

PRVA UGOTOVITEV IN GENETSKA KARAKTERIZACIJA PRAŠIČJIH BOKAVIRUSOV V SLOVENIJI

Zoran Žlabravec¹, Petra Raspor Lainšček², Danijela Rihtarič³, Ivan Toplak^{3*}

¹Veterinarska fakulteta, ²Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, ³Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

Raziskavo dokazovanja prašičjih bokavirusov (PBoV) smo izvedli na vzorcih blata, odvzetih od 50 živih in 86 poginjenih prašičev iz 54 različnih slovenskih rej. Uvedli in optimizirali smo metodo PCR v realnem času, s katero smo dokazovali nukleinsko kislino PBoV v regiji NP1 virusnega genoma. Prisotnost PBoV smo dokazali pri 38 % živih in 34,9 % vzorcev poginjenih prašičev. Za potrebe tipizacije PBoV smo uvedli klasično metodo PCR za pomnoževanje odseka regije NS1 genoma PBoV v dolžini 680 nukleotidov. 11 pozitivnim vzorcem PBoV iz 5 različnih rej smo uspešno določili nukleotidno zaporedje v dolžini 636 nukleotidov. Primerjava nukleotidnega zaporedja je pokazala 78,5–100 % identičnost in 76,4–100 % identičnost aminokislinskega zaporedja med tipiziranimi sevi v Sloveniji. Ugotovljeni PBoV iz Slovenije so se uvrstili v dve različni genetski skupini znotraj vrste PBoV3; v skupino I PBoV3 smo uvrstili 10 vzorcev, v skupino IV PBoV3 pa en tipiziran vzorec. Novo ugotovljeni sev iz skupine IV PBoV3 ima le 78,5–80,7 % identičnosti nukleotidov s preostalimi sevi iz Slovenije. Genetsko najbližji mu je sev iz Kitajske, s katerim ima le 84 % identičnosti nukleotidnega zaporedja v primerjani regiji. Primerjava nukleotidnega zaporedja PBoV, tipiziranih znotraj istih rej, je pokazala, da sta v dveh rejah istočasno krožila dva genetsko različna seva PBoV, kar je dokaz okužbe reje iz dveh različnih virov.

Ključne besede: prašičji bokavirus; diagnostika; polimerazna; verižna reakcija; filogeneza; Slovenija

Uvod

Z uvozom prašičev iz drugih držav, se v naše reje vnašajo nekateri že znani povzročitelji bolezni, občasno pa zaznavamo tudi nove patogene, s katerimi se prašičje reje v Sloveniji prvič srečujejo. Nekatero od novih povzročiteljev hitro zaznamo, drugi pa predstavljajo precejšen izziv pri kliničnem prepoznavanju bolezni, vzorčenju in diagnostiki. Med novejšo viruse, ki so jih na Švedskem prvič ugotovili leta 2009, spada tudi prašičji bokavirus (PBoV), ki pri prašičih povzroča drisko (1). Genom bokavirusov predstavlja linearna enojnovijačna molekula DNA, ki obsega okrog 5.000 nukleotidov (nt). Ima tri odprte bralne okvirje (ORF), ORF 1, ORF 2 in ORF 3, ki kodirajo štiri proteine. Omenjeni virus so ugotovili tudi pri drugih živalskih vrstah, tudi pri človeku in ima tudi potencialno morebitni zoonotski značaj. Podatkov o razširjenosti okužb s PBoV je v Evropi malo, v Sloveniji pa še ni bila izvedena nobena študija.

Material in metode

V okviru izvedene raziskave smo opravili vzorčenje blata pri 86 poginjenih prašičih in pri 50 prašičih na klavni liniji. Iz 136 vzorcev blata smo izolacijo nukleinskih kislin izvedli z QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Nemčija). Z metodo PCR v realnem času smo dokazovali kratek odsek virusnega genoma v regiji virusnega genoma PBoV, ki kodira nestrukturni protein (NP1). S klasično metodo smo pomnožili odsek virusnega genoma PBoV v dolžini 680 nukleotidov v regiji, ki kodira nestrukturni protein (NS1). Produkta PCR specifične velikosti 14 vzorcev smo očistili in jim z metodo po Sangerju določili nukleotidno zaporedje in s pomočjo računalniškega program DNASTAR uredili posamezno zaporedje.

Rezultati

V vzorcih blata, ki smo jih odvzeli pri poginjenih prašičih, smo PBoV ugotovili pri 30 (34,9 %) od 86 pregledanih vzorcev. Od 50 vzorcev blata prašičev, odvzetih na klavnici pri klinično zdravih pitancih, smo PBoV dokazali pri 19 (38 %) prašičih. 11 pozitivnim vzorcem smo uspešno določili nukleotidno zaporedje v dolžini 636 nt. Glede na razdelitev PBoV, ki jo je postavil Huang s sodelavci (2), so se naši pozitivni vzorci razvrstili v dve različni skupini vrste PBoV3. 10 pozitivnih vzorcev se je uvrstilo v skupino 1 PBoV3, en pozitivni vzorec pa je bil uvrščen v skupino IV PBoV3. V skupini I PBoV3 so poleg naših 10 vzorcev uvrščeni tudi sevi iz ZDA, Hrvaške, Madžarske, Irske in Kitajske. V skupini IV PBoV3 so poleg našega seva uvrščeni tudi sevi iz Irske, Kitajske in ZDA.

Razprava

Prvič smo dokazali prisotnost PBoV pri prašičih v Sloveniji in v laboratorijsko diagnostiko vpeljali molekularne metode za dokazovanje in tipizacijo PBoV. S testiranjem novo uvedene metode PCR v realnem času smo ugotovili, da je metoda zelo učinkovita, ponovljiva, obnovljiva in specifična za dokaz PBoV. Z metodo PCR v realnem času smo dokazali nukleinsko kislino gena NP1 PBoV pri več kot eni tretjini od pregledanih živih in poginjenih prašičev. Zaradi majhnega števila testiranih vzorcev nam ta rezultat ne odraža dejanske prevalence PBoV v Sloveniji, potrjuje pa prisotnost PBoV v večjem številu rej. Za ugotovitev dejanske prevalence bi morali v raziskavo zajeti večje število prašičev s statistično dovolj velikim vzorcem prašičev iz različnih rej. S primerjavo 11 nukleotidnih zaporedij PBoV v dolžini 636 nt iz petih različnih slovenskih rej smo ugotovili prisotnost genetsko zelo heterogenih PBoV, ki so posledica trgovanja med našimi rejami in uvoza iz drugih držav; na ta način se verjetno prenašajo tudi PBoV. Primerjava nukleotidnega zaporedja gena NS1 med bokavirusi je pokazala, da smo pri prašičih ugotovili različne seve, kot so jih leta 2011 v Sloveniji ugotovili pri človeku (3). Prvi dokaz PBoV v Sloveniji, izvedena genetska tipizacija 11 PBoV ter dve novi uvedeni molekularni metodi za dokaz PBoV so dobra izhodišča, na podlagi katerih bodo lahko na tem virusu pri prašičih v prihodnje izvedene nadaljnje študije. Sekvence v dolžini 636 nukleotidov za 11 pozitivnih vzorcev PBoV so na voljo v genski banki pod zaporednimi številkami od KR706506 do KR706516.

Reference

1. Blomstrom AL, Belak S, Fossum C, et al. Detection of a novel porcine boca-like virus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. *Virus Res* 2009; 146: 125–9.
2. Huang J, Mor SK, Erber J, Boss E, Goyal SM. Detection and characterization of porcine bocavirus in the United States. *Arch Virol* 2014; 159: 1797–801.
3. Uršič T, Steyer A, Kopriva S, Kalan G, Krivec U, Petrovec M. Human bocavirus as the cause of a life-threatening infection. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1179–81.

First detection and genetic characterization of porcine bocavirus in Slovenia

In this study the detection of porcine bocavirus (PBoV) was performed on feces samples of 50 live and 86 dead pigs from 54 different Slovenian pig herds. For the detection of nucleic acid of PBoV in NP1 region of viral genome a real-time PCR method was developed and optimised. The nucleic acids of PBoV were detected in 38 % samples of live pigs and in 34,9 % samples of dead pigs. PCR method for amplification of NS1 part of viral genome in a length of 680 nucleotides was implemented for genotyping of PBoV. For eleven positive samples PBoV, collected from 5 different herds, the nucleotide sequence in a length of 636 nucleotides was determined. The comparison of eleven determined sequences from Slovenia showed 78,5–100 % nucleotide identity and 76,4–100 % amino acid identity to each other. Identified PBoV from Slovenia were clustered into two different genetic groups within the species PBoV3. Ten samples were classified into group I PBoV3 and one sample into group IV PBoV3. New strain from group IV PBoV3 was discovered, with 78,5–80,7 % nucleotide identity to other strains from Slovenia. Genetically most closely related strain was from China, with only 84 % nucleotide identity. The comparison of nucleotide sequences PBoV identified within the same herd showed that in two herds genetically two different strain of PBoV were circulated simultaneously, which is the evidence of the introduction of PBoV from two different sources.

Key words: porcine bocavirus; diagnostics; polymerase chain reaction; phylogeny; Slovenia