRS, ki se nahaja v cepivu Progressis in Porcilis PRRS, ki se uporabljata za cepljenje prašičev proti virusu PRRS. V študiji iz leta 2010 smo ugotovili, da gre pri obeh cepivih za prisotnost seva PRRS Lelystad iz genotipa 1, virusa se v obeh cepivih ne razlikujeta med seboj (100 % identičnost zaporedja 258 nukleotidov). Največjo podobnost z uporabljenimi virusi PRRS v cepivu smo ugotovili z virusi PRRS iz podtipa 1a, s katerim imajo od 94,6 do 96,1 % identičnost nukleotidnega zaporedja. Z virusi iz podtipa 1b se že bolj razlikujejo in obe cepivi imata samo še 93,4 % identičnosti v nukleotidnem zaporedju. Večina ugotovljenih sevov PRRS, ki smo jih ugotovili v pozitivnih prašičjih rejah pa ima s cepnimi sevi le od 87,2 do 95,4 % identičnost nukleotidnega zaporedja v regiji ORF 7. Na podlagi velikih genetskih razlik ugotavljamo, da uporabljena cepiva iz genotipa 1 v okuženih rejah ne dajejo zadovoljivih rezultatov, ampak le nekoliko omilijo klinično sliko in posredno zmanjšajo ekonomske škode. Prav gotovo je zato zaščita prašičev po cepljenju slabša tudi zaradi kroženja velikega števila genetsko različnih sevov PRRS v naših rejah. Cepljenje z živim cepivom v pozitivnih rejah pa povečuje tudi možnost nastanka rekombinacij med divjimi in cepnimi sevi PRRS, kar so v Italiji pred nedavnim v številnih primerih že dokazali (34).

3.6.2 Cepljenje pozitivnih rej s cepivom, ki vsebuje virus PRRS genotipa 2

Ugotovitev cepnih in divjih sevov virusov PRRS po letu 2011 v naših rejah, ki spadajo v genotip 2, je posebej zaskrbljujoča, saj obstaja velika verjetnost, da so se ti genetsko zelo drugačni sevi virusov PRRS vnesli v naše okužene reje s cepljenjem ali pa so posledica okužbe z divjim sevom virusa PRRS iz genotipa 2. V izvedeni študiji smo ugotovili, da so v številnih rejah skupaj s sevi PRRS genotipa 2 istočasno prisotni še sevi genotipa 1. To daje slutiti, da so v posameznih okuženih rejah uporabili cepivo, ki vsebuje virus PRRS iz genotipa 2, brez zavedanja, da takšno cepljenje v okuženi reji ne bo uspešno in ne bo dalo zadovoljivih rezultatov. Z vnosom genetsko povsem različnega virusa PRRS pa lahko v reji naredimo še večjo škodo, saj cepiva vsebujejo žive oslABLJENE viruse PRRS, ki pa se v okuženi reji osvežijo in potem nenadzorovano širijo ter

povzročajo nove okužbe. V vsakem primeru bi pred uporabo kakršnega koli cepiva proti PRRS bilo potrebno v okuženi reji najprej ugotoviti, kateri sev virusa PRRS je prisoten in se šele potem odločiti ali je cepljenje reje sploh potrebno.

3.7 POJAVLJANJE PRRS PRI DIVJIH PRAŠIČIH

Prisotnost virusa PRRS so v več evropskih državah dokazali tudi pri divjih prašičih (35). Bolezen PRRS se pri divjih prašičih kaže s podoben klinično sliko, kot jo ugotavljamo pri domačih prašičih, objavljenih pa je bistveno manj natančnih podatkov. Pri divjih prašičih v Belorusiji so ugotovili genetsko zelo različne seve PRRS, ki se od ostalih sevov v Evropi razlikujejo za približno 30 % in se uvrščajo v podtipe 2, 3 in 4 genotipa 1 (7). Z eksperimentalnimi poskusi so dokazali, da imajo ugotovljeni sevi višjo virulenco in povzročajo višjo smrtnost v primerjavi z endemično prisotnimi sevi v evropskih državah. Širjenje in prenos teh genetsko različnih sevov v reje domačih prašičev bi lahko povzročilo še večje ekonomske škode in dodatno težavo v diagnostiki, saj številni testi ne zaznajo teh podtipov virusov PRRS. Divji prašiči bi lahko bili pomemben vir okužbe za domače prašiče na območjih, kjer prihaja do neposrednega stika med domačimi in divjimi prašiči.

4 ZAKLJUČKI

Virus PRRS je podvržen nenehnim genetskim spremembam, ki jih lahko spremljamo z molekularnimi epidemiološkimi študijami, kot smo jih prikazali v izvedenem delu. Na eni strani se zaradi hitrega razmnoževanja virusa v prašičih pojavljajo vedno nove različice virusa PRRS, kar povečuje genetsko raznolikost, na drugi strani pa sodobna vzreja prašičev omogoča širjenje "super-patogenih virusov", ki se lahko hitro raznesejo po državi ali celo izven meja. Zaradi tega sta kontrola bolezni in izvajanje preventivnih ukrepov glavna načina, s katerima se lahko preprečimo nove okužbe prašičjih rej. S pomočjo molekularno epidemiološke študije lahko natančno prikažemo genetsko raznolikost virusov, pojasnimo epidemiološko povezanost med rejami in opišemo zgodovino vnosa posameznega seva PRRS. Potrebno pa je poudariti, da je

takšna obdelava in dostopnost podatkov o nukleotidnih zaporedjih omejena le na posamezne specialiste, ki pa velikokrat niso veterinarji, kaj šele, da bi veterinarji na terenu sproti lahko dobivali najnovejše informacije o pojavljanju virusa na nekem območju. Zaradi tega bi bila rejcem in veterinarjem v veliko pomoč dostopna baza podatkov, ki bi jo sproti posodabljali z najnovejšimi podatki o virusnih sevih in bi bila prosto dostopna preko spletne strani. Seveda pa je potrebno tudi minimalno znanje, ki nam omogoča razumevanje uporabnosti molekularno epidemioloških študij in pripravljena publikacija je lahko prvi korak v to smer.

Molekularno epidemiološka študija temelji na primerjavi nukleotidnih zaporedij 394 pozitivnih vzorcev virusov PRRS, ugotovljenih v 178 različnih slovenskih rejah prašičev. V študijo so zajete vse pozitivne reje od leta 2009 do 2015, v katerih smo dokazali prisotnost virusa PRRS. Iz študije povzamemo naslednje zaključke:

1. Uporabljen tarčna regija virusnega genoma ORF 7 je primerna za diagnostiko in tudi za hitro tipizacijo zelo različnih virusov PRRS iz genotipa 1 in genotipa 2.
2. Medsebojna primerjava zaporedja 258 nukleotidov regije ORF 7, ki smo ga določili s sekvenciranjem pozitivnih vzorcev, daje zanesljive in ponovljive rezultate, ki jih lahko v nadaljevanju uporabimo v molekularno epidemiološki študiji.
3. V obdobju od leta 2009 do 2015 smo v Sloveniji ugotovili genetsko zelo raznoliko skupino virusov PRRS, ki smo jih uvrstili v 14 različnih podtipov genotipa 1, poimenovanih od 1a do 1o. V 12 različnih rejah smo po letu 2011 ugotavljali tudi viruse PRRS, ki spadajo v genotip 2.
4. S študijo ugotavljamo, da je velika genetska različnost virusov PRRS v Sloveniji posledica uvoza okuženih prašičev iz najmanj 70 različnih virov okužbe, verjetno iz različnih evropskih držav.
5. Po vnosu virusov PRRS v Slovenijo so se posamezni sevi (primer podtipa 1e in 1m) zelo hitro razširili v večje število prašičjih rej. Z molekularno epidemiološko študijo lahko na

podlagi medsebojne primerjave nukleotidnega zaporedja pozitivnih vzorcev pojasnimo prenose posameznega seva virusa PRRS med okuženimi rejami.

6. V številnih rejah smo več let zaporedoma tipizirali pozitivne vzorce in ugotavljali genetsko identične seve, ki se med seboj v nukleotidnem zaporedju ne razlikujejo za več kot 3 %, kar potrjuje zelo verjeten prenos virusa PRRS med temi rejami.
7. V nekaterih rejah smo več let zaporedoma ugotavljali pozitivne vzorce in v izvedeni študiji nedvoumno potrdili vnos novih podtipov virusov PRRS v že okužene reje ter dokazali hkratno prisotnost virusov PRRS genotipa 1 in genotipa 2 v isti reji.
8. V večini okuženih rej z virusom PRRS v Sloveniji cepljenje ne daje zadovoljivih rezultatov, ker so sevi PRRS v pozitivnih rejah genetsko različni od cepnih sevov (manj kot 95 % identičnost v nukleotidnem zaporedju).
9. V nekaj rejah smo v pozitivnih vzorcih ugotovili cepni sev virusa PRRS ali njemu genetsko zelo podobni sev virusa. V cepljenih rejah smo hkrati ugotovili tudi prisotnost genetsko oddaljenih divjih sevov virusov PRRS, kar potrjuje uporabo cepljenja "na slepo".
10. V enem primeru smo virus PRRS iz podtipa 1o dokazali tudi pri divjem prašiču, genetsko identičen sev virusa smo isto leto ugotovili tudi v reji pri domačih prašičih, kar potrjuje prenos virusa med domačim in divjim prašičem.

5 LITERATURA

1. Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, et al. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Leystadt virus. *Vet Q* 1991; 13: 121–30.
2. Benfield DA, Nelson E, Collins JE, et al. Characterisation of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATTC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 1992; 4: 127–33.
3. 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.
4. Drew TW, Lowings JP, Yapp F. Variation in open reading frames 3, 4 and 7 among porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the UK. *Vet Microbiol* 1997; 55: 209–21.
5. Indik S, Valiček L, Klein D, Klanova J. Variations in the major envelope glycoprotein GP5 of Czech strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 2000; 81: 2497–502.
6. Oleksiewicz MB, Botner A, Toft P, et al. Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus deletion mutations: correlation with the porcine antibody response to a hypervariable site in the ORF 3 structural glycoprotein. *Virology* 2000; 267: 135–40.
7. 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. *J Gen Virol* 2002; 83: 1861–73.
8. Stadejek T, Oleksiewicz MB, Patapchuk D, Podgorska K. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in Eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J Gen Virol* 2006; 87: 1835–41.
9. Mateu E, Martin M, Vidal D. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains in Spain. *J Gen Virol* 2003; 84: 529–34.
10. Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tatsanakit A, Damrongwatanapokin S. Genetics and geographical variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Vet Microbiol* 2004; 101: 9–21.

11. Pesch S, Meyer C, Ohlinger VF. New insight into the genetic diversity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol* 2005; 107: 31–48.
12. Andreyev VG, Wesley RD, Mengeling WL, Vorwald AC, Lager KM. Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch Virol* 1997; 142: 993–1001.
13. Zhou L, Zhang J, Zeng J, et al. The 30-amino-acid deletion in the Nsp2 of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China is not related to its virulence. *J Virol* 2009; 83: 5156–67.
14. Kim WI, Yoon KJ. Molecular assessment of the role of envelope-associated structural proteins in cross neutralization among different PRRS viruses. *Virus Gen* 2008; 37: 380–91.
15. Stadejek T, Oleksiewicz MB, Scherbakov AV, et al. Definition of subtypes in the European genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Arch Virol* 2008; 153: 1479–88.
16. Shi M, Lam TTY, Hon CC, et al. Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus Res* 2010; 154: 7–17.
17. 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.
18. Mateu E, Martin M, Vidal D. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains in Spain. *J Gen Virol* 2003; 84: 529–34.
19. Balka G, Hornyak A, Balint A, et al. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains circulating in Hungarian swine herds. *Vet Microbiol* 2008; 127: 128–35.
20. Indik S, Schmoll F, Sipos W, Klein D. Genetic variability of PRRS virus in Austria: consequences for molecular diagnosis and viral quantification. *Vet Microbiol* 2005; 107: 171–8.

21. Valenčak Z. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Slovenia: evaluation of serology. *Slov Vet Res* 2004; 41: 99–101.
22. Toplak I, Štukelj M, Zabavnik Piano J, et al. Študija o pojavnosti prašičjega reproduktivnega in respiratornega sindroma (PRRS) v Sloveniji v letu 2010. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, Nacionalni veterinarski inštitut, 2010: 1–40.
23. 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.
24. Zimmerman JJ, Yoon KJ, Wills RW, Swenson SL. General overview of PRRSV: a perspective from the United States. *Vet Microbiol* 1997; 55: 187–96.
25. Štukelj M. Eliminacija prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma (PRRS) z naravno prekužitvijo, serumizacijo in vakcinacijo: doktorska disertacija. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, 2013.
26. Greiser - Wilke I, Fiebig K, Drexler C, Grosse Beilage E. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in selected herds in a pig-dense region of North-Western Germany. *Vet Microbiol* 2010; 143: 213–23.
27. Frossard JP, Hughes GJ, Westcott DG, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: genetic diversity of recent British isolates. *Vet Microbiol* 2013; 162: 507–18.
28. Prickett J, Cutler S, Kinyon JM, et al. Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and antibody in swine oral fluid. *J Swine Health Prod* 2010; 18: 187–95.

29. Toplak I, Štukelj M, Gracieux P, Balka G, Larsen L, Rauh R. Detection of PRRS in 218 field samples using six molecular methods: what we are looking for? In: EuroPRRS Symposium. Proceedings: understanding and combating porcine reproductive and respiratory syndrome in Europe: COST Action FA902. Budapest: Szent István University, Faculty of Veterinary Science, 2012: 34–44.
30. 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: 225–61.
31. Egli C, Thur B, Liu L, Hofmann MA. Quantitative TaqMan RT-PCR for the detection and differentiation of European and North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol Methods* 2001; 98: 63–75.
32. Martinez E, Riera P, Sitja M, Fang Y, Olivera S, Maldonado J. Simultaneous detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. *Res Vet Sci* 2008; 85: 184–93.
33. Drigo M, Franzo G, Gigli A, Martini M, Mondin A, Gracieux P, Ceglie L. The impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus genetic heterogeneity on molecular assay performances. *J Virol Methods* 2014; 202: 79–86.
34. 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.
35. Rodriguez - Prieto V, Kukielka D, Martinez - Lopez B, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in wild boar and Iberian pigs in south-central Spain. *Eur J Wildl Res* 2013; 59: 859–67.