

**PRIMENA MOLEKULARNIH METODA U DIJAGNOSTICI INFEKCIJE  
SVINJA IZAZVANE SVINJSKIM CIRKOVIRUSOM 2\***  
*THE APPLICATION OF MOLECULAR METHODS IN THE DIAGNOSTICS OF INFECTION  
OF SWINE CAUSED BY PORCINE CIRCOVIRUS 2*

Nišavić Jakov, Zorić Andrea, Milić Nenad\*\*

*Svinjski cirkovirus 2 (PCV2) pripada familiji Circoviridae i rodu Circovirus. Infekcija svinja izazvana ovim virusom se ispoljava u više različitih kliničkih formi dovodeći do značajnih ekonomskih gubitaka u proizvodnji svinja širom sveta. Iz navedenog razloga brza i precizna dijagnostika ove infekcije svinja je od izuzetnog značaja. U te svrhe se danas koriste molekularne metode virusološke dijagnostike kao što su lančana reakcija polimeraze (PCR), zatim metoda real-time PCR, odnosno metoda dierktnog sekvenciranja po Sanger-u.*

*Ključne reči: PCV2, molekularne metode*

**Uvod / Introduction**

**Opšte osobine virusa PCV2 / The general characteristics of viruses**

Svinjski cirkovirus 2 (PCV2) pripada familiji Circoviridae i rodu Circovirus. Poseduje poseduju jednolančani, cirkularni molekul DNK i sferičnog je oblika. Ne poseduje spoljašnji omotač (Segales i sar., 2012). Kapsid virusa PCV2 je ikosaedrične simetrije, a prečnik viriona iznosi od 17nm do 22nm. Genom svinjskog cirkovirusa 2 se sastoji od 1767 do 1768 nukleotida (Larochelle i sar., 2000). On sadži tri otvorena okvira očitavanja - ORF regiona. Region ORF1 (rep geni) nosi informacije za sintezu proteina koji učestvuju u procesu replikacije virusa, a ORF2 (cap geni) region za sintezu proteina kapsida virusa. Treći ORF3 region nosi informacije za sintezu proteina koji najverovatnije učestvuju u procesu apoptoze ćelije indukovane virusom. Na osnovu filogenetske analize genoma svinjskog cirkovirusa tipa 2 utvrđeno je da danas postoje četiri genotipa pomenutog virusa PCV2a, PCV2b, PCV2c i PCV2d (Liu i sar., 2006, Cheung i sar., 2007, Wang i sar., 2009). Dužina genoma PCV2a genotipa virusa iznosi 1768 bp, a dužina genoma PCV2b genotipa iznosi 1767bp. Ovde treba napomenuti da

\* Rad primljen za štampu 14.09.2016.

\*\* Dr sc. vet. med. Jakov Nišavić, vanredni profesor, Andrea Zorić, asistent, dr sc. vet. med. Nenad Milić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija

su kao izazivači infekcija svinja širom sveta utvrđeni različiti genotipovi svinjskog cirkovirusa tipa 2 (Hesse i sar., 2008, Cadar i sar., 2012).

### **Klinička slika / *Clinical signs***

Svinjski cirkovirus tipa 2 kod svinja izaziva oboljenja koja se različito klinički manifestuju u zavisnosti od lokalizacije patološkog procesa i uzrasta svinja. Najčešće oboljevaju prasadi posle zalučenja u uzrastu od 24 meseca. Na osnovu brojnih seroloških studija koje su ranije sprovedene ustanovljeno je da je infekcija svinja izazvana svinjskim cirkovirusom tipa 2 raširena širom sveta, dok je prevalencija kliničke slike mnogo manja (Segales i sar., 2005). Danas je oboljenje izazvano virusom PCV2 najpoznatije kao multisistemski sindrom kržljivosti prasadi posle zalučenja (PMWS-post weaning multisystemic wasting syndrome). Multisistemski sindrom kržljivosti prasadi posle odlučanja (PMWS) je prvi put opisan 1991. godine u Saskatchewanu u Kanadi kao sporadično oboljenje prasadi (Harding i sar., 1997). Ovo novootkriveno oboljenje se manifestovalo pojavom kržljivosti, bledila kože, respiratornih smetnji, a povremeno dijareje i žutice kod odlučene prasadi u tovu (Segales i sar., 2005). Na obdukciji obolelih životinja bile su zapažene karakteristične lezije u većem broju tkiva koje su najviše bile prisutne u limfoidnim organima (Rose i sar., 2012). Pored ovog oblika bolesti, infekcija svinja izazvana svinjskim cirkovirusom 2 se manifestuje i kao dermatitis i nefropatija, odnosno PDNS sindrom (porcine dermatitis and nephropathy syndrome) (Rose i sar., 2012, Allan i sar., 2000). Obolele životinje su anoreksične i depresivne sa blago povišenom ili normalnom telesnom temperaturom (Dupont i sar., 2008). Na koži zadnjih ekstremiteta i u perinealnoj regiji, a nekad i po celom telu mogu se uočiti crvene do ljubičaste makule i papule. Posle određenog vremenskog perioda ove promene na koži bivaju pokrivene tamnim krastama. Nakon otpadanja krasti, kožne lezije ostaju blede, ponekad sa ožiljcima (Segales i sar., 1998). Ovaj oblik cirkovirusne infekcije svinja se javlja kod mladih životinja, svinja u tovu i kod odraslih svinja.

Virus PCV2 kod svinja može izazvati pojavu reproduktivnih poremećaja praćenih abortusima i rađanjem slabo vitalne prasadi (O'Conor i sar., 2001, West i sar., 1999, Brunborg i sar., 2007), promene u vidu proliferativne i nekrotizujuće pneumonije (Segales i sar., 2004), zatim oboljenja respiratornog sistema (Kim i sar., 2003, Harms i sar., 2001), odnosno enteritis sa dijarejom (Kim i sar., 2002, West i sar., 1999).

### **Molekularne metode u dijagnostici infekcije svinja izazvane virusom PCV2 / *Molecular methods in PCV2 diagnostics***

Imajući u vidu sve prethodno navedeno, kao i to da infekcija svinja izazvana virusom PCV2 izaziva značajne ekonomske štete u proizvodnji svinja, nameće se potreba za uvođenjem savremenih laboratorijskih metoda u dijagnostiku ove

virusne infekcije. Ovde se pre svega misli na primenu molekularnih metoda virusološke dijagnostike (lančane reakcije polimeraze – PCR, metode real-time PCR, metoda direktnog sekvenciranja) u cilju brze i pouzdane dijagnostike prisustva svinjskog cirkovirusa 2 u ispitujućim uzorcima. Navedene metode su naročito značajne imajući u vidu i biološke karakteristike virusa PCV2 koji u inokulisanim ćelijskim linijama ne ispoljava jasan citopatogeni efekat, zbog čega se danas, izuzimajući molekularne metode, njegovo prisustvo u uzorcima otkriva metodama imunohistohemije. Ogawa i sar. (2009) su koristili metode multiplex PCR i multiplex RTPCR za detekciju svinjskog cirkovirusa tipa 2, virusa Aujeckijeve bolesti, svinjskog parvovirusa, virusa PRRS, virusa japanskog encefalitisa, svinjskog rotavirusa, virusa epidemične dijareje svinja, virusa transmisibilnog gastroenteritisa i getah virusa u uzorcima poreklom od svinja. Na prisustvo prethodno pomenutih virusa ukupno je ispitano 75 uzoraka i to 33 uzorka organa, 16 uzoraka fecesa i 26 uzoraka pobačenih fetusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je kod 32 uzorka utvrđeno prisustvo svinjskog cirkovirusa tipa 2, kod devet uzoraka prisustvo svinjskog parvovirusa i kod devet uzoraka virusa PRRS. Prisustvo nukleinskih kiselina virusa PPV, PRRS i PCV2 je ustanovljeno kod devet ispitanih uzoraka. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost primene metoda multiplex PCR i multiplex RTPCR u brzom i pouzdanoj dijagnostici virusnih infekcija izazvanih pojedinim DNK i RNK virusima svinja. Maldonado i sar., (2005) su ispitivali uzroke pojave reproduktivnih poremećaja kod svinja u pojedinim delovima Španije. Ispitivani su uzorci poreklom od abortiranih i mrtvorodjenih fetusa u cilju identifikacije virusnih uzročnika koji su doveli do ovih poremećaja. U ispitivanim uzorcima je vršeno otkrivanje prisustva virusa reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja (PRRS), virusa Aujeckijeve bolesti (ADV), svinjskog parvovirusa (PPV) i svinjskog cirkovirusa tipa 2 (PCV2). Ukupno je ispitivano 293 uzoraka poreklom od abortiranih fetusa i mrtvorodjene prasadi. Primenom metode RTPCR, virus PRRS je ustanovljen u devet uzoraka, dok je primenom metode PCR prisustvo virusa PCV2 utvrđeno u jednom uzorku. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da je virus PRRS jedan od najvažnijih infektivnih agenasa koji je uzročnik pobačaja i preranog prašenja u Španiji. Sprovedena ispitivanja su potvrdila da druge vrste virusa (PPV, PCV2 i virus Aujeckijeve bolesti) imaju manji uticaj na razvoj reproduktivnih poremećaja kod svinja. Jiang Y. i sar., (2010) su primenom metode multiplex PCR vršili simultanu detekciju virusa PCV2, virusa svinjske kuge, zatim svinjskog parvovirusa i virusa PRRS. Primenom navedene metode je ispitano sedamdeset šest uzoraka poreklom od svinja starosti od 4 do 12 nedelja, kao i 27 abortiranih fetusa sa 11 farmi iz provincije Zhejiang u Kini. Uzorci za ispitivanja su bili prikupljeni u periodu od juna 2006.godine do jula 2007. godine. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili prisustvo virusa PCV2 u 7 uzoraka, virusa klasične svinjske kuge kod 4 uzorka, dok je prisustvo virusa PRRS i virusa PPV utvrđeno kod 3 uzorka. Mešovita infekcija izazvana virusom PCV2 i virusom PPV je ustanovljena kod dve svinje, virusom PCV2 i PRRS kod 14 svinja, dok je mešovita infekcija izazvana virusom PCV2 i virusom klasične svinjske kuge utvrđena kod 5 uzoraka. Trideset četiri uzorka poreklom od svinja bila su negativna

na prisustvo nukleinskih kiselina prethodno navedenih virusa. Liu i sar., (2013) su primenom multiplex PCR metode vršili otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina nekoliko različitih vrsta virusa. Ukupno je ispitano pedeset osam uzoraka pluća, tonzila, limfnih čvorova i slezina, kao i 24 uzorka abortiranih fetusa. Uzorci su bili poreklom sa 20 farmi svinja u provinciji Fujian u Kini a prikupljeni su u periodu od maja 2011.godine do juna 2012.godine. Primenom prethodno pomenute metode kod 12.19% od ukupnog broja ispitanih uzoraka utvrđeno je prisustvo virusa PRRS i klasične kuge svinja, kod 21.95% uzoraka virusa PRRS i PCV2, dok je kod 13.41% uzoraka bilo ustanovljeno prisustvo virusa klasične kuge svinja i svinjskog cirkovirusa tipa 2. Prisustvo nukleinske kiseline sva tri virusa je utvrđeno kod 3.66% uzoraka. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja, metoda multiplex PCR se pokazala kao brza i pouzdana u brznoj identifikaciji prethodno pomenutih virusa u uzorcima poreklom od svinja i potvrđeno je da se može koristiti u rutinskoj dijagnostici infekcija svinja izazvanih virusom PCV2, klasične kuge svinja i virusom PRRS. Huang i sar., (2013) su primenom multiplex PCR metode ispitali 58 uzoraka limfnih čvorova, tonzila i pluća svinja poreklom od prasadi starosti od 4 do 8 nedelja sa 11 farmi. Prisustvo virusa PCV2 je utvrđeno kod 30 ispitanih uzoraka, virusa PCV1 kod dva uzorka, dok je prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti ustanovljeno u jednom uzorku. Kod osam uzoraka utvrđeno je prisustvo nukleinskih kiselina virusa PCV1 i PCV2, a kod šest uzoraka virusa PCV2 i virusa Aujeckijeve bolesti. Kod tri ispitana uzorka je utvrđeno prisustvo nukleinskih kiselina svinjskog cirkovirusa tipa 2 i svinjskog parvovirusa. Lanlan Zeng i sar., (2013) su primenom metode duplex realtime PCR vršili otkrivanje prisustva svinjskog cirkovirusa tipa 2 i parvovirusa svinja u ispitivanim uzorcima. Mešovita infekcija svinja izazvana delovanjem prethodno navedenih virusa je ustanovljena u 18 ispitanih uzoraka. Od ukupno 72 uzorka semena nerastova, 37 je bilo pozitivno na prisustvo virusa PPV, dok je 35 uzoraka bilo pozitivno na prisustvo virusa PCV2. McKillen J. i sar., (2007) su ispitali četrnaest uzoraka tkiva i organa svinja poreklom iz Severne Irske na prisustvo virusa Aujeckijeve bolesti, virusa afričke svinjske kuge, svinjskog cirkovirusa 2 i svinjskog parvovirusa. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja je potvrđeno da je metoda realtime PCR posebno pogodna za primenu u cilju brzog i preciznog otkrivanja prisustva nukleinskih kiselina prethodno navedenih virusa u uzorcima krvi, seruma, a posebno pojedinih tkiva. U poređenju sa konvencionalnim PCR, ova metoda se pokazala kao osetljivija i specifičnija. Wilhelm S. i sar. (2006) su koristili metodu realtime PCR metodu za detekciju prisustva nukleinske kiseline svinjskog parvovirusa, virusa PCV2, virusa Aujeckijeve bolesti i virusa PRRS u ispitivanim uzorcima. Ispitani su supernatanti ćelija prethodno inokulisanih ispitivanim uzorcima, zatim deset različitih organa prevremeno rođene prasadi i mumificiranih fetusa i to uzorci srčanog mišića, bubrega, pluća, slezine, duodenuma, jejunuma, timusa i limfnih čvorova. Primenom navedene metode je utvrđeno prisustvo nukleinske kiseline svinjskog parvovirusa u svim uzorcima u kojima je prethodno primenom konvencionalne PCR metode ustanovljeno prisustvo pomenutog virusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost primene metode realtime PCR u brznoj i pouzdanoj rutinskoj dijagnostici parvovirusne

infekcije kod svinja, ali i infekcija izazvanih drugim virusa kod svinja. Ramos i sar., (2013) su izvršili molekularnu karakterizaciju sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2 poreklom od svinja sa teritorije Urugvaja. Analizirana je nukleotidna sekvenca cap gena virusa i ustanovljeno je da postoji visok stepen sličnosti između nukleotidnih sekvenci sojeva virusa PCV2 identifikovanih u Urugvaju, odnosno visok stepen sličnosti između urugvajskih sojeva virusa i brazilskih sojeva virusa PCV2. Ispitane nukleotidne sekvence urugvajskih sojeva virusa PCV2 su imale visok stepen sličnosti sa sekvencama argentinskih sojeva virusa koja je iznosila od 99,1 do 99,5%. Argentinski sojevi virusa PCV2 su istovremeno pokazivali visok stepen sličnosti sa sojevima svinjskog cirkovirusa tipa 2 poreklom iz Francuske, Kube, Kanade i SAD. Filogenetska analiza urugvajskih sojeva virusa je pokazala da pripadaju genotipu 2a virusa PCV2. Molekularna karakterizacija sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2 identifikovanih kod svinja na teritoriji Južne Koreje je izvršena od strane Chanhee Chae i sar., (2012). Od ukupno 21 soja virusa, sedamnaest sojeva je pripadalo genotipu PCV2b virusa. Ostali sojevi virusa identifikovani na teritoriji Južne Koreje su pripadali genotipovima PCV2a i PCV2c. Molekularna karakterizacija sojeva virusa PCV2 koji su pripadali genotipu PCV2b je pokazala da postoji visok stepen sličnosti između genoma navedenih sojeva virusa koji se kretao od 94.6% do 99.6%. Wei i sar., (2013) su ispitivali prevalenciju različitih genotipova svinjskog cirkovirusa tipa 2 na području južne Kine u periodu od 2011. godine do 2012.godine. Tokom ispitivanja je izvršena molekularna karakterizacija i filogenetska analiza ukupno 66 sojeva navedenog virusa. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali da su identifikovani sojevi virusa PCV2 pripadali genotipu PCV2a i genotipu PCV2b virusa. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je genotip PCV2b virusa dominantan na području južne Kine. Pored ovoga molekularna karakterizacija identifikovanih sojeva virusa je potvrdila da je postoji značajan stepen sličnosti između nukleotidnih sekvenci ORF2 regiona genoma virusa između sojeva virusa PCV2 koji se kretao od 89.3% do 100%. Vlaskova i sar., (2011) su izvršili molekularnu karakterizaciju sojeva svinjskog cirkovirusa tipa 2 identifikovanih kod svinja na teritoriji Slovačke. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da identifikovani sojevi svinjskog cirkovirusa tipa 2 kod svinja na teritoriji Slovačke pripadaju genotipovima PCV2a i PCV2b navedenog virusa. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da su izolati virusa identifikovani na teritoriji Slovačke veoma slični sa izolatima virusa PCV2 identifikovanih u drugim delovima Centralne i Zapadne Evrope. Laroche i sar., (2002) su izvršili molekularnu karakterizaciju i filogenetsku analizu 34 soja svinjskog cirkovirusa tipa 2 identifikovanih u uzorcima svinja poreklom iz istočnih delova Kanade u periodu od 1990.godine do 2001.godine. Nukleotidne sekvence navedenih sojeva virusa su upoređivane sa analognim sekvencama 36 sojeva virusa PCV2 objavljenih u genskoj bazi podataka. Tokom ispitivanja je utvrđeno da se stepen sličnosti između nukleotidnih sekvenci 34 soja virusa PCV2 identifikovanih kod svinja u Istočnoj Kanadi međusobno kretao od 96% do 100%. Istovremeno, navedeni sojevi virusa su bili slični sa sojevima virusa identifikovanih na području Zapadne Kanade, SAD, Evrope i Azije. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili da

je ORF1 region genoma virusa visoko konzerviran kod svih ispitanih sojeva virusa PCV2, odnosno da se stepen sličnosti između navedenog regiona kod identifikovanih sojeva virusa kretao od 97% do 100%. Analizirajući stepen sličnosti nukleotidnih sekvenci ORF2 regiona genoma identifikovanih sojeva virusa PCV2 ustanovljeno je da se isti kod svih ispitanih sojeva navedenog virusa kretao od 91% do 100%. Tokom opsežnih ispitivanja sprovedenih od strane Lukač i sar., (2016) ispitano je četrdeset uzoraka organa poreklom od nevakcinisanih svinja sa teritorije Republike Srpske. Prisustvo virusa PCV2 je utvrđeno kod šest uzoraka. Metodom sekvenciranja po Sanger-u i filogenetskom analizom je ustanovljeno da virusi PCV2 identifikovani kod svinja u Republici Srpskoj pripadaju genotipu PCV2c i da imaju visok stepen sličnosti sa italijanskim, nemačkim i kineskim sojevima navedenog virusa.

#### **Zaključak / Conclusion**

Dobijeni rezultati ispitivanja više autora su potvrdili opravdanost primene molekularnih metoda (PCR, real-time PCR, metoda sekvenciranja) u brznoj i pouzdanoj dijagnostici infekcije svinja izazvane svinjskim cirkovirusom 2. Pored identifikacije sojeva virusa PCV2 prisutnih u ispitujućim uzorcima, primenom navedenih metoda omogućena je i molekularna karakterizacija sojeva navedenog virusa, odnosno određivanje njihove pripadnosti određenom genotipu virusa PCV2.

#### **Zahvalnica / Acknowledgement**

Rad je finansiran od strane Ministarstva nauke i prosvete Republike Srbije, projekat broj 31008

#### **Literatura / References**

1. Allan GM, Ellis J A. Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2000; 12 (1): 3-14.
2. An DJ, Roh IS, Song DS, Park CK, Park BK. Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus research* 2007; 129 (2): 115-22.
3. Brunborg I M, Jonassen C M, Moldal T, Bratberg B, Lium B, Koenen F, Schönheit J. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 2007; 19 (4): 368-75.
4. Cadar D, Csagola A, Lorincz M, Tombacz K, Spinu M, Tuboly T. Detection of natural inter-and intra-genotype recombination events revealed by cap gene analysis and decreasing prevalence of PCV2 in wild boars. *Infection, Genetics and Evolution* 2012; 12(2): 420-7.
5. Caprioli A, McNeilly F, McNair I, Lagan-Tregaskis P, Ellis J, Krakowka S, Allan G. PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal swabs from experimentally infected pigs. *Research in veterinary science* 2006; 81 (2): 287-92.
6. Chae C. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application. *The Veterinary Journal* 2012; 194(2): 151-57.
7. Cheung A, Lager M, Kohutyuk O I, Vincent A L, Henry S C, Baker R B, Dunham A G. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Archives of virology* 2007; 152 (5): 1035-44.

8. Dupont K, Nielsen E O, Baekbo P, Larsen L E. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case–control study supports a shift in genotypes with time. *Veterinary microbiology* 2008; 128 (1): 56-64.
9. Harding JC, Clark EG. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod* 1997; 5(5): 201-3.
10. Harms PA, Sorden SD, Halbur P G, Bolin S R, Lager K M, Morozov I, Paul P S. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Pathology Online* 2001; 38 (5):528-39.
11. Hesse R, Kerrigan M, Rowland R. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus research* 2008; 132 (1): 201-7.
12. Huang Y, Shao M, Xu X, Zhang X, Du Q, Zhao X, Tong D. Evidence for different patterns of natural inter-genotype recombination between two PCV2 parental strains in the field. *Virus research* 2013; 175(1), 78-86.
13. Jiang Y, Shang H, Xu H, Zhu L, Chen W, Zhao L., Fang L. Simultaneous detection of porcine circovirus type 2, classical swine fever virus, porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs by multiplex polymerase chain reaction. *The Veterinary Journal* 2010; 183 (2): 172-5.
14. Kim J, Chung H K, Chae C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary Journal* 2003; 166 (3):251-6.
15. Kim J, Chung HK, Jung T, Cho WS, Choi C, Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *Journal of Veterinary Medical Science* 2002; 64 (1):57-62.
16. Larochelle R, Bielanski A, Müller P, Magar R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *Journal of clinical microbiology* 2000; 38 (12): 4629-32.
17. Larochelle R, Bielanski A, Müller P, Magar R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *Journal of clinical microbiology* 2000; 38 (12): 4629-32.
18. Liu J, Chen I, Du Q, Chua H, Kwang J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *Journal of Virology* 2006; 80 (10): 5065-73.
19. Liu J, Chen I, Du Q, Chua H, Kwang J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *Journal of Virology* 2006; 80 (10): 5065-73.
20. Lukač B, Knežević A, Milić N, Krnjaić D, Veljović Lj, Milićević V, Zorić A, Đurić S, Stanojević M, Nišavić J. Molecular detection of PCV2 and PPV in pigs in Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina. *Acta veterinaria* 2016; 66 (1):51-60.
21. Maldonado J, Segales J, Martinez-Puig D, Calsamiglia M, Riera P, Domingo M, Artigas C. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. *The Veterinary Journal* 2005; 169 (3): 454-6.
22. McKillen J, Hjertner B, Millar A, McNeilly F, Belák S, Adair B, Allan G. Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses. *Journal of virological methods* 2007; 140 (1): 155-65.
23. Molitor TW, Oraveerakul K, Zhang QQ, Choi CS, Ludemann LR. Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus. *Journal of virological methods* 1991; 32 (2-3): 201-11.
24. O'Connor B, Gauvreau H, West K, Bogdan, J, Ayroud M, Clark E G, Ellis J A. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *The Canadian Veterinary Journal* 2001; 42 (7): 551.
25. Ogawa H, Taira O, Hirai T, Takeuchi H, Nagao A, Ishikawa Y, Ueda S. Multiplex PCR and multiplex RT-PCR for inclusive detection of major swine DNA and RNA viruses in pigs with multiple infections. *Journal of virological methods* 2009; 160(1), 210-14.
26. Ramos, N, Mirazo S, Castro G, Arbiza J. Molecular analysis of Porcine Circovirus Type 2 strains from Uruguay: Evidence for natural occurring recombination. *Infection, Genetics and Evolution* 2013; 19: 23-31.

27. Rose N, Opriessnig T, Grasland B, Jestin A. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus research* 2012; 164(1): 78-89.
28. Rose N, Opriessnig T, Grasland B, Jestin A. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus research* 2012; 164(1): 78-89.
29. Segales J, Allan G M, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews* 2005; 6(02): 119-42.
30. Segales J, Piella J, Marco E, Mateu-de-Antonio E M, Espuna E, Domingo M. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *The Veterinary Record* 1998; 142 (18): 483-6.
31. Segales J, Rosell C, Domingo M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Veterinary microbiology* 2004; 98(2): 137-149.
32. Segales J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus research* 2012; 164 (1): 10-19.
33. Soares RM, Durigon EL, Bersano JG, Richtzenhain LJ. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *Journal of virological methods* 1999; 78 (1):191-98
34. Vlasakova M, Jackova A, Vilcek S. Genetic typing of porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from Slovakia. *Research in veterinary science* 2011; 90(1): 168-73.
35. Wang F, Guo X, Ge X, Wang Z, Chen Y, Cha Z, Yang H. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus research* 2009; 145(1): 151-6.
36. Wei C, Zhang M, Chen Y, Xie J, Huang Z, Zhu W, Zhang G. Genetic evolution and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 infections in southern China from 2011 to 2012. *Infection, Genetics and Evolution* 2013; 17: 87-92.
37. West K H, Bystrom J M, Wojnarowicz C, Shantz N, Jacobson M, Allan G M Konoby C. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1999; 11 (6): 530-2.
38. Wilhelm S, Zimmermann P, Selbitz HJ, Truyen U. Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *Journal of virological methods* 2006; 134 (1): 257-60.
39. Zheng L L, Wang Y, Li M F, Chen H Y, Guo X P, Geng, J W, Cui B A. Simultaneous detection of porcine parvovirus and porcine circovirus type 2 by duplex real-time PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. *Journal of virological methods* 2013;187 (1):15-9.

ENGLISH

## THE APPLICATION OF MOLECULAR METHODS IN THE DIAGNOSTICS OF INFECTION OF SWINE CAUSED BY PORCINE CIRCOVIRUS 2

Nišavić Jakov, Zorić Andrea, Milić Nenad

Porcine circovirus 2 (PCV2) belongs to the family Circoviridae, genus Circovirus. Infection of swine caused by this virus is manifested in several different clinical forms, leading to significant economic losses in swine production worldwide. For this reason, prompt and precise diagnostics of this swine infection is of great importance. For this purpose today there are used molecular methods of virological diagnostics such as polymerase chain reaction (PCR), and real-time method PCR, that is direct sequencing method by Sanger.

Key words: PCV2, molecular methods

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ  
ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ, ВЫЗВАННОЙ СВИНЫМ ЦИРКОВИРУСОМ 2 ТИПА**

**Нишавич Яков, Зорич Андреа, Милич Ненад**

Свиной цирковиром 2 типа (PCV2) относится к семейству Circoviridae и роду Circovirus. Инфекционное заболевание свиней, вызываемое этим вирусом, проявляется в различных клинических формах, последствием чего является существенный экономический ущерб, наносимый свиноводству во всем мире. По этой причине быстрая и точная диагностика этой инфекции свиней имеет исключительно важное значение. Для этой цели сегодня используются молекулярные методы вирусологической диагностики, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР/PCR), затем метод ПЦР в режиме реального времени, и метод прямого секвенирования по Сэнгеру.

Ключевые слова: PCV2, молекулярные методы