

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
Katedra za patološku morfologiju



mr Žolt BEČKEI

DETEKCIJA I TKIVNA DISTRIBUCIJA
NUKLEINSKE KISELINE I *Cap* ANTIGENA
CIRKOVIRUSA-2
KOD DOMAĆIH I DIVLJIH SVINJA

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
Department of pathology



mr BECSKEI Zsolt

DETECTION
AND TISSUE DISTRIBUTION OF
THE NUCLEIC ACID AND *Cap* ANTIGEN
OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 IN
DOMESTIC SWINE AND WILD BOARS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

Mentor:

Prof. dr Milijana Knežević, redovni profesor u penziji,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd

Članovi komisije:

Prof. dr Sanja Aleksić-Kovačević, Fakultet veterinarske medicine
Univerziteta u Beogradu, Beograd

dr Vojin Ivetić, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo
Srbije, Beograd

dr Tamaš Petrović, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo
„Novi Sad“, Novi Sad

Datum odbrane: 26. 11. 2012.

Beograd

**Ovaj rad posvećujem
mojoj dragoj Jeleni**

.....

ZAHVALNOST

Završavajući disertaciju izražavam zahvalnost, ravnopravno, Fakultetu Veterinarske Medicine u Beogradu i Veterinarskom Specijalističkom Institutu "Subotica" u Subotici, dvema institucijama koje su imale najveći uticaj na moje stručno usavršavanje.

Zahvaljujem se svom uvaženom mentoru, prof. dr Milijani Knežević, najpre na pomoći pri odabiru teme, a zatim na stručnoj podršci, korisnim savetima i ne retkim, strogim kritikama pomoću kojih je ova disertacija poprimila svoj završni oblik.

Pomoć svih mojih kolega iz Veterinarskog specijalističkog instituta „Subotica“, u početku na čelu sa Horváth Józsefom, zatim Rudinski Petrom, bila je od neprocenjivog značaja.

Zahvaljujem se članovima komisije dr Sanji Aleksić-Kovačević, dr Tamašu Petroviću i dr Vojinu Ivetiću na edukaciji i korisnim konsultacijama vezanim za dijagnostiku cirkovirusnih oboljenja domaćih i divljih svinja.

Zahvalnost izražavam dr Dinku Novoselu iz Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu, zatim dr Rusvai Miklósu, dr Jakab Csabi, dr Tuboly Tamásu i dr Cságola Attili sa Fakulteta veterinarske medicine u Budimpešti, na ukazanim usmerenjima i potpori prilikom izvođenja imunodijagnostičkih ispitivanja.

Svojom podrškom i sugestijama kolektiv Katedre za bolesti papkara doprineo je boljem sagledavanju problematike obrađene u ovoj disertaciji.

Dragocena je bila lektorska pomoć mog dragog kolege dr Milovana Katrinke.

Od velike pomoći je bila tehnička podrška i praktični saveti Snežane Stevanović i Milice Vukelić prilikom pripreme i procesuiranja uzoraka za dalja ispitivanja.

Konsultacije sa dr Miloradom Mirilovićem bile su dragocene i omogućile su adekvatnu statističku obradu dobijenih rezultata.

Zahvalnost izražavam i Molnár Peteru i Székej Krisztiánu za nesebičnu pomoć prilikom tehničkog uređivanja fotografija i teksta.

Na kraju, veliku zahvalnost izražavam svojoj porodici, roditeljima i bratu, takođe mojim dekama i bakama, koji su sve vreme mog školovanja imali poverenja u mene i bili su puni podrške i razumevanja.

Moja draga Jelena zaslužuje posebnu zahvalnost, ne samo zbog toga što je duže od jedne decenije inspiracija mojih ambicija, već i zbog neiscrpnog razumevanja i beskrajne ljubavi koju nesebično iz dana u dan daruje čineći me veoma srećnim.



.....

DETEKCIJA I TKIVNA DISTRIBUCIJA NUKLEINSKE KISELINE I *Cap* ANTIGENA CIRKOVIRUSA-2 KOD DOMAĆIH I DIVLJIH SVINJA

REZIME

U Srbiji cirkovirusne infekcije su nedovoljno istražene. Postoje oskudni podaci o prisustvu PCV2 u pojedinim zpatima, ali je veoma malo saznanja o prisustvu PCVAD (oboljenja koja su u uzročnoj vezi sa PCV2) u zapatima domaćih svinja. Nema podataka o prevalenciji cirkovirusnih infekcija i o prisustvu PCVAD kod divljih svinja. Od 2011. godine u Srbiji registrovana je i komercijalno dostupna vakcina, te je imunoprofilaksa od nedavno jedna od mogućih mera u prevenciji cirkovirusnih oboljenja.

Stoga su u ovom radu ispitani limfatični i nelimfatični organi 60 domaćih svinja, sa kliničkim znacima sistemskog oblika PCVAD, tj. multisistemskog sindroma kržljanja zalučene prasadi (PMWS), uzrasta od jedan do pet meseci, koja su poticala sa osam farmi različitog lokaliteta epizootiološkog područja Severno-bačkog okruga; zatim 60 divljih svinja različite starosti, odstreljenih u dva lovišta na epizootiološkom području Severno-bačkog okruga, u periodu 2005-2010. godine; i po 10 zdravih domaćih i divljih svinja koje su činile kontrolnu grupu. Za histopatološku, imunohistohemijsku analizu i hibridizaciju *in situ* od domaćih i divljih svinja uzorkovani su limfatični organi (submandibularni, medijastinalni, mezenterijalni i ingvinalni superficijalni



.....

limfni čvorovi, tonzile, slezina i limfatično tkivo creva), a od nelimfatičnih organa pluća, srce, jetra i bubrezi. Prisustvo PCV2 u uzorcima prvo je ispitano PCR metodom. Tkivni uzorci domaćih i divljih svinja, koji su predviđeni za patohistološku, imunohistohemijsku i *in situ* hibridizacionu analizu, fiksirani su u neutralnom formalinu i ukalupljeni u parafinske blokove. Parafinski iseći debljine oko 5 μm bojeni su hematoksilin-eozin metodom. Od imunohistohemijskih metoda korišćena je trostepena streptavidin-biotin metoda (LSAB2) uz upotrebu monoklonskog antitela za PCV2 (Porcine Circovirus Type 2, Rural Technologies, Inc. Brookings, SD) u razređenju 1:500, u trajanju od 60 minuta na sobnoj temperaturi. Kao kit za detekciju korišćen je Dako Cytomation LSAB2 system-HRP. Nakon blokiranja endogene peroksidaze izvršeno je demaskiranje antigena primenom proteinaze K (Dako Proteinase K, Ready-to-use) u trajanju od četiri minuta. Vizuelizacija reakcije postignuta je za 10 do 15 minuta primenom diaminobenzidina (DAB+, Dako). Kontrastiranje isečaka izvršeno je u hematoksilinu (Mayerov hematoksilin) u trajanju od dve sekunde. Hibridizacija *in situ* urađena je na parafinskim tkivnim isečcima debljine 4 μm , nakon predtretmana sa pepsinom u trajanju od 10 minuta (Sigma) na 37°C. Hibridizacija virusnog genoma izvršena je primenom dve specifične vrste genomskih proba. Digoksigeninom obeležene oligonukleotidne genomske DNK probe, sastavljene od po 41 nukleotidne baze (PCV2 CP, 1017255, TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH i PCV2 RPF, 1017256, TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH). Hibridizacija virusnog genetskog materijala sa genomskom probom izvršena je u trajanju od 60 minuta na 37°C. Za vezivanje korišćen je Anti digoxigenin AP Fab fragment (Ref 11093274910, Roche Diagnostics) kao deo komercijalnog kita. Vizuelizacija reakcije postignuta je primenom komercijalnog NBT/BCIP kita za vizuelizaciju (Ref 11681451001, Roche Diagnostics). Kontrastiranje isečaka izvršeno je upotrebom Fast Green-a u trajanju od šest do sedam minuta.



.....

Makroskopskim pregledom organa domaćih svinja, sa manifestnim znacima kržljanja, najčešće je uočeno uvećanje svih limfnih čvorova, pneumonije različitog karaktera i intenziteta, zapaljenja želuca i creva, i poliserozitisi.

Najučestalije patomorfološke promene, u vezi sa cirkovirusnom infekcijom, uočene kod divljih svinja su pneumonije različitog karaktera i intenziteta, uglavnom sa prisutnim parazitima u bronhijama, zapaljenja gastrointestinalnog trakta i povremeno limfadenopatija.

Mikroskopskim ispitivanjem limfnih čvorova i ostalih limfatičnih tkiva domaćih i pojedinih divljih svinja uočena je deplecija limfocita različitog intenziteta. Takođe, zapažena je infiltracija makrofaga na mestu iščezlih limfocita u limfnim folikulima, peri i parafolikularnim zonama. Uočeno je prisustvo infektivnih granuloma sa multijedarnim džinovskim ćelijama. U promenjenom limfatičnom tkivu domaćih i divljih svinja, pre svega u citoplazmi nagomilanih makrofaga, imunohistohemijskom metodom, utvrđena je velika količina *Cap* antigena PCV2 u vidu precipitata smeđe boje. Hibridizacijom *in situ*, u promenjenom tkivu, potvrđeno je prisustvo genoma PCV2 koji je uglavnom u fazi mirovanja, ređe u fazi replikacije. Genom PCV2 u fazi mirovanja (jednolančana DNK PCV2) zapažen je pre svega intracitoplazmatski lokalizovan, uglavnom u makrofagama i epitelnim ćelijama, koji se uočavao u vidu nakupina precipitata plave boje. Replikativna forma PCV2 (dvolančana DNK PCV2) utvrđena je u mnogo manjem broju ćelija limfatičnog tkiva, uglavnom u limfocitima, ređe i makrofagama, intranuklearno lokalizovan, u vidu precipitata plave boje. U makrofagama, ponekad je moguće uočiti osim jedarne i intracitoplazmatsku pozitivnu reakciju na prisustvo replikativne forme PCV2.

Deplecija limfocita i prisustvo velikog broja makrofaga koji sadrže virusne partikule, osim u limfnim čvorovima, zapaženo je i u tonzilama, slezini i limfatičnom tkivu creva domaćih i nekih divljih svinja.



.....

Glavna histopatološka promena u nelimfatičnim organima domaćih i divljih svinja je nalaz mononuklearnog ćelijskog infiltrata, s tim da je prisustvo virusnoga antigena i genoma PCV2, uglavnom u citoplazmi makrofaga, a sporadično i u jedru prisutnih limfocita. Imunohistohemijskom metodom i tehnikom hibridizacije *in situ* dokazano je da PCV2 pokazuje lokalizaciju i tropizam prvenstveno prema ćelijama monocitno-makrofagnog sistema i epitelnim ćelijama, uključujući epitelne ćelije bubrežnih tubula, žučnih kanalića, hepatocite, enterocite i bronhoalveolarni epitel.

Korišćenjem PCR tehnike, histopatološkog pregleda, imunohistohemijske analize i hibridizacije *in situ*, dokazano je prisustvo oboljenja PCVAD u populacijama domaćih svinja. Takođe, po prvi put u Srbiji, utvrđeno je da se oboljenja PCVAD javljaju i u populacijama divljih svinja. Dobijeni rezultati svedoče o prisustvu oboljenja domaćih i divljih svinja prouzrokovanih cirkovirusom svinja tip 2, na podneblju Severno-bačkog okruga Republike Srbije, što potvrđuje ranije nalaze, koji su ukazivali na prisustvo cirkovirusnih infekcija svinja u našoj zemlji.

Ključne reči: PCVAD, PMWS, PCV2, *Cap* antigen, jednolančana DNK PCV2, dvolančana DNK PCV2, imunohistohemija, hibridizacija *in situ*, divlje svinje, domaće svinje.

Naučna oblast: Klinička patologija i terapija životinja

Uža naučna oblast: Patološka morfologija

UDK broj: 619:616



.....

DETECTION AND TISSUE DISTRIBUTION OF THE NUCLEIC ACID AND *Cap* ANTIGEN OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 IN DOMESTIC SWINE AND WILD BOARS

SUMMARY

Porcine circovirus associated diseases (PCVAD) are widespread throughout the world and cause significant economic losses in intensive swine production. The causative agent playing a key role in their pathogenesis is porcine circovirus type 2 (PCV2).

Circovirus infections are insufficiently explored in Serbia. There is information about the presence of PCV2 in some swine herds, but very little knowledge exists about the presence and extent of PCVAD in domestic swine herds, and no data are available on the prevalence and incidence of PCV2 infection in wild boars. Since 2011, a vaccine against PCV2 infection has been registered and commercially available in Serbia. Thus, immunoprophylaxis is one of the possible measures to prevent the diseases caused by circovirus.

Therefore, the lymphatic and non-lymphatic organs of 60 domestic swine aged one to five months and showing clinical signs of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) were examined in this study. The pigs originated from eight different farms in the epizootiological area of North Bačka County. We also examined 60 wild boars of different ages, sacrificed in two hunting area of the North Bačka County in the period 2005–2010, as well as



.....

10 healthy domestic swine and 10 healthy wild boars that comprised the control group.

For histopathological and immunohistochemical analysis as well as *in situ* hybridisation, the lymphatic organs (submandibular, mediastinal, superficial inguinal and mesenteric lymph nodes, tonsils, spleen and intestinal lymphatic tissue) of domestic swine and wild boars were sampled. Of the non-lymphatic organs, samples were taken from the lungs, the heart, the liver and the kidneys as well. The presence of PCV2 was first investigated in the spleen and superficial inguinal lymph node samples using PCR. Tissue samples from domestic swine and wild boars, which were designated for histopathological and immunohistochemical examination and *in situ* hybridisation, were fixed in neutral buffered formalin and moulded in paraffin blocks. About 5 microns thick paraffin sections were stained with haematoxylin and eosin. Of the immunohistochemical methods, the three-stage streptavidin-biotin method (LSAB2) was applied, using monoclonal antibodies to PCV2 (porcine circovirus type 2, Rural Technologies, Inc., Brookings, SD) at 1:500 dilution, for 60 minutes at room temperature. As a detection kit, the Dako Cytomation LSAB2 system-HRP was used. After blocking endogenous peroxidase, antigen unmasking was performed using proteinase K (Dako proteinase K, ready-to-use) for 4 minutes. Visualisation of the reaction was achieved in 10 to 15 minutes using diaminobenzidine (DAB+, Dako). The sections were counterstained with haematoxylin (Mayer's haematoxylin) for two seconds.

In situ hybridisation was performed on 4 microns thick paraffin tissue sections after pretreatment with pepsin (Sigma) at 37 °C for 10 minutes. Hybridisation of the viral genome was performed using two specific types of genomic probes, digoxigenin-labelled oligonucleotide genomic DNA probes comprising 41 nucleotide bases (PCV2 CP, 1017255, TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH and PCV2 RPF, 1017256, TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH). Hybridisation of the viral genetic material to the genomic probe was



.....

performed at 37 °C for 60 minutes. For binding, Anti-digoxigenin AP Fab fragment was used (Ref. 11093274910, Roche Diagnostics) as part of a commercial kit. Visualisation was achieved using the reaction of the commercial NBT/BCIP kit (Ref. 11681451001, Roche Diagnostics). The sections were counterstained with Fast Green for 6–7 minutes.

Macroscopic examination of organs from domestic swine with overt signs of wasting revealed the enlargement of lymph nodes, pneumonia of different character and severity, inflammation of the stomach and intestines, and polyserositis. The most frequent pathomorphological changes observed in wild boars were pneumonia of different character and severity, generally with the presence of parasites in the bronchi, inflammation of the gastrointestinal tract and, occasionally, lymphadenopathy.

Microscopic examination of the lymph nodes and other lymphoid tissues of some domestic swine and wild boars demonstrated lymphocyte depletion of varying intensity. In addition, macrophage infiltration was observed at the place of the vanished lymphocytes in the lymph follicles as well as in the peri- and parafollicular zones. The presence of typical granulomas with giant multinuclear cells was often observed. By immunohistochemical examination of altered lymphatic tissues from domestic swine and wild boars, a large amount of PCV2 viral *Cap* antigen was found as a brown precipitate, primarily in the cytoplasm of accumulated macrophages. *In situ* hybridisation performed in the altered tissues confirmed the presence of PCV2 viral genome, which was mainly in the resting phase and less frequently in the phase of replication. PCV2 genome in the resting phase (ssDNA PCV2) was observed primarily in the cytoplasm of macrophages and epithelial cells in the form of clusters of blue precipitates. The replicative form of PCV2 (dsDNA PCV2) was found in a much smaller number of lymphatic tissue cells, mainly in lymphocytes, macrophages and less frequently in epithelial cells, located intranuclearly in the form of blue precipitates.



.....

In the macrophages, it was sometimes possible to detect not only an intranuclear but also an intracytoplasmic positive reaction to the presence of PCV2 dsDNA. Lymphocyte depletion and the presence of a large number of macrophages containing viral particles, except in the lymph nodes, were noted in the tonsils, spleen and intestinal lymphatic tissues of domestic swine and wild boars. The main histopathological changes observed in the non-lymphatic organs of domestic swine and wild boars were mononuclear cell infiltrates, with the presence of the viral *Cap* antigen and the genome of PCV2, mainly in the cytoplasm of macrophages, and occasionally in the nucleus of lymphocytes. Immunohistochemical methods and *in situ* hybridisation demonstrated that PCV2 was primarily located in, and had a tropism for, cells of the monocyte-macrophage system. This is not an uncommon finding in epithelial cells including the epithelial cells of the renal tubules and bile ducts, hepatocytes, bronchoalveolar epithelium, and enterocytes.

Using PCR, histopathological examination, immunohistochemistry (IHC) techniques and *in situ* hybridisation, the presence of PCVAD was demonstrated in the domestic swine population and, for the first time, in wild boars in Serbia. These data confirm that PCV2 is widespread in the domestic swine and wild boar populations of North Bačka County, and they support previous findings indicating that PCV2 infection of pigs is present in Serbia.

Keywords: PCVAD, PMWS, PCV2, *Cap* antigen, ssDNA PCV2, dsDNA PCV2, immunohistochemistry, *in situ* hybridisation, wild boar, domestic swine.

Major Field of Study: Clinical Pathology and Therapy of animals

Special Field of Study: Veterinary Pathology

UDK Number: 619:616



.....

SADRŽAJ

ZAHVALNOST.....	I
PODACI O DOKTORSKOJ DISERTACIJI.....	II
INFORMATION REGARDING DISSERTATION.....	VI
SADRŽAJ.....	X
SKRAĆENICE.....	XII
1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE.....	5
3. CILJ I ZADACI.....	41
4. MATERIJAL I METODE.....	43
5. REZULTATI ISPITIVANJA	52
5.1. Rezultati kliničkih ispitivanja domaćih svinja	52
5.2. Rezultati PCR analize	53
5.3. Patoanatomske promene	54
5.3.1. Patoanatomske promene u tonzilama.....	55
5.3.2. Patoanatomske promene u limfnim čvorovima.....	55
5.3.3. Patoanatomske promene u slezini.....	56
5.3.4. Patoanatomske promene u tankim crevima	57
5.3.5. Patoanatomske promene u ileocekalnoj valvuli.....	57
5.3.6. Patoanatomske promene u plućima	58
5.3.7. Patoanatomske promene u jetri	59
5.3.8. Patoanatomske promene u bubrezima	60
5.3.9. Patoanatomske promene u srcu	61
5.4. Histopatološke promene	67
5.4.1. Histopatološke promene u tonzilama.....	69
5.4.2. Histopatološke promene u limfnim čvorovima.....	70
5.4.3. Histopatološke promene u slezini.....	72





5.4.4.	Histopatološke promene u tankim crevima	73
5.4.5.	Histopatološke promene u ileocekalnim valvulama	73
5.4.6.	Histopatološke promene u plućima	78
5.4.7.	Histopatološke promene u jetri	79
5.4.8.	Histopatološke promene u bubrezima	80
5.4.9.	Histopatološke promene u srcu	80
5.5.	Distribucija <i>Cap</i> antigena PCV2.....	84
5.6.	Distribucija jednolančane i dvolančane DNK PCV2	95
5.7.	Razlike u zastupljenosti i intenzitetu, za PCVAD značajnih, histopatoloških promena na limfatičnom tkivu domaćih i divljih svinja	108
5.8.	Razlike u zastupljenosti i intenzitetu ekspresije <i>Cap</i> antigena PCV2 u limfatičnom tkivu domaćih i divljih svinja.....	110
5.9.	Razlike u zastupljenosti i intenzitetu ekspresije genoma PCV2 u limfatičnom tkivu domaćih i divljih svinja	112
6.	DISKUSIJA	115
7.	ZAKLJUČCI.....	137
8.	POPIS LITERATURE.....	139
BIOGRAFIJA.....		CLXXVIII
IZJAVA O AUTORSTVU		CLXXX
IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA		CLXXXI
IZJAVA O KORIŠĆENJU		CLXXXII



SKRAĆENICE

ADV - *virus Aujeszky bolesti*
BALT - *limfatično tkivo bronhija*
CD2 - *B limfocitni marker*
CD3 - *T limfocitni marker*
CD4 - *T limfocitni marker*
CD8 - *T limfocitni marker*
CP - *komplementarna proba*
DNK - *dezoksiribonukleinska kiselina*
dpi - *dana posle inokulacije*
dsDNA - *dvolančana DNK*
GALT - *limfatično tkivo creva*
gE/ml - *genomnih jedinica po mililitru*
G-CSF - *faktor stimulacije granulocita*
IHC - *imunohistohemija*
ISH - *hibridizacija in situ*
IL-1- β - *Interleukin 1 beta*
IL-8 - *Interleukin 8*
ISH - *hibridizacija in situ*
kDa - *kilodalton*
KKSv - *virus klasične kuge svinja*
LSAB2 - *obežžen streptavidin-biotin kompleks*
MCP-1 - *monocitni hemoatraktantni protein 1*
MHC I - *tkivni histokompatibilni antigen 1*
MHC II - *tkivni histokompatibilni antigen 2*
MIP-1 - *makrofagni inflamatorni protein 1*
mPCV2 - *modifikovani cirkovirus svinja tip 2*
mRNK - *informaciona ribonukleinska kiselina*



.....

ORF - *open reading frame*, mesto za očitavanje
ORF1 gen (rep gen) - *replikacioni gen*
ORF1 protein (rep protein) - *replikacioni protein*
ORF2 gen - *gen za kapsidni protein*
Cap protein - *kapsidni protein, kapsidni antigen*
ORF3 protein - *protein koji učestvuje u apoptozi*
PALS - *periarterijski limfatični omotač*
PCV - *cirkovirus svinja*
PCV1 - *cirkovirus svinja tip jedan*
PCV2 - *cirkovirus svinja tip dva*
PCV3- *cirkovirus svinja tip tri*
PCVAD (PCVDs)-*oboljenja koja su u uzročnoj vezi sa cirkovirusom svinja 2*
PDNS - *dermatitis nefropatija sindrom svinja*
PEV - *entero virus svinja*
PK-15 (ATCCCCL31) - *ćelijska linija svinjskog bubrega*
PMWS - *multisistemijski sindrom kržljanja zalučene prasadi*
PNP - *proliferativna nekrotična pneumonija svinja*
PPV - *parvo virus svinja*
PRDC - *kompleks respiratornih oboljenja svinja*
PRRSV - *virus svinjskog reproduktivnog respiratornog sindroma*
PCR - *metoda lančane reakcije polimeraze*
RCR melting pot - *replikacija po tipu rolling circle*
RFP- *proba replikativne forme*
SAMS - *reproduktivne smetnje krmača i nazimadi*
SIV - *virus influence svinja*
SPF - *specific pathogen free, zapat slobodan od patogenih mikroorganizama*
ssDNA - *jednolančana DNK*
TNF- α - *tumor nekroza faktor alfa*
 $\gamma\delta$ TCR - *T limfocitni marker*



1. UVOD

Značajni ekonomski gubici u intenzivnoj svinjarskoj proizvodnji u novije vreme se pripisuju zaraznom oboljenju svinja u čijoj etiopatogenezi glavnu ulogu ima cirkovirus svinja tip 2 (porcine circovirus 2, PCV2), koji je rasprostranjen po celom svetu. Jedan od oblika sistemskog oboljenja svinja izazvanog ovim virusom, multisistemski sindrom kržljanja zalučene prasadi (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS), prvi put je opisan 1996. godine. Od prve pojave PMWS sindroma lista oboljenja za koja se smatra da su u uzročnoj vezi sa PCV2 značajno se proširila. Shodno tome, u novije vreme se uglavnom govori o "oboljenjima povezanim sa PCV2" (porcine circovirus associated diseases, PCVAD, PCVDs). Većina autora u ovu grupu oboljenja svrstavaju, osim PMWS sindroma, i dermatitis-nefropatija sindrom (porcine dermatitis nephropatia syndrome, PDNS), kompleks respiratornih poremećaja svinja (porcine respiratory disease complex, PRDC), reproduktivne smetnje krmača i nazimadi (sow abortion mortality syndrome, SAMS), proliferativna nekrotizirajuća pneumonija svinja (porcine proliferative necrotizing pneumonia, PNP), granulomatozni enteritis, nekrotični limfadenitis, eksudativni epidermitis i kongenitalni tremor prasadi. Uloga PCV2 u razvoju navedenih sindroma kod domaćih svinja, osim u slučaju PMWS sindroma, a po nekima i PRDC, još nije dovoljno ispitana, niti sa sigurnošću dokazana. U populacijama divljih svinja PCV2 je takođe raširen. Iz literature su poznati retki slučajevi PMWS sindroma divljih prasadi. Infekcija verovatno prolazi u



latentnom obliku, ili se pak ne primeti, obzirom da divlje svinje ne žive pod neposrednim i stalnim nadzorom ljudi.

Multisistemska sindrom kržljanja zalučene prasadi (PMWS) je oboljenje u čijoj etiologiji učestvuje više etioloških faktora, gde je prisustvo PCV2 neophodan, ali ne i dovoljan faktor za razvoj kliničke manifestacije oboljenja. PMWS sindrom se prevashodno javlja kod prasadi uzrasta između jedan i četiri meseca starosti. Klinički znaci su nespecifični i variraju od slučaja do slučaja. Kod zalučene prasadi PMWS sindrom se najčešće karakteriše progresivnim kržljanjem, zaostajanjem u razvoju, uglavnom sa respiratornim smetnjama, dijarejom, bledilom kože i povremeno ikterusom. Nije sasvim jasno kako je ovo, do nedavno retko oboljenje, brzo poprimilo epidemijske razmere i raširilo se po celom svetu.

Cirkovirusi svinja (PCV) su pripadnici roda *Circovirus*, familije *Circoviridae*. *Circoviridae* sačinjavaju tri roda: *Circovirus*, *Gyrovirus* i *Anellovirus*. Cirkovirusi se smatraju jednim od najsitnijih DNK virusa sisara i usko su povezani sa biljnim cirkovirusima označenim kao *Nanovirus*. Opisana su dva tipa PCV: cirkovirus svinja tip 1 (PCV1) i cirkovirus svinja tip 2 (PCV2). Domaće svinje su jedine domaće farmske životinje koje su prijemčive za PCV2. U populacijama divljih svinja PCV2 je takođe prisutan. Za razliku od PCV2, PCV1 ne izaziva citopatogeni efekat na ćelijskim kulturama, i nikad ne prouzrokuje oboljenje kod svinja nakon veštačke infekcije. PCV1 se smatra avirulentnim, za razliku od PCV2 koji je virulentan i patogen za domaće i divlje svinje. Danas su poznata dva genotipa PCV2: PCV2a sa dužim genomom, i PCV2b koji ima kraći genom. Do 2003. godine u Zapadnoj Evropi, odnosno do 2005. godine u Severnoj Americi genotip PCV2a je bio dominantan, međutim, novija epizootiološka istraživanja pokazuju da genotip PCV2b danas prevladava u celom svetu.

ORF2 gen PCV2 kodira veliki imunogeni kapsidni protein (*Cap* antigen), koji je opisan kao glavni strukturni protein virusnog kapsida. Promene u ORF2



.....

genu mogu da budu veza između varijacija kapsidnog proteina i patogenosti PCV2. Antitela koja se sintetišu na ovaj imunogeni virusni protein imaju virus-neutralizacionu aktivnost. Korišćenjem monoklonskih i poliklonskih antitela dokazano je da izolati PCV2 iz obolelih svinja od PMWS sindroma, poreklom iz različitih geografskih regiona sveta, imaju antigensku sličnost i pripadaju istom patogenom virusu (*Saha i sar., 2011*). Mnogi autori pišu o razlikama genetskog sastava PCV2, ali zasad nije sasvim jasno koji značaj te razlike imaju.

Danas se veoma malo zna o replikaciji PCV2 *in vivo*. U ranoj fazi infekcije sa PCV2, pre razvoja kliničkih simptoma i patomorfoloških promena, genetski materijal virusa je najčešće dokazan u zrelim ćelijama monocito-makrofagnog sistema. Nadalje, dokazano je da se u ranoj fazi infekcije PCV2 umnožava u T i B limfocitima, epitelnim ćelijama raznih tkiva, ređe i makrofagima, što ukazuje da su oni uključeni u replikaciju virusa i da služe za raznošenje virusa po organizmu.

Smatra se da je deplecija limfocita u limfatičnom tkivu najučestalija lezija kod PMWS sindroma. Opisano je smanjenje broja cirkulišućih B limfocita i gubitak limfocita u B ćelijskim regionima limfatičnog tkiva, kao i smanjenje broja CD4 i/ili CD8 subpopulacija T limfocita. Podeljena su mišljenja u pogledu mehanizma nastanka deplecije limfocita, koja se pre svega odnosi na B limfocite folikula i T limfocite parakorteksa i perifolikularnog (interfolikularnog) limfatičnog tkiva. Nije u potpunosti razjašnjeno da li PCV2 izaziva apoptozu B limfocita dovodeći tako do drastične deplecije B limfocita i sistemske imunosupresije kod svinja, ili pak smanjuje obim ćelijske proliferacije pri normalnom broju apoptoza.

Najnovije dijagnostičke metode u istraživanjima cirkovirusnih infekcija svinja baziraju na uspostavljanju veze između virusa i tkivne lezije. S obzirom da sama detekcija PCV2 ne podrazumeva i postojanje oboljenja, a da lezije karakteristične za PMWS sindrom nedovoljno definišu ovu bolest, u ovom radu će uz pomoć hibridizacije *in situ* i imunohistohemije biti istovremeno ispitani

.....

karakter tkivnog oštećenja, prisustvo nukleinske kiseline virusa u fazi mirovanja i fazi replikacije, kao i tkivna distribucija virusnog antigena kod domaćih i divljih svinja.



2. PREGLED LITERATURE

Nepoznata bolest zalučenih prasadi, koja se tokom 90-tih godina prošlog veka pojavila u Severnoj Americi, nazvana je Multisistemski sindrom kržljanja zalučene prasadi (Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) na osnovu dominantnih kliničkih simptoma, jer je njena etiologija bila nepoznata. O tom novom morfološkom entitetu stručna javnost je prvi put obavještena 1996. godine (*Harding, 1996, 1997; Clark, 1997; Harding i Clark 1997*). Ubrzo se oboljenje pojavilo i u SAD (*Allan i sar., 1998*). U Evropi je ovo oboljenje prvi put dijagnostikovano 1996. godine u Francuskoj (*Madec i sar., 2000*). Godinu dana nakon toga ustanovljena je u Španiji (*Segales i sar., 1997*), a potom u Danskoj i Severnoj Irskoj (*Allan i sar., 1999*). Prošlo je skoro sedam godina dok je ovom novootkrivenom oboljenju svinja ustanovljena etiologija, i dovedena u uzročnu vezu sa cirkovirusom 2 (porcine circovirus type 2, PCV2) (*Ellis i sar., 1998*).

PMWS sindrom je sistemsko, virusno infektivno oboljenje sa sve većim ekonomskim značajem u globalnoj proizvodnji svinja. Oboljenje je prvi put zapaženo 1991. godine u Kanadi, u zapažima svinja slobodnih od specifičnih patogenih mikroorganizama (specific pathogen free, SPF). Iako su saznanja o oboljenjima divljih svinja izazvanih sa PCV2 veoma oskudna, dokazano je da i one obolevaju (*Ellis i sar., 2003; Schulze i sar., 2003; Toplak i sar., 2004; Vicente i sar., 2004; Knell i sar., 2005a, 2005b; Ruiz-Fons i sar., 2006, 2008; Cságola i sar., 2006; Lipej i sar., 2007; Knowles i sar., 2008; Sofia i sar., 2008; Petrini i sar., 2009; Reiner i sar., 2010, 2011; Segales Joaquim, 2012*). Po nekim autorima PMWS sindrom nije nova bolest, obzirom da su retrospektivna ispitivanja dokazala

prisustvo PCV2 u uzorcima poreklom od pre 1996. godine, ali se smatra da je njegova klinička manifestacija nova (Grierson i sar., 2004). Pozitivni nalazi kod svinja utvrđeni su u Nemačkoj i Španiji 1986. godine (Rodriguez i sar., 2003; Staebler i sar., 2005), u Japanu 1989. godine (Mori i sar., 2002) i na Tajlandu 1993. godine (Kiatipattanasakul Banlunara i sar., 2002). Prema rezultatima retrospektivnih seroloških ispitivanja PCV2 je bio prisutan 1962. godine u Nemačkoj (Jacobsen i sar., 2009), 1969. godine u Belgiji, 1973. godine u Severnoj Irskoj i 1985. godine u Kanadi i Španiji (Segales i Domingo 2002). Ispitivanja Rosella i Sandvika ukazuju na moguće prisustvo ovog oboljenja od 1986. godine (Rosell i sar, 2000; Sandvik i sar, 2001). U našoj zemlji prvi klinički slučajevi ove bolesti zabeleženi su 2003. godine (Ivetic i sar., 2003). Bolest je u to doba zabeležena i u susednim zemljama – Mađarskoj (Kiss i sar., 2000), Sloveniji (Toplak i sar., 2002, 2003), i Hrvatskoj (Lipej i sar., 2002; Jemeršić i sar., 2004). Danas su oboljenja povezana sa PCV2 rasprostranjena u celom svetu, i ako je ostalo nerazjašnjeno pitanje zašto je u početku sporadična pojava PMWS sindroma u poslednje vreme prerasla u bolest globalnog karaktera, često epidemijskih razmera, koja izaziva značajne ekonomske gubitke.

PMWS sindrom je multifaktorijalno oboljenje za čiju je kliničku manifestaciju pored PCV2 neophodno i prisustvo drugih predisponirajućih faktora, koji utiču na ishod infekcije. Oboljenje karakteriše zaostajanje u razvoju zalučenih prasadi. Pretpostavljalo se da je pojava ove bolesti povezana sa imunosupresijom (Segales i sar., 2001). Ovu hipotezu potvrđuju karakteristične promene na limfatičnom tkivu prasadi obolele od PMWS sindroma (Segales i sar., 1997; Rosell i sar., 1999) kao i česte oportunističke infekcije (Clark, 1997; Carrasco i sar., 2000). Osim toga, neke studije ukazuju na to da stimulacija imunog sistema vakcinacijom prasadi protiv drugih bolesti može potencirati razvoj PMWS sindroma (Allan i sar., 2000; Krakowka i sar., 2001, 2003). Glavne ciljne ćelije za cirkoviruse su fagocitne ćelije, B i T limfociti. Cirkovirus smanjuje sposobnost makrofaga za prezentaciju antigena i dovodi do redukcije funkcije B



i CD4+ T limfocita (*Kiupel i sar., 1999; Sarli i sar., 2001; Darwich i sar., 2004*). Imunohistohemijskim metodama su dokazane promene u populaciji limfocita kod prasadi obolele od PMWS sindroma (*Shibahara i sar., 2000; Segales i sar., 2001; Sarli i sar., 2001; Darwich i sar., 2002*). Najznačajnije promene koje se opisuju u ovim studijama su smanjenje broja cirkulišućih B limfocita (*Darwich i sar., 2002*) i gubitak limfocita u B ćelijskim regionima limfatičnog tkiva (*Shibahara i sar., 2000*), kao i smanjenje broja CD4 i/ili CD8 subpopulacija T limfocita (*Sarli i sar., 2001; Segales i sar., 2001; Darwich i sar., 2002, 2004*). Smatra se da PCV2 izaziva imunosupresiju, jer su lezije prvenstveno prisutne na limfatičnom tkivu. Neki autori su utvrdili drastičan stepen redukcije broja limfocita u traheobronhijalnom i medijastinalnom limfatičnom tkivu. Prvo značajno smanjenje broja limfocita zapaženo je u CD2 populaciji (B limfociti) šest dana nakon infekcije, deplecija CD2+ i CD4+ limfocita se nastavila do 34-og dana nakon infekcije (*Magar i sar., 2000*).

PCV2 je prvi put izolovan 1998. godine, iz uzoraka organa svinja koje su obolele sa kliničkim znacima kržljanja (*Ellis i sar., 1998*). Do tada je oboljenje pod nazivom postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) bilo nepoznate etiologije (*Clark, 1996, 1997; Harding, 1997; Harding i Clark, 1997*). Akronim PMWS je uzet da bi se opisala nova bolest, koja se klinički manifestuje kržljanjem, respiratornim smetnjama, povremenim prolivom, bledilom kože i žuticom zalučene prasadi. Obolela prasad imaju karakteristične multiple tkivne lezije, uglavnom u limfatičnim organima, uz obavezno prisustvo PCV2 u tkivnim lezijama (*Clark, 1997; Harding i Clark, 1997; Sorden, 2000*).

Nakon što je PCV2 identifikovan, i opisan PMWS sindrom, virus je često izolovan iz organa obolelih svinja koje su pokazivale različitu kliničku simptomatologiju. Grupa oboljenja za koja se smatra da su u uzročnoj vezi sa PCV2 označena je kao PCVAD (porcine circovirus associated diseases). Ova oboljenja mogu da budu subklinička ili da ispoljavaju jednu ili više kliničkih manifestacija. Klinički sindromi i bolesti udružene sa infekcijom PCV2



(PCVAD) manifestuju se kao prenatalne i postnatalne bolesti. U prenatalne bolesti spadaju reproduktivne smetnje (*West i sar., 1999; Ladekjaer i sar., 2001b; Kim i sar., 2004; Madson i sar., 2009*), a u najčešća postnatalna oboljenja spadaju PMWS sindrom (postweaning multisistemic wasting syndrome), zatim PRDC (porcine respiratory disease complex) i PDNS (porcine dermatitis nefropatia syndrome). U najvećem broju zemalja sveta cirkovirusna infekcija se javlja u formi PMWS sindroma, dok je u Engleskoj i Irskoj češći dermatitis-nefropatija sindrom (PDNS) (*Allan i sar., 2000; Thomson i sar., 2000; Gresham i sar., 2001; Harms i sar., 2002; Kim i sar., 2003b; Hansen i sar., 2011*). PCV2 je, osim kod sindroma PMWS i PDNS, često izolovan i kod svinja sa granulomatoznim enteritisom, nekrotičnim limfadenitisom, proliferativnom nekrotičnom pneumonijom, eksudativnim epidermitisom, kasnim abortusima i kongenitalnim tremorom (*West i sar., 1999; Segales i Domingo, 2002; Molnár i sar., 2002; Kim i sar., 2004; Cadar i sar., 2007; Szeredi i Szentirmai, 2008a; Wellenberg i sar., 2010; Cheng i sar., 2011; Segales Joaquim, 2012*). Prema novijoj Američkoj klasifikaciji različita oboljenja za koja se smatra da su u uzročnoj vezi sa PCV2 označavaju se kao: sistemska infekcija (kategorija u kojoj dominira PMWS sindrom), zatim pneumonija, enteritis, i reproduktivne smetnje udružene sa PCV2, i sindrom PDNS udružen sa PCV2 (*Molnár i sar., 2007; Opriessnig i sar., 2007; Madson i sar., 2009*). Uloga PCV2 u patogenezi nabrojanih bolesti, osim PMWS sindroma, nije u potpunosti razjašnjena (*Magar i sar., 2000; Chae, 2005*).

Danas vlada mišljenje da su PCVAD oboljenja multifaktorijalne etiologije. Nadalje, poznato je da ne oboljeva svaka svinja koja je inficirana sa PCV2. Faktori koji utiču na ishod infekcije sa PCV2 podeljeni su u četiri grupe: virus, domaćin, koinfekcije i imunomodulacija (*Opriessnig i sar., 2007*). Dokazano je da gnotobiotična prasid inficirana isključivo sa PCV2, bez promene uslova držanja i prisutnih predisponirajućih faktora, ne pokazuju kliničke znake oboljenja, već ostaju u subkliničkoj formi bolesti (*Krakovka i sar., 2000, 2002, 2003*). Međutim, u slučajevima kada se prasid inficirana sa PCV2



koinficiraju sa parvovirusom, ili kada su ista parenteralno imunostimulisana, bolest se klinički razvija (*Krakovka i sar., 2000, 2001, 2003; Kyriakis i sar., 2002*). U konvencionalnoj proizvodnji svinja PMWS sindrom se često razvija i u slučajevima kada su prasad tretirana vakcinama koje sadrže adjuvanse koji su jaki imunostimulatori (*Allan i sar., 2000; Krakowka i sar., 2001; Hoogland i sar., 2006*).

Obzirom da je PCV2 ubikvitaran u populacijama svinja, i da samo njegovo prisustvo ne podrazumeva uvek i pojavu bolesti, Sorden je postavio tri kriterijuma koja obavezno treba da budu ispunjena da bi se oboljenje definisalo kao PMWS sindrom: pod 1) prisustvo kliničkih simptoma kao što su zaostajanje u rastu, kržljanje, respiratorne smetnje; pod 2) prisustvo karakterističnih tkivnih lezija izazvanih sa PCV2 (deplecija limfocita, i/ili prisustvo mnogobrojnih makrofaga koji zamenjuju iščezle limfocite u folikulima limfatičnog tkiva; i pod 3) prisustvo antigena ili genetskog materijala PCV2 u opisanoj tkivnoj leziji, utvrđen uz pomoć imunohistohemijske metode ili metode hibridizacije *in situ* (*Choi i Chae, 1999; Choi i sar., 2000; Sorden, 2000; Kim i Chae, 2001; Chae, 2004*).

Cirkovirusi svinja (porcine circovirus, PCV) su pripadnici roda *Circovirus*, familije *Circoviridae*. Familija *Circoviridae* podeljena je na tri roda: *Circovirus* (*Circo* označava da virusni genom ima cirkularnu konformaciju), *Gyrovirus* (*Gyro* je derivacija iz Grčke reči *gyrus*, što označava "prsten" ili "krug"), i *Anellovirus*. Rodu *Circovirus* pripadaju sledeće vrste: cirkovirus svinja 1 (porcine circovirus 1, PCV1), cirkovirus svinja 2 (porcine circovirus 2, PCV2), cirkovirus papagaja (beak and feather disease virus, BFDV), cirkovirus kanarinaca, cirkovirus gusaka, cirkovirus golubova, cirkovirus zeba i cirkovirus galebova. U rod *Anellovirus* spada TTV (Torque Teno Virus), koji perzistira kod nekoliko vrsta domaćih životinja, a često je prisutan kod svinja obolele od PMWS sindroma. Rodu *Gyrovirus* pripada samo jedna vrsta, CAV (chicken anemia virus) (*Todd i sar., 2005*). Cirkovirusne infekcije raznih životinjskih vrsta izazivaju promenljivi stepen deplecije limfocita iz kog razloga se smatraju

virusima imunosupresivnog dejstva (*Todd i sar., 2005*). Cirkovirusi su usko povezani sa biljnim virusima označenim kao *Nanovirus*. Filogenetskom analizom je ustanovljena srodnost Cirkovirusa svinja sa biljnim *Geminivirus*-ima (*Meehan i sar., 1997; Niagro i sar., 1998*). Postoji pretpostavka da je Cirkovirus svinja nastao rekombinacijom biljnog nanovirusa i animalnog pikorna sličnog virusa (*Gibbs i Weiller., 1999*). Cirkovirusi pripadaju najsitnijim DNK virusima. Virion je jednolančana, cirkularna DNK negativnog polariteta, bez lipidnog omotača, dijametra 17 nm. Imaju sposobnost da se samostalno replikuju u pojedinim ćelijama sisara, uz stvaranje intracelularnih inkluzionih telašaca (*Tischer i sar., 1982; Studdert, 1993; Mankertz i sar., 1997*). DNK viriona cirkovirusa sastavljena je od oko 1800 baza, koja ima šest mesta za očitavanje (open reading frame, ORF). Virion nema lipidni omotač, već je okružen samo slojem proteina koji čini kapsid (*Lukert i sar., 1995; Mankertz i sar., 1997; Hamel i sar., 1998; Meehan i sar., 1998*). Cirkovirusi imaju ikozaedralnu strukturu, zahvaljujući kapsidnom omotaču koji je sačinjen od 60 proteinskih molekula organizovanih u 12 pentamernih jedinica (*Crowther i sar, 2003*). Na osnovu nukleotidne sekvence i patogenosti, identifikovana su dva genotipa cirkovirusa svinja: cirkovirus svinja 1 (PCV1) i cirkovirus svinja 2 (PCV2) (*Clark, 1996; Harding, 1996; Meehan i sar., 1998*). Novija ispitivanja govore u prilog postojanju i trećeg genotipa, cirkovirus svinja PCV1/2a (*Gagnon i sar., 2010*). PCV1 se smatra nepatogenim i ekonomski beznačajnim u svinjarskoj proizvodnji, jer se javlja kod svega 0,1% svinja inficiranih cirkovirusima. Takođe, malo se zna o njegovoj epidemiologiji i raširenosti po svetu. Rezultati nekih seroloških ispitivanja potvrđuju njegovu raširenost po celom svetu (*Allan i Ellis, 2000; Segales i Domingo, 2002*). PCV1 je otkriven kao perzistentni kontaminant tkivne ćelijske kulture PK-15 (ATCCCL31) svinjskog bubrega (*Tischer i sar., 1974*). Nadalje, izolovan je iz vakcina namenjenih svinjama (*Quintana i sar., 2006*), i preparata tripsina i pepsina poreklom od svinja koji se koriste na kulturama ćelija (*Fenaux i sar., 2004*). Često prisustvo PCV1 kod svinja vakcinisanih sa

živim vakcinama nije iznenađujući nalaz, obzirom da se te vakcine prave na kulturama ćelija, za koje se zna da su često inficirane pomenutim virusom (Quintana i sar., 2006). Ispitivanja potvrđuju prisustvo PCV1 i u populacijama divljih svinja (Tischer i sar., 1986; Tischer i sar., 1995, Cságola i sar., 2008b). Sekvencioniranjem izolata PCV1 ustanovljeno je da se njegov genetski materijal sastoji od 1759 nukleotida (Meehan i sar., 1997; Hameli sar., 1998; Fenaux i sar., 2000). PCV1 ne izaziva citopatogeni efekat na kulturama ćelija niti oboljenje svinja, iako je često izolovan kod svinja (Tischer i sar., 1986; Allan i sar., 1995; Krakowka i sar., 2000).

PCV2 se smatra virulentnim i patogenim za svinje, za razliku od PCV1 koji je avirulentan za svinje. Svinje su jedine farmske životinje koje su prijemčive za PCV2 koji je izolovan iz tkiva svinja obolelih od PMWS sindroma u zemljama Evrope, Azije i Severne Amerike (Allan i sar., 1998; Ellis i sar., 1998; Fenaux i sar., 2000). Prisustvo PCV2 je dokazano i u populacijama divljih svinja (Ellis i sar., 2003; Vicente i sar., 2004; Ruiz-Fons i sar., 2006, 2008; Lipej i sar., 2007; Sedlak i sar., 2008; Sofia i sar., 2008; Petrini i sar., 2009; Reiner i sar., 2010, 2011). Ispitivanja nukleotidne sekvence PCV2 rezultirala su podelom u dve grupe: PCV2 grupa 1 i PCV2 grupa 2. U PCV2 grupu 1 spadaju tri podgrupe (PCV2 1A, 1B, 1C), dok u PCV2 grupu 2 spadaju pet podgrupa (PCV2 2A, 2B, 2C, 2D, 2E) (Olvera i sar., 2007). Kao rezultat istraživanja Američkih autora izolati su svrstani u tri grupe: PCV2a, PCV2b i PCV2c (Gagnon i sar., 2008; Gagnon i sar., 2010), gde PCV2a odgovara PCV2 grupi 2, PCVb odgovara PCV2 grupi 1, dok je PCV2c grupa koja je sporadično izolovana iz uzoraka skupljenih osamdesetih godina. Novija ispitivanja potvrđuju postojanje mutanata PCV2, nastalih rekombinacijom prilikom koinfekcije svinja sa PCV2a i PCV2b, koji pokazuju veću virulentnost od genotipova od kojih su nastali. Kod ovih mutanata neutralizaciona sposobnost antitela je značajno slabija nego kod genotipova PCV2a i PCV2b, što može da predstavlja značajan faktor virulencije novonastalih formi PCV2 (Guo i sar., 2011). Sekvencioniranjem genetskog

materijala PCV2 (Meehan i sar., 1998; Fenaux i sar., 2000; Larochelle i sar., 2002) dokazana je velika razlika u nukleotidnom sastavu u odnosu na avirulentni PCV1 (Hamel i sar., 1998). Poređenjem nukleotidnih sekvenci PCV1 (Mankertz i sar., 1997; Meehan i sar., 1997) i PCV2 (Hamel i sar., 1998; Mankertz i sar., 2000) ustanovljena je nukleotidna homologija manja od 80%. Genom PCV2 je sastavljen od 1767/1768 nukleotidne baze (Meehan i sar., 1997; Hamel i sar., 1998; Fenaux i sar., 2000). Iako je genetska organizacija slična, treba napomenuti razlike i sličnosti, pogotovo na mestu dve značajne nukleotidne sekvence (ORF-ovi) koji aktivno učestvuju u virusnoj replikaciji, to su ORF1 i ORF2. Najveći ORF je ORF1. U oba slučaja, kod PCV1 i PCV2, ovaj lokus kodira Rep protein i pokazuje 85% homologije. Veći stepen varijacije je utvrđen u sekvenci ORF2 pri upoređivanju PCV1 i PCV2. Stepem homologije u ovom slučaju iznosi svega oko 65%. Ovo ukazuje da se pripadnost tipu PCV može odrediti na osnovu *Cap* proteina. U vezi sa tom idejom, nekoliko tip-specifičnih PCV epitopa je identifikovano na ORF2 sekvenci pomoću specifične metode (synthetic peptide scanning analysis) (Mahe i sar., 2000). ORF2 PCV2 sačinjen je od 702 ili 705 nukleotida. Utvrđene su značajne razlike u nukleotidnim sekvencama ORF2 gena između PCV2a i PCV2b, te razlike se kreću između 8,1 i 13,1% (Li i sar., 2010). ORF2 kodira imunogeni kapsidni protein (*Cap* protein, *Cap* antigen), molekulske mase 27.8 kDa, koji je opisan kao glavni strukturni protein virusne partikule. *Cap* protein je varijabilni epitop sastavljen iz 233-234 aminokiseline (Fenaux i sar., 2000; Knell i sar., 2005a) i predstavlja najimunogeniji virusni antigen PCV2. Antitela koja se sintetišu na ovaj virusni antigen imaju virus-neutralizacionu aktivnost (Nawagitgul i sar., 2000; Cheung K., 2003; Liu i sar., 2006). Ustanovljeno je pet imunoreaktivnih domena na *Cap* proteinu PCV2 i to: B-121, B-132, B-133, B-146 i B-152. Te imunoreaktivne regije na PCV1 su: A-177, A-188, A-189, A-202 i A-208. Značajno je napomenuti da se nakon veštačke imunizacije sa PCV2 javlja visoka serokonverzija na B-121, B-133 i B-146, pogotovo na B-133. Protein B-133 se smatra serološkim markerom kasne faze

PCV2 infekcije nakon jedanaeste nedelje (*Troung i sar., 2001; Liu i sar., 2006*). Lokalizacija *Cap* proteina poreklom od PCV2 je utvrđena indirektnom imunofluorescencijom pomoću anti-*Cap* protein antitela u PK15 ćelijskim linijama. Inficirane ćelije sa PCV2 su pokazivale nuklearnu fluorescenciju za razliku od neinficiranih ćelija (*Liu i sar., 2001*). Dokazano je da je N-terminalni region *Cap* proteina (rezidua od 41 aminokiseline na N-terminalnom kraju) zadužen za zadržavanje ovog proteina u jedru inficiranih ćelija. Delecijom ove regije *Cap* protein se nalazi i izvan jedra u citoplazmi (*Liu i sar., 2001*). Kod PCV2 opisan je i ORF3 gen, koji ne igra značajnu ulogu u replikaciji virusa, međutim uključen je u proces virusom indukovane apoptoze i smatra se značajnim faktorom u patogenezi PMWS sindroma. Produkt ORF3 gena je ORF3 protein koji je uglavnom intranuklearno lokalizovan prilikom replikacije virusa (*Liu i sar., 2005*). Poslednjih godina je PCV2b najučestalije izolovan PCV, njegovo prisustvo je dokazano čak u 89,3% PCV2 pozitivnih slučajeva (*Gagnon i sar., 2010*).

Najnovija ispitivanja ukazuju na postojanje jedne dosad nepoznate genomske varijante PCV. Naime, nakon virusne izolacije i sekvencioniranja genoma došlo se do neočekivanog nalaza, utvrđeno je da je ovaj virus sastavljen od ORF1 gena PCV1 i ORF2 gena PCV2a. Ovaj novi tip PCV, koji nosi naziv PCV1/2a ili cirkovirus svinja tip 3 (PCV3) (naziv još nije prihvaćen od međunarodnog naučnog komiteta), utvrđen je u Kanadi kod 2,5% PCV pozitivnih slučajeva. Istraživači su mišljenja da je ovaj novi tip PCV ili poreklom od himer vakcine čija se tehnologija bazira upravo na stvaranju himera sastavljene od ORF1 PCV1 i ORF2 PCV2, ili da je nastao prirodnom rekombinacijom PCV1 i PCV2a. Nukleotidni niz ovog novootkrivenog virusa pokazuje 86,4%; 88,7%; 86,5% homologije sa PCV1; PCV2a i PCV2b (*Gagnon i sar., 2010*).

PCV se u domaćinu ponaša kao parazit. Prilikom umnožavanja koristi njegove energetske i gradivne rezerve (*Fan i sar., 2011*). Za replikaciju je

neophodno da jednolančani DNK genom PCV uđe u ćelijsko jedro. U jedru dolazi do sinteze komplementarnog lanca i tako nastaje jedna prelazna forma virusa sa duplim DNK lancem koja se zove replikativna forma (RPF), koja ima dvolančanu strukturu. U ćelijskom jedru se dešava i transkripcija mRNK sa ORF2 gena, koja nosi informaciju za sintezu *Cap* antigena (Finsterbusch i sar., 2005). DNK virusa se replikuje pomoću enzima ćelije domaćina, tokom S-faze ćelijskog ciklusa, koja se dešava samo tokom mitoze (Allan i Elis, 2000). Mada još nije sa sigurnošću utvrđeno koje su primarne ćelije za razmnožavanje PCV2, korišćenjem genomske probe za dokazivanje replikativne forme PCV2, metodom hibridizacije *in situ*, dobijeni su pozitivni rezultati u epitelnim ćelijama traheje, tubula bubrega i hepatocotima (Perez-Martin i sar., 2007).

Postoji pretpostavka da su različiti genotipovi PCV2 odgovorni za pojavu različitih oblika bolesti. Neka istraživanja sugerišu da PCV2 i kod slučajeva sa reproduktivnim smetnjama i kod PDNS-a mogu genotipski biti različiti od izolata PCV2 poreklom od svinja obolelih od PMWS sindroma (Meehan i sar., 2001; O'Connor i sar., 2001). Svi izolati PCV2, poreklom od svinja sa različitim kliničkim manifestacijama, su sekvencionirani i pokazuju visok stepen homologije (90 do 96%). Mnogi autori pišu o razlikama genetskog sastava PCV2 (Meehan i sar., 2001; O'Connor i sar., 2001; Choi i sar., 2002; Farnham i sar., 2003; Lohse i sar., 2008; Olvera i sar., 2007; Gagnon i sar., 2008, 2010; Krakowka i sar., 2012) ali zasad nije potpuno jasno koju značajnost te male razlike imaju. Kao rezultat 120 serijskih pasaža na ćelijskim kulturama došlo je do mutacije patogenog PCV2, koja se ogleda u promeni dve aminokiseline u kapsidnom proteinu i koja je rezultirala atenuiranjem patogenog virusa. Novonastali atenuirani virus nije sposoban da izazove tako intenzivne makroskopske i mikroskopske promene kao prvobitni divlji virus iz kojeg je nastao (Fenaux i sar., 2004). O sličnim rezultatima, vezanim za promenu ORF2 gena i posledične promene virulencije, svedoče i druga ispitivanja (Guo i sar., 2011; Krakowka i sar., 2012). Rezultati sekvencijskih analiza PCV2 izolovanih iz

PCVAD sa sistemskim oblikom oboljenja i izolovanih kod jedinki bez kliničke manifestacije bolesti ukazuju na veoma visok stepen homologije. Ova studija je još jedna potvrda da minimalna promena u genomu PCV2 može u značajnoj meri da utiče na njegovu virulentnost. Sekvencioniranjem ORF1 i ORF2 gena PCV2 utvrđeno je da postoje veće varijacije u sastavu nukleotida ORF2 gena u odnosu na ORF1 gen (Fenaux i sar., 2000.; Hamel i sar., 2000; Mankertz i sar., 2000). Po rezultatima analize sekvencioniranja ORF1 i ORF2 gena PCV2 obim varijacije nukleotida je viši kod ORF2 (90 do 100% homologije) nego kod ORF1 (97 do 100% homologije) (Fenaux i sar., 2000; Hamel i sar., 2000; Mankertz i sar., 2000). ORF2 gen kodira glavni strukturni protein virusnog kapsida (*Cap* antigen). Promene u ORF2 genu možda mogu da budu veza između varijacije *Cap* antigena i patogenosti PCV2 (Nawagitgul i sar., 2000; Lohse i sar., 2008). Utvrđene su tri velike regije u sastavu *Cap* proteina koje pokazuju aminokiselinsku heterogenost između izolovanih sojeva PCV2: aminokiselinska regija 59-80, 121-136 i 180-191. Interesantno je da se dve od tri navedene regije (59-80 i 121-136) poklapaju sa imunodominantnim domenima (65-87 i 113-147), utvrđenim pomoću Pepscan analize urađene na genima, uključujući i ORF2 (Mahe i sar., 2000). Ove imunodominantne regije *Cap* antigena PCV2 izložene su selektivnom dejstvu imunog sistema i mogu predstavljati bitna mesta u nastanku različitih varijanti PCV2 (Larochelle i sar., 2002; Lohse i sar., 2008). Modifikacije virusnog kapsida mogu da rezultuju izmenom determinanti i samim tim se menja i tkivni tropizam ili interakcija domaćin-virus. Na patogenezu i kliničku manifestaciju infekcije PCV2 utiču i neke osobine samog domaćina, kao što su uzrast, otpornost, itd. (Mankertz i sar., 2000).

Kao što je pomenuto, danas su poznata dva genotipa PCV2. PCV2a, koji raspolaže dužim genomom, i PCV2b koji ima kraći genom. Do 2003. godine u Zapadnoj Evropi, i do 2005. godine u Severnoj Americi prevladavao je genotip PCV2a. Novija epizotiolška istraživanja pokazuju da sada PCV2b prevladava u celom svetu (Opriessnig i sar., 2007; Li i sar., 2010).

PCV2 izolovani na različitim lokalitetima širom sveta pokazuju izuzetno visok stepen homologije među sobom, čak do 96%, dok za neke izolate PCV1 stepen homologije iznosi 62%. Korišćenjem monoklonskih i poliklonskih antitela svi izolati PCV2 iz obolelih svinja od PMWS sindroma pokazuju antigensku homologiju (*Allan i sar., 1999*).

Filogenetska analiza izolata PCV2 sa teritorije bivše Jugoslavije ukazuje na visok stepen genetske sličnosti, pa i potpune identičnosti sa izolatima PCV2 u Francuskoj, Holandiji, Engleskoj i Kini, takođe je dokazano da svi oni pritadaju subtipu PCV2b (*Toplak i sar., 2003*).

Od PMWS sindroma najčešće obolevaju prasadi u starosti od šest do 14 nedelja, a mogu i do dvadesete nedelje starosti. Retko obolevaju prasadi na sasi. Pojava bolesti je uglavnom vezana za period zalučenja, zato naziv ovog oboljenja nosi akronim PMWS (postweaning multisystemic wasting syndrome) multisistemski sindrom kržljanja zalučene prasadi. Morbiditet kod PMWS sindroma je 3 do 50%. Mortalitet može da dostigne čak 80%. Otpornost prasadi zavisi i od opšteg zdravstvenog stanja zapata. Generalno, ako je zdravstveno stanje zapata na većem nivou, teže će doći do oboljevanja. Prasadi se mogu inficirati intrauterino ili postnatalno. Maternalni imunitet jedno vreme može da zaštiti prasadi od infekcije. Oboljenje se često javlja kod jedinki koje nemaju ili imaju nizak nivo maternalnih antitela. Krmače i nazimad ne obolevaju klinički od PMWS sindroma, kod njih se sreću kasni abortusi (SAMS) kao čest nalaz prilikom PCV2 infekcije. Virus često dovodi do mumifikacije fetusa. (*Kennedy i sar., 2000; Pensaert i sar., 2004*).

U zaraženim zapatima 100% svinja do kraja tova može da ima serokonverziju na PCV2. Oboljenje može da perzistira u zapatu više meseci, uglavnom od četiri do 18 meseci, ili duže. Dokazano je da kod prasadi PCV2 može perzistirati u nosnoj šupljini bez viremije i pojave kliničkih simptoma, ali nije dokazano da li se virus u nosnoj duplji replikuje (*Segales i sar., 2003*).



PCV2 je veoma malih dimenzija i izuzetno je otporan na visoke temperature. Može da preživi na temperaturi od 70°C do 15 minuta. Rezistentan je na većinu dezinficijena. Virkon S u 1% rastvoru i 2% NaOH su se pokazali kao efikasni dezinficijensi. PCV2 se dobro održava i raste na čitavom nizu ćelijskih linija poreklom od svinja. U spoljašnjoj sredini dugo preživljava i mesecima zadržava virulenciju (*Ellis i sar., 1998*).

Virus se u prirodnim uslovima širi vertikalno i horizontalno (*Rose i sar., 2011*). Horizontalno širenje podrazumeva da se virus izlučuje iz inficirane jedinke i direktno ili indirektno prenosi na ostale zdrave jedinke (*Tischer, 1995; Pensaert i sar., 2004*). PCV2 može duže vreme da perzistira u organizmu svinje, ponekad i do šest meseci. Inficirane svinje izlučuju virus svojim sekretima i ekskretima. Do inficiranja dolazi nazalnim i peroralnim putem (*Yang i sar., 2003; Segales i sar., 2005*). Virus je dokazan u nosnom iscetku, traheobronhijalnom sadržaju, fecesu, urinu, semenju tečnosti, kako kod klinički, tako i kod subklinički inficiranih svinja (*Shibata i sar., 2003; Mateusen i sar., 2004; Segales i sar., 2005*). Inficirani nerastovi mogu izlučivati PCV2 spermom i do šest nedelja, što opravdava pretpostavku da se koitalno i veštačkom inseminacijom može širiti virus (*Larochelle i sar., 2000; Segales i sar., 2003; Pensaert i sar., 2004; McIntosh i sar., 2006*). Širenje na ostale svinje može biti i indirektno. Oprema i vozila koja se ne dezinfikuju adekvatno mogu da budu izvor virusa. Stajnjak je takođe izvor zaraze. Divlje svinje se smatraju mogućim izvorom zaraze, obzirom da u viremičnoj fazi izlučuju virus (*Ruiz-Fons i sar., 2006, 2008; Reiner i sar., 2011*). Malo je saznanja o infekciji, replikaciji i prenošenju PCV2 u drugim vrstama osim svinja. Grupa Mađarskih autora ispitala je mogućnost zaražavanja miševa sa PCV2, i prenošenje virusa prirodnim putem sa veštački inficiranih miševa na zdrave miševe. Njihovi rezultati potvrđuju da se virus može preneti sa veštački inficiranih miševa na neinficirane miševe prirodnim putem preko njihovih ekskreta. Takođe dolazi do umnožavanja PCV2 u prirodno inficiranim miševima koji ne pokazuju znakove oboljenja ali postaju rezervoari virusa i

.....

mogući izvori za zaražavanje svinja preko svojih ekskreta. Obzirom da glodari direktnim ili indirektnim putem dolaze u kontakt sa domaćim i divljim svinjama, oni se mogu smatrati značajnim vektorima širenja PCV2 u populaciji domaćih i divljih svinja. (Cságola i sar., 2008a).

Vertikalna transmisija je u stvari transplacentalno širenje virusa sa majke na plod. Transplacentalna infekcija kod svinja je moguća kod više virusnih oboljenja, kao što su bolesti izazvane: virusom klasične kuge svinja (KKSV), virusom svinjskog reproduktivnog respiratornog sindroma (PRRSV), parvo virusom svinja (PPV), entero virusom svinja (PEV), virusom Aujeszky bolesti (ADV). Kod svih navedenih virusnih infekcija transplacentalna transmisija je posledica infekcije majke koja je imala viremiju. Mehanizmi pomoću kojih virus prolazi placentalnu barijeru je slabo poznat. Viremija je ključna tačka u procesu vertikalne transmisije virusa sa majke na plod. Ovo može da se desi kada su virusi slobodni u krvnoj plazmi ili kada su virusi pripojeni za ćelije mononuklearnog sistema periferne krvi. PEV, PPV, PRRSV slobodno cirkulišu u krvnoj plazmi. Kada je visoka koncentracija virusnih čestica i dugo traje viremična faza, postoji mogućnost da pomoću fetoplacentalnog krvotoka prodru u fetus, naročito u zadnjem trimestru graviditeta kada je cirkulacija veoma intenzivna. Ako je majka imuna, nakon vakcinacije, ova verovatnoća je manja jer antitela neutrališu cirkulišuće virusne čestice. U slučaju virusa koji uglavnom cirkulišu pripojeni za ćelije krvi (ADV i KKSV) a ređe se nalaze slobodni u krvnoj plazmi, patogeneza je drugačija. Ovi virusi mogu da prodru u ćelije mononuklearne loze periferne krvi majke. Neki od njih mogu da se replikuju u ovim ćelijama koji štite infektivne virusne čestice u krvotoku. Ovi virusi zatim mogu direktno, međućelijskim kontaktima nastaviti svoj put kroz placentalnu barijeru u fetus, bez kontakta sa efektorskim komponentama humoralnog imuniteta. Specifična antitela nisu u stanju da prepoznaju ovako maskirane viruse. Za razliku od inaktivisanih vakcina koje prevashodno daju humoralni imuni odgovor, žive atenuirane vakcine stimulišu i ćelijski imuni

odgovor. Čelijski posredovana imuna reakcija može da igra važnu ulogu u zaštiti ili uklanjanju virusa vezanih za ćelije. PCV2 je na listi transplacentalno prenosivih virusa (*West i sar., 1999; Ladekjaer i sar., 2001a; Mateusen i sar., 2004; Pensaert i sar., 2004*). U slučaju PCV2 viremija je prevashodno vezana za ćeliju. Različiti izolati PCV2 mogu pokazati različitu invazivnost u pogledu sposobnosti za prolazak kroz placentalnu barijeru i indukuju fetopatogenost (*Mateusen i sar., 2004; Pensaert i sar., 2004*). Spermata nerasta takođe može da bude izvor infekcije (*Larochelle i sar., 2000; Kim i sar., 2003c*). Ispitivanja su dokazala da veštačka oplodnja SPF nazimica sa inficiranom spermom nerasta, u kojoj je PCR analizom utvrđeno prisustvo PCV2, dovodi do opstanka virusa intrauterino i do njegovog umnožavanja u tkivima fetusa. Ova ispitivanja potvrđuju da spermata inficiranih nerastova može da bude izvor infekcije embriona ili fetusa (*Larochelle i sar., 2000*). Plod je prijemčiv za PCV2 već u ranom stadijumu razvića. Dokazano je da zona pelucida štiti plod od infekcije. Međutim, daljim razvojem embriona ona postaje prijemčiva za virus. Kada se u veštačkim uslovima ukloni zona pelucida i izvrši veštačka infekcija virus se može detektovati u embrionu 48 sati nakon veštačke infekcije. U slučaju kada je zona pelucida intaktna 48 sati nakon infekcije PCV2 nije nađen u embrionu, već je detektovan na površini zone pelucide, što dokazuje da je zona pelucida efikasna prirodna, zaštitna barijera od PCV2 u ranoj fazi embrionalnog razvića (*Mateusen i sar., 2004*).

Priroda histopatoloških lezija ukazuje na to da je monocitno/makrofagna infiltracija u raznim tkivima verovatno ključna tačka u patogenezi i progresiji PMWS sindroma. U slučaju infekcije sa PCV2 dominira viremija, gde su virusne čestice pripojene za mononuklearne ćelije periferne krvi. Slobodna viremija podrazumeva nalaz slobodnih virusnih čestica u krvnoj plazmi i ređi je nalaz kod infekcije sa PCV2 (*Pensaert i sar., 2004*). Čelije monocitno/makrofagne loze, uključujući i alveolarne makrofage i dendritične ćelije, najprijemčivije su ciljane ćelije za PCV2 (*McNeilly i sar., 1996*). Esencijalnu ulogu u patogenezi

granulomatoznog zapaljenja kod prasadi obolelih od PMWS sindroma verovatno ima hemoatraktantni protein (MCP-1) poreklom iz monocita. Nije potpuno jasno koji je mehanizam nastanka granulomatozne reakcije prouzrokovane sa PCV2. Veza između ekspresije MCP-1 i PCV2 je ispitivana u limfnim čvorovima. Hibridizacijom *in situ* na isečcima limfnih čvorova, poreklom od svinja obolelih od PMWS sindroma, utvrđeno je da u PCV2 pozitivnim ćelijama postoji visok sadržaj MCP-1 (Kim i Chae, 2003). Mononuklearne ćelije regulišu ekspresiju MCP-1 kao odgovor na prisustvo PCV2, dakle i sam PCV2 verovatno ima veoma važnu ulogu u inicijaciji granulomatoznog zapaljenja. Prisutne makrofage, epiteloidne i multijedarne džinovske ćelije mogu imati ulogu u daljem nagomilavanju mononuklearnih ćelija na mestu granulomatoznog zapaljenja, verovatno preko produkcije MCP-1. Dokazano je da makrofagi pre svega proizvode MCP-1. Ekspresija MCP-1 od strane makrofaga je važan momenat u inicijaciji nagomilavanja monocita. Na mestu PCV2 infekcije, monociti izašli iz krvnih sudova i makrofagi se aktiviraju i luče MCP-1 koji uslovljava dalje nagomilavanje monocita na mestu zapaljenske reakcije. Višejedarne džinovske ćelije prisutne na mestu zapaljenja su visokostimulisani makrofagi i oni su u poslednjem stadijumu diferencijacije, stvaraju više produkata a sposobni su i za sintezu MCP-1 (Kim i Chae, 2003; Tsai i sar., 2010).

Alveolarne makrofage su veoma važne ćelije u odbrani plućnog tkiva od raznih patogenih uzročnika. Pretpostavlja se da je infekcija pluća oportunističkim patogenim uzročnicima kod PMWS sindroma posledica imunosupresije. PCV2 dovodi do disregulacije ekspresije MHC II receptora makrofaga i onemogućuje njegovu interakciju sa T i B limfocitima i njihovu proliferaciju (McNeilly i sar., 1996). Virusni antigen se može lako dokazati u citoplazmi alveolarnih makrofaga, inficiranih sa PCV2 ali ne izaziva ćelijsku smrt i nije uočena virusna replikacija u njima (Chang i sar., 2005). To zapažanje govori da ćelije monocitno/makrofagnog sistema mogu biti rezervoari virusa i učestvovati u

njihovoj diseminaciji. Virusni antigen se nalazi u citoplazmi inficirane ćelije, što ukazuje na to da PCV2 ulazi u ćeliju endocitozom ili fagocitozom (*Vincent i sar., 2003; Chang i sar., 2005*). PCV2 sam može da dovede do oštećenja funkcije inficiranih ćelija, što se ogleda u smanjenju sposobnosti ćelija za fagocitozu, redukciji mikrobicidne sposobnosti i poremećaju stvaranja citokina. Inficirani alveolarni makrofagi nisu delotvorni u stvaranju slobodnih kiseonikovih radikala, samim tim smanjena je njihova sposobnost da ubiju mikroorganizme (*Chang i sar., 2006*). Funkcionalno oštećenje alveolarnih makrofaga sa PCV2 može da rezultuje većom prijemčivošću za sekundarne infekcije. Kod svinja sa PMWS sindromom ustanovljena je povećana ekspresija mRNK za neke citokine kao što su: MIP-1, MCP-1, IL-1- β , IL-8, TNF- α , G-CSF u limfatičnom tkivu (*Kim i Chae, 2004; Darwich i sar., 2003b*) i mononuklearnim ćelijama periferne krvi (*Darwich i sar., 2003a*). Ovo je potvrda značaja navedenih citokina u razvoju granulomatoznog limfadenitisa i nagomilavanja makrofaga i ostalih ćelijskih elemenata u tkivu inficiranom sa PCV2. Nema drugih virusa koji indukuju slične lezije, stoga granulomatozno zapaljenje u slučaju PMWS sindroma čini važan životinjski model za istraživanje, ne samo mehanizma nastanka granulomatoznog zapaljenja, već i za *in vivo* ulogu hemokina u zapaljenskoj reakciji. Povećana koncentracija TNF- α može da dovede do povećanja temperature i respiratornog distresa kod svinja inficiranih sa PCV2 (*Albina i sar., 2001; Rovira i sar., 2002*).

Dendritične ćelije igraju ključnu ulogu u imunološkim reakcijama i u imunom odgovoru na virusne infekcije. Dendritične ćelije su grupa antigen prezentujućih ćelija koje se nalaze u koži, sluznicama i krvi, i na taj način veoma rano nailaze na viruse koji invadiraju organizam. PCV2 se već u ranim fazama infekcije pojavljuje u dendritičnim ćelijama. Dendritične ćelije se ponašaju kao senzori opasnosti, hvataju antigene i migriraju do regionalnih limfnih čvorova i limfatičnog tkiva gde mogu da aktiviraju naivne T limfocite ili „podsete“ antigen specifične memorijske T limfocite. Nema dokaza da se PCV2 može

umnožavati u dendritičnim ćelijama ali je dokazano da perzistira u njihovoj citoplazmi, i ne gubi ništa od infektivnosti. Monoklonskim antitelima na *Cap* antigen PCV2 utvrđeno je da se virus u najvećoj količini lokalizuje u citoplazmi blizu ćelijske membrane i da je u kontaktu sa perifernim mikrotubulama inficiranih ćelija. Nekada se javlja i u vidu citoplazmatskih inkluzija. Virusni antigen u ovim ćelijama nije detektovan u ćelijskom jedru. Prisustvo PCV2 u dendritičnim ćelijama ne dovodi do apoptoze ovih ćelija. Zbog velike migratorne aktivnosti dendritičnih ćelija smatra se da one igraju veoma važnu ulogu kao transporteri u diseminaciji virusa po organizmu, a samim tim i u patogenezi ove bolesti. Nije potpuno jasno kako ove ćelije otpuštaju virus. Postoji pretpostavka da virus egzocitozom napušta ćeliju ili „curi“ iz ćelije. Prisustvo PCV2 u dendritičnim ćelijama ne dovodi do značajne promene u ekspresiji MHC I i MHC II antigena. Dendritične ćelije prezentuju antigen pomoću svojih MHC receptora na ćelijskoj membrani T helper limfocitima. Interakcija inficiranih dendritičnih ćelija sa T limfocitima ne indukuje replikaciju virusa u dendritičnim ćelijama. Dokazano je i da se virus iz dendritičnih ćelija ne prenosi na T limfocite prilikom njihovog direktnog kontakta (*Vincent i sar., 2003*).

Smatra se da je deplecija limfocita u limfatičnom tkivu najkarakterističnija histološka lezija kod PMWS sindroma, i ogleda se u relativnom povećanju medularnog dela limfnog čvora, zbog progresivnog gubitka limfocita folikularne i interfolikularne zone. Deplecije limfocita uočena u zadnjem stadijumu PMWS sindroma znatno slabi funkciju limfnog čvora jer se gube efektorske ćelije odbrambenog sistema (*Segales i Domingo, 2002*). Podeljena su mišljenja u pogledu nastajanja deplecije limfocita koja se, pre svega, odnosi na B limfocite folikula i T limfocite parakorteksa i perifolikularnog (interfolikularnog) limfatičnog tkiva. PCV2 izaziva apoptozu B limfocita dovodeći tako do drastične deplecije B limfocita i sistemske imunosupresije kod svinja (*Shibahara i sar., 2000*). Većina drugih autora smatra

da je smanjen obim ćelijske proliferacije pri normalnom broju apoptoze faktor zbog kojeg dolazi do deplecije limfocita u limfatičnom tkivu obolelih svinja (Mandriol i sar., 2004). Obilna imunološka depresija izazvana sa PCV2 može da se objasni značajnim opadanjem proliferacije imunih ćelija nakon smanjene ili izostale produkcije faktora rasta za imune ćelije (Sarli i sar., 2001). Apoptoza je aktivni fiziološki proces u regulaciji populacije raznih ćelija, koja se karakteriše specifičnim morfološkim i biohemijskim promenama. Razni signali unutar ćelije ili signali poreklom van ćelije mogu aktivirati biohemijske reakcije u ćeliji koja rezultira apoptozom. U ovaj složeni proces su uključeni cistein proteinaze, enzimi iz familije kaspaza, koji igraju ključnu ulogu u procesu apoptoze. (Salvesen i Dixit, 1997; Roulston i sar., 1999). Mnogi virusi uključuju apoptozu ćelije domaćina kao deo njihovog životnog ciklusa. S druge strane, apoptoza može da bude značajan mehanizam otpuštanja i diseminacije virusnih čestica nastalih u ćeliji domaćina i na taj način se smanjuje zapaljenska reakcija organizma ili sam imuni odgovor na virus (Roulston i sar., 1999). Tražeći odgovor na pitanje kako dolazi do deplecije limfocita tokom infekcije sa PCV2 utvrdimo je da ORF3 gen ima značajnu ulogu u ovom procesu, što je dokazano u eksperimentalnim uslovima. Klonirani su PCV2 kojima je delecijom izbačen gen za ORF3 protein (ORF3 gen) i ovi virusi su se i dalje nesmetano replikovali bez citopatogenog efekta i značajno manje su indukovali apoptozu. U ćelijama inficiranim nemodifikovanim virusom javljaju se citopatogeni efekti i apoptoza u većem procentu. Nadalje, dokazano je da je u proces apoptoze indukovanog ORF3 proteinom uključen sistem kaspaza. U ćelijama inficiranim mutiranim PCV2, kome je delecijom uklonjen ORF3 gen, nije se povećao nivo kaspaze-8 i kaspaze-3 i apoptotske ćelije su bile mnogo ređe. Ova grupa autora je na osnovu svojih rezultata postavila teoriju da je ORF3 protein ključni faktor u patogenezi PCV2 infekcije jer može da indukuje apoptozu u inficiranim ćelijama tako što aktivira enzime apoptoze, tj. kaspazu-8 i kaspazu-3 (Liu i sar., 2005; Sinha et al., 2012).



S druge strane, neki eksperimenti za procenu stepena proliferativne aktivnosti i apoptoze, kao moguće mehanizme u patogenezi ćelijske deplecije u limfnim čvorovima svinja obolelih od PMWS sindroma, pokazali su smanjen stepen proliferativne aktivnosti i nepromenjen apoptotički indeks čime je isključena mogućnost nastanka deplecije limfocita apoptozom (Mandrioli i sar., 2004).

Odnos između PCV2 i ćelija koje su uključene u imuni odgovor različit je na početku i na kraju bolesti. Nekoliko eksperimentalnih modela PMWS sindroma (Allan i sar., 2000; Kennedy i sar., 2000; Krakowka i sar., 2002, 2003) ukazuju na to da je broj aktiviranih makrofaga inicijalni faktor za razvoj PMWS sindroma. U perifernoj krvi PMWS prasadi javlja se povećan broj cirkulišućih monocita, dok je broj T limfocita (pre svega CD8+ i CD4+/CD8+) i B limfocita smanjen u odnosu na zdravu prasadu (Segales i sar., 2001; Darwich i sar., 2002, 2004; Nielsen i sar., 2003; Tsai i sar., 2010). Hematološkom analizom PCV2 inficiranih prasadi, koja pokazuju simptome PMWS sindroma, utvrđena je limfopenija koja se karakteriše smanjenim brojem CD3+ CD4+ CD8- memorijskih Th ćelija, CD3+ CD4+ CD8- naivnih Th ćelija, CD3+ CD4- CD8+ Tc ćelija i CD3+ CD4- CD8- $\gamma\delta$ TCR+ T limfocita (Nielsen i sar., 2003). Uloga PCV2 u nastanku limfopenije je potvrđena u eksperimentima sa modifikovanim PCV2 (mPCV2). Veštačka infekcija mPCV2 nije izazvala uočljivu redukciju CD4+, CD8+ i CD4+/CD8+ T limfocita u perifernoj krvi. Rezultati istih autora govore u prilog tome da je modifikovani virus izazvao mnogo jači imuni odgovor. To se ogleda u većem titru antitela na Cap protein u serumu, u odnosu na infekciju sa divljim virusom, koji je pored niže serokonverzije izazvao i signifikantno smanjenje nivoa T limfocita periferne krvi (Liu i sar., 2006). Imunohistohemijskim ispitivanjima je utvrđena redukcija broja ili potpuni gubitak B limfocita u limfatičnom tkivu prasadi obolelih od PMWS sindroma (Shibahara i sar., 2000; Sarli i sar., 2001). U kortikalnom i parakortikalnom predelu limfatičnog tkiva uočena je redukcija broja T limfocita (CD3+) i

povećanje broja mononuklearnih-fagocitnih ćelija. Broj interfolikularnih dendritičnih ćelija takođe je smanjen. Dokazana je peritrabekularna i subkapsularna infiltracija makrofagima. Sve ove promene idu u prilog mišljenju da je više mehanizama uključeno u imunosupresivno dejstvo PCV2, prvenstveno smanjena sposobnost antigene prezentacije i redukcija broja B i T limfocita (*Sarli i sar., 2001; Chiannini i sar., 2001; Mandrioli i sar., 2004, 2006*).

Do danas se veoma malo zna o replikaciji PCV2 *in vivo*. Virusni genetski materijal je najčešće dokazan u zrelim ćelijama monocito-makrofagnog sistema. Ove ćelije su dugoživeće migratorne ćelije koje igraju važnu ulogu u diseminaciji virusa u organizmu. S obzirom da imaju veoma nisku mitotsku aktivnost ne mogu imati glavnu ulogu u umnožavanju virusa, što ne isključuje njihov značaj u patogenezi PMWS sindroma i učešće u diseminaciji virusa u organizmu (*Segales i sar., 2005*). Međutim, najnovija istraživanja ukazuju na mogućnost replikacije PCV2 u makrofagima u ranoj fazi infekcije, pre razvoja kliničkih simptoma i patomorfoloških promena (*Perez-Martin i sar., 2007; Yu i sar., 2007*).

Prisustvo virusnog genoma ili virusnog antigena u tkivima i pojedinim ćelijama ne mora da znači i njihovo umnožavanje. Od ranije je poznato da se virusni genetski materijal prilikom replikacije nalazi u ćelijskom jedru u obliku dvolančane DNK koji se još naziva i replikaciona forma (RF). Danas je moguće obojiti replikujući PCV2. Tako je isti dokazan u limfocitima, epitelnim ćelijama tonzila, epitelnim ćelijama bronhija i bronhiola, epitelnim ćelijama bronhijalnih žlezda, pneumocitima, retkim makrofagima limfnih čvorova, hepatocitima, tubulocitima, endotelnim ćelijama, epitelnim ćelijama želudačnih žlezda, epitelnim ćelijama debelog creva i ćelijama egzokrinog pankreasa (*Perez-Martin i sar., 2007*).

Ispitivanje nivoa DNK i Cap mRNK za PCV2 u raznim tkivima posle infekcije potvrdilo je da se najveći stepen umnožavanja virusa događa između sedmog i 15-og dana posle infekcije. Nivo DNK i Cap mRNK za PCV2 je najveći

u bronhijalnom limfnom čvoru, zatim u plućima i tonzilama 10-og dana posle infekcije. Od 15-og dana posle infekcije uvećava se i u drugim limfnim čvorovima, slezini, jetri i bubrezima. Nivo Cap mRNK smanjuje se u svim tkivima oko 20-og dana posle infekcije. Nadalje, dokazano je da se u ranoj fazi infekcije PCV2 umnožava i u alveolarnim makrofagima pluća, u kojima je već trećeg dana infekcije detektovano prisustvo Cap mRNK. Nalaz Cap mRNK za PCV2 u cirkulišućim T i B limfocitima ukazuje da su oni uključeni u replikaciju virusa u ranom periodu infekcije i da služe za raznošenje virusa po organizmu. Za razliku od monocita/makrofaga, limfociti periferne krvi i oni u limfnim čvorovima mogu se smatrati primarnim mestima virusne replikacije u ranoj fazi infekcije (Yu i sar., 2007).

Dijagnostika cirkovirusnih infekcija kod svinja ne razlikuje se od dijagnostike kod drugih vrsta, i bazira na detekciji virusa u kulturi tkiva, PCR analizi, imunohistohemiji, hibridizaciji *in situ*, ili dokazu antitela u krvnom serumu. S obzirom da se PCV2 u visokom procentu može detektovati i u zdravim zapaćima svinja njegovo prisustvo nije dovoljan dokaz da bi se potvrdila dijagnoza PMWS sindroma (Allan i Ellis, 2000; Kim i sar., 2001). Iz tog razloga, dijagnoza mora da obuhvati prisustvo kliničkih simptoma-kržljanje, prisustvo karakterističnih histopatoloških lezija u limfatičnom sistemu i prisustvo antigena i/ili genoma PCV2 unutar lezija (Chae, 2004). Ova tri kriterijuma ponaosob ne potvrđuju PMWS sindrom. Iz razloga što je klinička simptomatologija ove bolesti nespecifična i šarolika, prisustvo genoma ili kapsidnog antigena PCV2 u limfatičnom tkivu (Choi i Chae, 1999; Choi i sar., 2000; Sorden, 2000; Kim i Chae, 2001), zajedno sa deplecijom limfocita i/ili granulomatoznim limfadenitisom uzeti su kao kriterijum za dijagnozu (Sorden, 2000; Chae, 2004). Procenat svinja kod kojih su jasno izražena sva tri spomenuta kriterijuma razlikuje se od slučaja do slučaja. Često se dešava, međutim, da se u hroničnom toku bolesti javlja izuzetno slaba histopatološka promena sa mestimično prisutnom i niskom koncentracijom PCV2 u limfatičnom tkivu.

Najintenzivnije makroskopske i mikroskopske lezije, uz prisustvo PCV2 u promenama, dokazane su u limfatičnom tkivu svinja u prvoj nedelji kliničkog oboljenja (*Segales i sar., 2004*). Alternativno, kao pomoć prilikom postavljanja dijagnoze može da posluži utvrđivanje nivoa virusa u svežem tkivu, formalinom fiksiranom i u parafinu konzerviranom tkivu, ili u krvnom serumu, raznim metodama kvantitativne PCR tehnike. Naime, ispitivanja su dokazala da subklinički inficirane jedinke imaju manje od 10^6 genomskih jedinica PCV2 po mililitru krvnog seruma ili po 500 ng DNK tkiva, dok prasadi sa kliničkim simptomima PMWS sindroma imaju više od 10^7 genomskih jedinica PCV2, a mogu dostići i 10^{12} genomskih jedinica u mililitru krvnog seruma ili u 500 ng DNK tkiva. Rezultati ispitivanja pokazuju strogu korelaciju između količine virusa i izraženosti patoloških promena kod PMWS sindroma (*Brounborg i sar., 2004; Bálint i sar., 2009*).

Infekcije svinja sa cirkovirusom tip 2 klinički se manifestuju u formi sindroma kržljanja zalučene prasadi (PMWS), dermatitis-nefropatija sindroma (PDNS), reproduktivne smetnje krmača i nazimadi (SAMS-sow abortion mortality syndrome), kompleksa respiratornih poremećaja (PRCD), granulomatoznog enteritisa, nekrotičnog limfadenitisa, eksudativnog epidermitisa i kongenitalnog tremora prasadi. Uloga PCV2 u razvoju navedenih sindroma, izuzev u slučaju PMWS i PRCD, još nije sa sigurnošću utvrđena (*Chae, 2005*).

PMWS sindrom se prevashodno javlja kod prasadi uzrasta između 25-og i 120-og dana starosti, uglavnom između 60-og i 80-og dana (*Kim i sar., 2002*). Klinički znaci su nespecifični i variraju. Kod zalučene prasadi, PMWS sindrom se najčešće karakteriše progresivnim kržljanjem, uglavnom sa respiratornim smetnjama, dijarejom, bledilom kože i/ili žuticom. Postoji šest fundamentalnih simptoma koji sačinjavaju bazu za preliminarnu kliničku dijagnozu PMWS sindroma. Po redosledu učestalosti javljaju se: kržljanje, dispneja, uvećani limfni čvorovi, dijareja, bledilo kože i ponekad žutica (*Harding i Clark, 1997; Harding i*

sar., 1998; Harms, 1999; Ivetić i sar., 2002, 2003, 2004). Umereno povećanje telesne temperature 40.6 do 41.1 °C može da se javi prilikom infekcije (Balasch i sar., 1999). Blag konjuktivitis sa slabo do jako izraženim krmeljenjem učestala je pojava. Obolela prasada su mršava, sa grubom nakostrešenom dlakom, nezainteresovana za okolinu, često sa oborenim glavom na dole (Ivetić i sar., 2002, 2003). Periferni limfni čvorovi su uvećani (Ivetić i sar., 2004). Treba napomenuti da nisu svi znaci bolesti prisutni kod jednog obolelog praseta. Međutim, na zaraženoj farmi se mogu naći svi simptomi, možda ne u isto vreme, ali pre ili kasnije se ispoljavaju (Harding, 2004). Drugi klinički znaci kao što su kašalj, čir želuca, meningitis i iznenadno uginuće takođe se mogu javiti, ali u daleko manjem broju slučajeva (Harms, 1999; Harding, 2004; Szeredi i Szentirmai, 2008b). Često je uočljivo da prasada ubrzano i površno dišu sa upadljivo teškim ekspirijumom (Ivetić i sar., 2004). Navedena klinička simptomatologija kod PMWS sindroma karakteriše pre svega kategoriju zalučenih prasada (između 7. i 15. nedelje starosti), mada obolela i prasada na sasi pred zalučenje, kao i svinje u porastu. U Evropi je visok stepen mortaliteta kod PMWS sindroma, za razliku od Amerike. Oboljenje se često javlja u vidu epizootije (Harding i sar., 1998). Uzrok povećanog broja uginuća zalučene prasada i svinja u tovu su sekundarne bakterijske i virusne infekcije koje se javljaju kao komplikacija PMWS sindroma (Kim i sar., 2002). Udružene infekcije sa bakterijama ili drugim virusima faktori su koji komplikuju simptomatologiju, patogenezu i ishod PMWS sindroma. U slučajevima mešanih infekcija, a pri nepromenjenim ostalim uslovima, značajno se povećava stepen mortaliteta (Chae, 2004). PMWS sindrom se najčešće javlja udružen sa drugim virusnim i bakterijskim uzročnicima: virus reproduktivnog respiratornog sindroma (PRRSV), virus influence svinja (SIV), parvo virus svinja (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*. Mono-infekcija sa PCV2 utvrđena je u svega 15% PMWS slučajeva (Kim i sar., 2002; Pallares i sar., 2002). Udružene infekcije su različite u



.....

različitim zemljama. Na primer, u Koreji PRRSV i PPV su najčešći agensi koji se javljaju uz PCV2 (Kim i sar., 2002). Samo jedan slučaj od 484 ispitanih prasadi obolelih od PMWS sindroma bio je istovremeno pozitivan i na PPV u USA (Pallers i sar., 2002). Najčešća bakterija koja se javljala u kombinaciji sa PCV2 je *Haemophilus parasuis*, dok je u nekim regionima najčešće izolovan *Streptococcus suis*. Traganjem za uzročnike virusne etiologije u slučajevima proliferativne nekrotične pneumonije (PNP) zakrčljalih svinja ispitivanja španskih autora rezultirali su nalazima koji uključuju u 39% slučajeva isključivo prisustvo PCV2, u 40% slučajeva PCV2 zajedno sa PRRSV, u zanemarivom broju slučajeva su bili prisutni drugi virusi, a u 11% slučajeva PNP virusni uzročnik nije utvrđen (Grau-Roma i Segales, 2007). PCV2 se u Evropi smatra značajnim etiopatogenetskim faktorom u razvoju PNP kod svinja (Grau-Roma i Segales, 2007; Szeredi i Szentirmai, 2008). Činjenica da je izolovano više vrsta patogenih uzročnika u slučajevima PMWS sindroma čvrsto potvrđuje gledište da udružene infekcije imaju zajedničke mehanizme u dejstvu na imuni sistem (Allan i sar., 2000; Krakowka i sar., 2001, 2003; Kim i Chae, 2003; Grau-Roma i Segales, 2007; Ramirez i sar., 2012), i da potpomažu progresiju PCV2 infekcije. Povećana prijemčivost svinja za ostale viruse i bakterije posledica je imunosupresije utvrđene u slučaju PMWS sindroma (Chianini i sar., 2003; Darwich i sar., 2003a).

Iz svega navedenog proizilazi da je klinička slika PMWS sindroma nespecifična i veoma raznovrsna, da njena pojava naročito u velikim aglomeracijama svinja može da unese zabunu u vezi sa: pothranjenošću, malapsorpcionim sindromom, dijarejom izazvanom bakterijama i virusima, virusnim i bakterijskim pneumonijama, klasičnom svinjskom kugom i dr.

Iako se smatra da su promene na respiratornom sistemu i krčljanje prasadi pri zalučenju i u ranom tovu glavne karakteristike PMWS sindroma, obdukcijski nalaz je većinom nespecifičan i od malog značaja za postavljanje dijagnoze. Patomorfološka slika je uglavnom raznolika kod PMWS sindroma i

.....

razlikuje se od farme do farme u zavisnosti od sekundarnih uzročnika koji su najčešći u tim zapaćtima (*Segales i sar., 2004*). Respiratorne smetnje su veoma česte zbog visokog stepena zaraženosti većine farmskih svinja Mikoplazmama, PRRSV i sličnim respiratornim patogenima (*Krakovka i sar., 2001; Ellis i sar., 2004; Kixmoller i sar., 2008; Hansen i sar., 2011*).

Pri obdukciji je uočeno da su pluća često mesto promena različitog karaktera i intenziteta. Na plućima je izražena lobularnost parenhima i interlobularni edem. U većini slučajeva javlja se konsolidacija kranioventralnih režnjeva pluća, kao posledica razvoja bronhopneumonije (*Rosell i sar., 1999; Opriessnig i sar., 2006*). Medijastinalni limfni ćvorovi su uglavnom uvećani i edematozni. Takođe su uvećani i ingvinalni superfcijalni, mezenterijalni i submandibularni limfni ćvorovi (*Rosell i sar., 1999; Segales i sar., 2004*). Treba napomenuti da ove lezije nisu uvek prisutne i ne mogu se smatrati karakteristićnim za PMWS sindrom. Nekada su limfni ćvorovi normalne velićine ili čak atrofićni (*Segales i sar., 2004*). U manjem broju slučajeva limfni ćvorovi mogu pokazati promene u vidu multifokalnih nekroza vidljivih i golim okom (*Segales i sar., 2000a*). Od ostalih makroskopskih promena kod PMWS sindroma istiće se povećanje ili smanjenje velićine jetre sa narandžastom ili žutom bojom. U tom slučaju je i žutica prisutna. Bubrezi mogu na površini da imaju multifokalne bele pege razlićitog dijametra (*Rosell i sar., 2000; Martinez i sar., 2006*). Ulceracija želuca u predelu regije *pars oesophagica* je nekada uočljiva. Ove lezije su uglavnom udružene sa sekundarnim infekcijama, multifaktorijalnog su porekla i nisu direktna posledica dejstva PCV2 (*Segales i sar., 2004; Szeredi i Szentirmai 2008b*). Ulkus želuca može da izazove unutrašnje krvavljenje, koje može da bude uzrok uginuća prasadi obolelih od PMWS sindroma, ili prouzrokuje bledilo kože i sekundarnu anemiju (*Segales i sar., 2000b*), koji su česti prateći klinićki znaci ove bolesti. Anemija bez prisustva gastrićnog ulkusa je takođe čest nalaz kod PMWS sindroma (*Darwich i sar., 2003a*). Prasad u hronićenoj fazi kržljanja često imaju oslabljenu muskulaturu,

istaknutu kičmu i druge koštane izbočine praćene seroznom atrofijom masnog tkiva (*Segales i sar., 2004*).

Smatra se da je deplecija limfocita u limfatičnom tkivu najkarakterističnija histološka lezija kod PMWS sindroma i ogleda se u relativnom povećanju medularnog dela zbog progresivnog gubitka limfocita folikularne i interfolikularne zone. Izražena deplecije limfocita koja se javlja u zadnjem stadijumu bolesti znatno slabi funkciju limfnog čvora zbog gubitka efektorskih ćelija odbrambenog sistema (*Segales i Domingo, 2002*).

Različiti stepen deplecije limfocita sa gubljenjem folikularne strukture u limfatičnom tkivu prisutan je kod gotovo svih slučajeva PMWS sindroma. Ovaj nalaz se uglavnom javlja u kombinaciji sa multifokalno ili difuzno izraženom infiltracijom makrofagama, epiteloidnim i gigantskim ćelijama (*Segales i sar., 2004*). Epiteloidne ćelije mogu sadržati i intracitoplazmatska inkluziona telašca, veličine dva do 15 μm . U folikulima se često uočavaju velike ćelije sa obilnom eozinofilnom citoplazmom, reč je o folikularnim dendritičnim ćelijama (*Rosell i sar., 1999*). Deplecija limfocita u B-ćelijskim i T-ćelijskim zonama izražena je u različitom stepenu, u zavisnosti od težine infekcije. U promenjenim predelima je fibrovaskularna stroma jače izražena. U nekim slučajevima se uočavaju aktivirane venule sa visokim endotelnim ćelijama (*Chianini i sar., 2003*). Povećan je broj folikularnih dendritičnih ćelija koje pokazuju citoplazmatsku pozitivnost na prisustvo nukleokapsidnog proteina PCV2. Limfni čvorovi mogu pokazati i koagulacionu nekrozu folikularnih centara u vidu multifokalnih ili konfluirajućih predela u kombinaciji sa vaskularnom trombozom, čiji mehanizam nastanka još nije razjašnjen. Nema dokaza o uzroku nekrotizirajućeg vaskulitisa u limfnim čvorovima ili ostalim tkivima obolelih svinja koji pokazuju koagulacionu nekrozu. Nekrotične lezije u limfnim čvorovima su često zabeležene u slučajevima mešanih infekcija svinja sa PCV2 i virusom Aujeszky bolesti (*Rodriguez i sar., 1999*). Novija saznanja međutim potvrđuju direktni uticaj PCV2 u razvoju vaskularnih lezija kao što su

degeneracija endotelnih ćelija, perivaskularni i intramuralni edem, vaskulitis, perivaskulitis, fibrinoidna nekroza i vaskularna tromboza. Naime, virusni antigen je dokazan u intravaskularnim mononuklearnim ćelijama, endotelnim ćelijama, miocitima, ćelijama mononuklearnog infiltrata limfnih i krvnih sudova različitih organa, pa i samog moždanog tkiva i moždanih ovojnica. Ovi nalazi ukazuju na značaj vaskularnog sistema u patogenezi oboljenja vezanih za PCV2 (*Opriessnig i sar., 2006; Seeliger i sar., 2007; Szeredi i Szentirmai 2008a; Langhor i sar., 2010; Galindo-Cardiel i sar., 2011*). Kod drugih infekcija, za razliku od infekcije sa PCV2, limfni čvor reaguje karakterističnom reakcijom. Kao prvo, folikularnom i interfolikularnom hiperplazijom, što je posledica aktivacije B i T limfocita. Drugo, invazijom limfocita u interfolikularnu zonu medularne regije. Treće, povećanom ekspresijom molekula koji pospešuju zadržavanje antigena. Četvrto, aktivacijom venula sa visokim endotelom omogućava se migracija memorijskih limfocita iz cirkulacije u limfni čvor (*Tizzard, 1996*). Sve navedeno nedostaje u limfnom čvoru kod prasadi obolelih od PMWS sindroma, zbog već opisane deplecije limfocita (*Allan i Ellis, 2000; Sarli i sar., 2001; Segales i sar., 2002*).

U Pajerovim pločama i tonzilama često se zapaža deplecija limfocita, osim u folikulima, i u interfolikularnim zonama. U folikularnim zonama limfatičnog tkiva deplecija limfocita ponekad može biti toliko izražena, da u limfnim folikulima prevladavaju ćelija strome (*Rosell i sar., 1999*). Druga karakteristična promena na limfatičnom tkivu kod PMWS sindroma je granulomatozno zapaljenje, koje može biti uočljivo pre svega u limfnim čvorovima ali se nekada uočava i u slezini, Pajerovim pločama, tonzilama i jetri. U najvećem broju slučajeva prisutno je u ingvinalnom superficijalnom limfnom čvoru (*Chae, 2004*). Ova slika se karakteriše infiltracijom tkiva epiteloidnim ćelijama i ponekad višejedarnim džinovskim ćelijama. Epiteloidne ćelije su aktivirani makrofagi koji se pojavljuju u vidu velikih ćelija sa obilnom, bledom, penastom citoplazmom. Višejedarne džinovske ćelije su tipa Langhans. Nastale

su spajanjem makrofaga, imaju od pet do 20 jedara raspoređenih periferno. Intracitoplazmatska inkluziona telašca su velika, multipla, bazofilna, imaju grozdoliku strukturu i u nekim slučajevima mogu se uočiti u citoplazmi makrofaga, epiteloidnih i višejedarnih džinovskih ćelija (*Segales i sar., 2004*).

U jetri se nalazi umerena infiltracija portne regije ćelijama zapaljenja, vakuolizacija, povećanje i zaokrugljivanje hepatocita sa kariomegalijom. Posledično dolazi do sužavanja sinusoidnih kapilara (*Clark, 1997; Segales i sar., 2004; Sinha i sar., 2012*). Mogu da se jave i lezije sa generalizovanom perilobularnom fibrozom, dezorganizacijom režnjića sa masovnim gubitkom hepatocita. Ove promene su uglavnom udružene sa žuticom i makroskopskim promenama na jetri (*Segales i sar., 2004*). U ciljne ćelije jetre za PCV2 infekciju spadaju Kupferove ćelije, ćelije inflamatornog infiltrata i hepatociti. Antigen PCV2 je u Kupferovim ćelijama i ćelijama mononuklearne loze lociran u citoplazmi, izuzetno retko u jedru. Nasuprot tome, nukleinska kiselina PCV2 u hepatocitima je najčešće locirana u jedru a retko u citoplazmi (*Allan i sar., 2000; Rosell i sar., 2000; Sinha et al., 2012*). Po drugim autorima hepatociti koji sadrže virusni antigen veoma se retko javljaju kod PMWS sindroma (*Krakovka i sar., 2004*). Ponekad je moguće dokazati virusni genetski materijal i u cirkulišućim mononuklearnim ćelijama u sinusoidima i portnim regijama jetre, kao i u endotelnim ćelijama kapilara. U izraženim slučajevima PMWS sindroma Kupferove ćelije, po koja endotelna ćelija, ćelije inflamatornog infiltrata i ćelije granuloma su pozitivne na nukleokapsidni protein PCV2. Slično kao i u limfnom čvoru makrofagi učestvuju u fagocitozi i u citoplazmi sadrže antigene virusa. Prisustvo virusnog antigena u njihovom ćelijskom jedru je zanemarujuće u odnosu na količinu virusnog antigena u citoplazmi (*Krakovka i sar., 2004*).

Neki autori su na osnovu težine lezija hepaticna oštećenja podelili u četiri stadijuma (*Rosell i sar., 2000*). Prvi stadijum oštećenja jetre se karakteriše niskim intenzitetom inflamatorne infiltracije portnog prostora, multifokalnog

karaktera. Drugi stadijum se karakteriše umereno do intenzivno izraženom ćelijskom infiltracijom u parenhimu jetre uz aktivaciju Kupferovih ćelija. Ređe se mogu naći apoptotična tela u parenhimu jetre. Karakteristično obeležje trećeg stadijuma oštećenja jetre je prisustvo mononuklearnog inflamatornog infiltrata u jetrinom parenhimu, dezorganizacija strukture režnjića različitog stepena i prisustvo apoptotskih tela. Intenzivna difuzna inflamatorna infiltracija je prisutna u portnim prostorima. U polovini slučajeva uočava se povećanje hepatocita sa izraženom kariomegalijom. Ne retko, zapaža se i kondenzacija hromatina uz nuklearnu membranu. Četvrti stadijum se karakteriše generalizovanom perilobularnom fibrozom sa izraženom dezorganizacijom strukture režnjića i masovnim gubitkom hepatocita. Preostala stroma je difuzno infiltrirana mononuklearnim ćelijama (*Rosell i sar., 2000*). Ovi nalazi pokazuju da hepatociti mogu da budu ciljane ćelije za PCV2 viru i da se u njima vrši replikacija virusa. Verovatno se hepatociti inficiraju preko Kupferovih ćelija, endotelnih ćelija sinusoida i mononuklearnih ćelija, koji su locirani periportno. Infekcija hepatocita se kvalitativno razlikuje od infekcije ćelija monocitno/makrofagne linije, utoliko što je kod hepatocita lokalizacija virusa u jedru dok je kod ovih drugih u citoplazmi. Infekcija hepatocita dovodi do promene u morfološkom izgledu ovih ćelija i do njihovog raspada, uključujući megalocitozu sa kariomegalijom i apoptotsku alteraciju (*Clark, 1997; Rosell i sar., 2000*). Histopatološki nalaz upućuje na mišljenje da su PCV2 i apoptoza najverovatnije u vezi sa smrću hepatocita. Tako, ekstenzivni gubitak hepatocita, difuzna zapaljenska infiltracija jetre i perilobularna fibroza dovode do zadnjeg stadijuma oštećenja jetre. Makroskopski, ove jetre su cirotične, i bez mogućnosti za regeneraciju. Proliferacija bilijarnih kanala nije obavezan nalaz (*Rosell i sar., 2000; Segales i sar., 2004*).

Slezina takođe pokazuje promene kod PMWS sindroma. Uglavnom se promene javljaju u beloj pulpi, u vidu smanjenog broja limfocita u periarterijskom limfatičnom omotaču (PALS-u). U tim regijama se nakuplja

inflamacijski ćelijski infiltrat, koji okružuje arteriolu (*Rosel i sar., 1999; Krakowka i sar., 2001*). Sincicijalne ćelije takođe mogu biti prisutne eventualno sa intracitoplazmatskim inkluzionim telašcima (*Rosel i sar., 1999*). Veliki broj polimorfonuklearnih granulocita je prisutan u crvenoj pulpi, a mnogo manji u peritrabekularnim sinusima (*Chianini i sar., 2003*).

Pajerove ploče kod PMWS sindroma mogu pokazati različiti stepen deplecije limfocita u folikulima i u perifolikularnoj regiji. U predelima gde je izražena depopulacija limfocita, uočavaju se ćelije strome. Sporadično mogu da se uoče sincicijalne ćelije unutar folikula. Sincicijalne ćelije se mogu javiti i na periferiji limfatičnog tkiva Pajerove ploče, kao i u stromi lamine proprije crevnih resica ili u limfnom sudu (*Rosell i sar., 1999; Opriessnig i sar 2006*).

Na bubrezima se u nekim slučajevima PMWS sindroma mogu naći promene u vidu intersticijalnog nefritisa i pijelitisa. Infiltracija mononuklearnim ćelijskim elementima je uočljiva u renalnom korteksu. Zapaljenske regije su okružene zonama proliferacije fibroblasta. Moguće je i prisustvo sincicijalnih ćelija. Može da se javi i multifokalni serozni glomerulonefritis. Nekada se javlja fibrinozni glomerulonefritis sa fibrinskim naslagama u Bowmanovoj kapsuli (*Rosell i sar., 1999; Segales i sar., 2004; Martinez i sar., 2006*).

Miokarditis je najčešći nalaz kod novorođenih prasadi ili fetusa intrauterino inficiranih sa PCV2. Ponekad se pored miokarditisa može zapaziti i umerena miofibrilarna degeneracija. Na malim arteriolama miokarda mogu da se uoče i difuzni periarteritisi ili endarteritisi uz infiltraciju mononuklearnim ćelijskim elementima. Nekada se uočavaju apoptotične ćelije u zidu krvnih sudova miokarda. Može da se javi i fibroza miokarda kod hroničnog toka bolesti. Nekada se javlja multifokalni supurativni i limfohistiocitni perikarditis. U nekim slučajevima se mogu uočiti i transmuralne hemoragije u miokardu (*Rosell i sar., 1999; Opriessnig i sar., 2006*).

Subakutna intersticijalna pneumonija je čest nalaz kod prasadi obolelih od PMWS sindroma (*Rosell i sar., 1999; Segales i sar., 2004*). Plućne lezije se

karakterišu umerenim zadebljanjem alveolarnih septi sa infiltracijom mononuklearnim ćelijama, pre svega makrofagima i limfocitima, ponekad i višejedarnim makrofagima. Hiperplazija pneumocita tipa 2 je takođe uočena, uz zadebljanje interalveolarne septe. Nalaz bazofilnih intracitoplazmatskih inkluzija u makrofagima kod PMWS sindroma (Clark, 1997; Kiupel i sar., 1998; Kim i sar., 2002), nije prisutan u svim slučajevima zapaljenja pluća (Rosell i sar., 1999; Choi i sar., 2000). Kod svega 27,8 % ispitanih PMWS slučajeva, na jednoj farmi u Koreji, bila su prisutna intracitoplazmatska inkluzionarna tela u makrofagima pluća (Kim i sar., 2002). U hroničnim slučajevima nekada je moguće uočiti i obliterirajući fibrozni bronhiolitis ili bronhopneumoniju različitog intenziteta. Kod mešanih infekcija se vidi obilna eksudacija polimorfonuklearnih granulocita uz prisustvo velikog broja makrofaga u alveolama i bronhijama. U nekim isečcima pluća se uočava jak peribronhijalni i perivaskularni mononuklearni ćelijski infiltrat (Clark, 1997; Rosell i sar., 1999; Segales i sar., 2000a). U nekim slučajevima je uočljiva deplecija limfocita u BALT-u (bronchus-associated lymphoid tissue) pluća. Intersticijalna pneumonija kod svinja je veoma česta i može biti izazvana sa velikim brojem uzročnika. Lista za diferencijalnu dijagnozu je veoma velika, u slučaju kada imamo samo promenjena pluća kao dostupan uzorak (Mandrioli i sar., 2004). PMWS sindrom izazvan sa PCV2 treba razlikovati od reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja (PRRS) koji je takođe virusno oboljenje. Oba oboljenja, PMWS i PRRS, karakteriše intersticijalna pneumonija uz prisustvo velikog broja mononuklearnih ćelija (Clark, 1997; Harding i Clark 1997; Cheon i Chae, 1999). Deplecija limfocita u limfatičnom tkivu i infiltracija makrofagima i višejedarnim džinovskim ćelijama osnovno je obeležje PMWS sindroma (Clark, 1997; Harding i Clark, 1997; Kiupel i sar., 1998; Choi i Chae, 1999; Choi i sar., 2000; Kim i sar., 2002), dok virus PRRS bolesti indukuje folikularnu hiperplaziju u limfatičnom tkivu (Halbur i sar., 1996; Cheon i Chae, 1999).



U plućnom tkivu, antigen PCV2 se može detektovati u epitelnim ćelijama alveola, bronhija i bronhiola. Nalazi se i u intersticijalnim mononuklearnim ćelijama. Čest je nalaz i u ćelijama inflamatornog eksudata u lumenu alveola, bronhija i bronhiola. Virusni antigen je uočen i u glatkomišićnim ćelijama krvnih sudova i bronhija, kao i u epitelnim ćelijama submukoznih bronhijalnih žlezda (Rosell i sar., 1999; Opriessnig i sar., 2006; Seeliger i sar., 2007; Szeredi i Szentirmai., 2008a; Becskei i sar., 2010).

U isečcima jetre antigen PCV2 najčešće je dokazan u mononuklearnom ćelijskom infiltratu u periportnim zonama. Virusni antigen je prisutan i u Kupferovim ćelijama. U manjem obimu može se uočiti i u hepatocitima i bilijarnim epitelnim ćelijama. Intersantno je napomenuti da su hepatociti retko pozitivni, i da oni pokazuju nuklearnu distribuciju virusnog antigena a ne citoplazmatsku. Hepatociti koji eksprimiraju antigen PCV2 se uglavnom nalaze periferno lobularno (Rosell i sar., 1999; Opriessnig i sar., 2006; Seeliger i sar., 2007; Becskei i sar., 2010).

U limfatičnom tkivu se nalazi velika količina virusnog antigena. Čelije u limfatičnom tkivu, u kojima je obeležen virusni antigen, uglavnom su makrofagi, mada se antigen ponekad može naći i u limfocitima. Limfociti, slično hepatocitima, pokazuju nuklearnu pozitivnost na virusni antigen. U slezini, u glatkomišićnim ćelijama trabekula, takođe se može naći antigen PCV2 (Rosell i sar., 1999; Opriessnig i sar., 2006; Seeliger i sar., 2007; Becskei i sar., 2010).

Virusni antigen se može dokazati i u epitelnim ćelijama bubrežnih kanalića, mononuklearnom ćelijskom infiltratu oko tubula i glomerula, kao i u glatkomišićnim ćelijama arteriola kore bubrega (Rosell i sar., 1999; Opriessnig i sar., 2006; Seeliger i sar., 2007; Becskei i sar., 2010).

U tankim i debelim crevima, virusni antigen se najčešće sreće u limfatičnom tkivu creva (GALT) kao i u epitelnim ćelijama crevnih resica. Citoplazmatska pozitivnost može se povremeno uočiti i u acinusnim i epitelnim

ćelijama izvodnog kanala pankreasa (Rosell i sar., 1999; Opriessnig i sar., 2006; Seeliger i sar., 2007; Becskei i sar., 2010).

Miokardiociti i vaskularni endotel pokazuju pozitivnu reakciju na prisustvo antigena PCV2. Virusni antigen je dokazan i u regijama sa fibroznim promenama u miokardu (Opriessnig i sar., 2006).

Za dijagnostiku cirkovirusnih infekcija svinja laboratorijama stoje na raspolaganju metode za kultivaciju virusa, metode za detekciju antitela i metode za detekciju i karakterizaciju nukleinske kiseline i antigena virusa.

Obzirom da su PCVAD multifaktorijalna oboljenja, sa kompleksnom patologijom i nedovoljno razjašnjenom etiologijom, postoji potreba za razvojem visoko senzitivnih i specifičnih dijagnostičkih metoda za detekciju i identifikaciju PCV2. Za dijagnostiku PMWS sindroma od značaja su moderne metode koje omogućuju simultano dokazivanje veze između virusa kao uzročnika oboljenja i tkivne lezije kao posledice njegovog dejstva. S obzirom da detekcija PCV2 ne podrazumeva i postojanje PMWS sindroma, metode kao što su PCR tehnika i serološke analize često nisu dovoljne da bi se postavila decidna dijagnoza. Imunohistohemija i hibridizacija *in situ* su dijagnostičke metode koje omogućuju lokalizaciju PCV2 u inficiranom tkivu ili ćeliji. Pomoću ovih metoda moguća je istovremena vizuelizacija ćelijskih detalja, histološke građe tkiva i prisustvo PCV2. Dakle, u tkivnim lezijama u istom isečku, istovremeno može da se ispituje i histološka promena i prisustvo uzročnika (Choi i Chae, 1999; Choi i sar., 2000; Kim i Chae, 2001; Kim i sar., 2003a; Mandrioli i sar., 2004; Park i sar., 2005).

S obzirom da se danas još nezna za efikasnu terapiju ovog kompleksnog, multifaktorijalnog oboljenja, borba se svodi na pridržavanje pravila dobre proizvođačke prakse koji smanjuju stres, eliminišu faktore udružene infekcije ili makar snižavaju njihovo prisustvo u zapatima svinja (Batista, 2006). Mortalitet i ekonomski gubici mogu se smanjiti poboljšanjem zootehničkih mera, izbegavanjem mešanja svinja, držanjem u manjim grupama, razdvajanjem po



.....

starosnim kategorijama, primenom principa *sve unutra - sve napolje* i blagovremenim izdvajanjem obolelih jedinki iz grupe (Madec i sar., 2000; Royer i sar., 2000). Jedna od mogućih profilaktičkih mera kod PMWS sindroma je imunoprofilaksa tj. primena vakcine za kontrolu infekcije sa PCV2. Prvi eksperimenti u imunoprofilaksi PMWS sindroma datiraju od pre par godina. U to vreme, konstruisane su dve vakcine za kontrolu PCVAD. Jedna je DNK a druga subjedinična vakcina. DNK vakcina je injekcija čistog DNK plazmida, dok je subjedinična vakcina emulzija virusnog antigena. Subjedinična vakcina daje dobar virus-neutralizujući efekat, rano se javlja humoralni imuni odgovor za razliku od DNK vakcine. Smatra se da subjedinična vakcina, pre svega, pokreće humoralni imuni odgovor koji se bazira na stvaranju virus-neutralizacionih antitela (Blanchard i sar., 2003).

Od 2007. godine u razvijenim zemljama u kojima se PMWS sindrom endemski javlja, registrovane su komercijalne vakcine koje treba da posluže kao mera preventive i kontrole ove bolesti. U Srbiji su od 2011. godine dostupne komercijalne vakcine za kontrolu PCVAD. Vakcinacijom se uspešno smanjuje viremija i intenzitet histopatoloških lezija. Danas postoji nekoliko tipa vakcina protiv cirkovirusnih infekcija. Sve su one inaktivisane, rekombinantne ORF2 subjedinične vakcine koje služe za aktivnu imunizaciju svinja. CircoFLEX™ (Iglevac CircoFLEX™, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH) je najnovija komercijalna vakcina spomenutih osobina. Ova vakcina sadrži kapsidni protein PCV2 kao aktivnu komponentu i vodeni polimer (karbomer) kao adjuvans. Doza vakcine po jedinki je 1ml, aplikuje se intramuskularno, jednokratno. Prasad se vakcinišu u starosti od tri nedelje. Da bi se dokazala efikasnost ove vakcine rađeni su eksperimenti. U vakcinisanoj grupi prasadi prevladavale su jedinke sa titrom virusa znatno nižim od 10^8 gE/ml. Blizu 80% nevakcinisanih životinja imali su viremiju, i kod većine je nivo viremije bio preko 10^8 gE/ml. Nivo antitela na PCV2 je takodje bio različit. Rezultati vakcinacije pokazali su da je u grupi vakcinisanih jedinki titar antitela bio značajno viši u odnosu na

nivo kod nevakcinisanih prasadi. Razlike u dnevnom prirastu su takođe bile značajne. Vakcinisana prasadi imala su bolju konverziju hrane i veći dnevni prirast. Ta razlika za ceo period tova iznosila je preko osam kilograma telesne mase po jedinki. Takođe je utvrđeno da su simptomi kržljanja, kašlja i dispneje značajno bili smanjeni kod vakcinisanih jedinki, pogotovo je ta razlika bila velika u fazi viremije (između 10. i 26. nedelje života). Mortalitet se takođe smanjuje u slučaju primene vakcine. U jednom eksperimentu, glavna slika prilikom uginuća prasadi iz placebo grupe bila je kržljanje (30% prasadi), dok je svega 4% uginulih životinja vakcinisane grupe pokazivalo kržljanje. Iz dobijenih rezultata je zaključeno da PCV2 ORF2 mrtva bakulovirusna vakcina, sa visokom koncentracijom antigena i karbomera kao adjuvansa, može uspešno da posluži za aktivnu imunizaciju PCV2 seropozitivnih prasadi (*Kixmoller i sar., 2008*). Danas je u komercijalnoj upotrebi i vakcina pod nazivom Suvaxyn (Suvaxyn PCV2 One Dose™; Fort Dodge Animal Health, Inc, Fort Dodge, Iowa, USA). Vakcinacija se vrši jednokratno u dozi od 2ml po jedinki, intramuskularno. Ova vakcina je mrtva himer vakcina zato što je proizvedena kombinacijom genetskog materijala PCV1 i PCV2. Slično prethodnoj vakcini i ova u značajnoj meri redukuje viremiju i mikroskopske lezije izazvane sa PCV2. Ovi efekti se jasno uočavaju čak i kod jedinki sa višim nivoom maternalnih antitela u momentu vakcinacije (*Opriessnig i sar., 2008*). Nivo maternalnih antitela kod prasadi varira zbog različitog imunskog statusa krmača (*Cino-Ozuna i sar., 2011; Podgórska and Stadejek, 2011*). Mislilo se da će maternalna antitela značajno suprimirati imuni odgovor posle vakcinacije, međutim, dobijeni su zadovoljavajući rezultati i kod prasadi sa većim nivoima maternalnih antitela u momentu vakcnacije. Ovi rezultati potvrđuju da je preporučljivo da se sva prasadi vakcinišu oko 26. dana života (*Opriessnig i sar., 2008; Cino-Ozuna i sar., 2011; Young i sar., 2011*).



3. CILJ I ZADACI

Cilj ovih ispitivanja bio je:

1. da se utvrdi prisustvo cirkovirusnih infekcija domaćih i divljih svinja;
2. da se razjasni karakter i stepen oštećenja imunološkog sistema kod domaćih i divljih svinja prirodno inficiranih cirkovirusom-2 i obolelih od PCVAD;
3. da se utvrdi tropizam cirkovirusa-2.

Postavljeni cilj je realizovan kroz sledeće zadatke:

- a) utvrđivanje prevalencije infekcije domaćih i divljih svinja cirkovirusom-2;
- b) utvrđivanje makroskopskih promena na limfatičnim organima (submandibularni, medijastinalni, mezenterijalni i ingvinalni superficijalni limfni čvorovi, tonzile, slezina, Pajerove ploče, ileocekalna valvula), plućima, jetri, bubrezima i srcu obolelih domaćih i divljih svinja;



- c) utvrđivanje karaktera i intenziteta histopatoloških promena na limfatičnim organima (submandibularni, medijastinalni, mezenterijalni i ingvinalni superficijalni limfni čvorovi, tonzile, slezina, Pajerove ploče, ileocekalna valvula), plućima, jetri, bubrezima i srcu obolelih domaćih i divljih svinja;
- d) evaluaciju ustanovljenih histoloških lezija;
- e) dokazivanje distribucije *Cap* antigena cirkovirusa-2 u limfatičnim organima (submandibularni, medijastinalni, mezenterijalni i ingvinalni superficijalni limfni čvorovi, tonzile, slezina, Pajerove ploče, ileocekalna valvula), plućima, jetri, bubrezima i srcu obolelih domaćih i divljih svinja;
- f) dokazivanje distribucije DNK cirkovirusa-2 u fazi mirovanja i u fazi replikacije u limfatičnim organima (submandibularni, medijastinalni, mezenterijalni i ingvinalni superficijalni limfni čvorovi, tonzile, slezina, Pajerove ploče, ileocekalna valvula), plućima, jetri, bubrezima i srcu obolelih domaćih i divljih svinja;
- g) utvrđivanje distribucije ćelija koje eksprimiraju DNK i *Cap*-antigen cirkovirusa-2 uz kvantifikaciju imunopozitivnog signala.



4. MATERIJAL I METODE

Ispitivanja su izvršena na ukupno 140 svinja, 60 domaćih, 60 divljih svinja i na kontrolnoj grupi od 10 domaćih i 10 divljih svinja. Domaće svinje su bile uzrasta od jedan do pet meseci, i poticale su iz 13 objekata sa osam farmi različitog lokaliteta epizootiološkog područja Severno-bačkog okruga. Na svim ispitanim farmama zabeležen je značajan porast uginuća u kategoriji zalučениh prasadi u odgoju i predtovu. Ispitivana prasada su pokazivala simptome od značaja za PMWS sindrom. Divlje svinje su bile različite starostne kategorije, od mladih prasadi uzrasta nekoliko meseci, do odraslih, razvijenih jedinki starosti više godina. Ispitane divlje svinje su bile plen odstrela na dva lovišta epizootiološkog područja Severno-bačkog okruga, u periodu između 2005. i 2010. godine, a o njihovom zdravstvenom stanju za života i eventualnim kliničkim manifestacijama bolesti nema podataka.

Kod domaćih svinja, nakon uginuća prirodnom smrću sa znacima jake izmršavelosti, izvršena je obdukcija i posle detaljnog makroskopskog pregleda uzorkovan je materijal za histopatološku, imunohistohemijsku i PCR analizu, i hibridizaciju *in situ*.

Divlje svinje su nakon odstrela transportovane u regionalne lovačke sanitarne punktove gde se pristupilo detaljnom makroskopskom pregledu i uzorkovanju materijala za iste analize kao kod domaćih svinja.

Kontrolnu grupu sačinjavale su mlade domaće i divlje svinje (10+10), dobre telesne kondicije i bez znakova oboljenja, kod kojih PCR analizom nije utvrđeno prisustvo PCV2.

Za PCR analizu uzorkovani su pluća, slezina i ingvinalni superficijalni limfni čvorovi od svake jedinke.

Za histopatološka i imunohistohemijska ispitivanja, kao i za hibridizaciju *in situ* od limfatičnog tkiva uzorkovani su submandibularni, medijastinalni, mezenterijalni i ingvinalni superficijalni limfni čvorovi; tonzile; slezina i creva domaćih i divljih svinja. Od organa su uzorkovani pluća, jetra, bubrezi i srce. Uzorkovani materijal poreklom od domaćih i divljih svinja fiksiran je u 10% neutralnom formalinu u trajanju od 24-48 sati. Posle fiksacije tkivo je obrađeno u automatskom tkivnom procesoru i ukalupljeno u parafinske blokove. Parafinski iseći debljine oko 5µm bojeni su hematoksilin-eozin (HE) metodom.

U cilju molekularne detekcije PCV2 u uzorcima organa domaćih i divljih svinja, vršeno je ispitivanje prisustva dela ORF2 fragmenta genoma ovog virusa u plućima, ingvinalnim superficijalnim limfnim čvorovima i slezini, metodom lančane reakcije polimeraze (Polimerase Chain Reaction - PCR). Postupak ekstrakcije DNK iz pluća, ingvinalnih superficijalnih limfnih čvorova i slezine vršen je u mikrotubama, upotrebom komercijalnog kita "QIAamp® DNA Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Nemačka) po uputstvu proizvođača. Za amplifikaciju ORF2 dela genoma PCV2 veličine 501 baznih parova (bp) korišćeni su specifični oligonukleotidni prajmeri forward PCV2-2A:

5'-CACCTTCGGATATACTGTCAA-3' (nukleotidna pozicija 1582-1562) i reverse PCV2-2B: 5'-TACATGGTTACACGGATATTGTA-3' (nukleotidna pozicija 1082-1104) (Sandvik i sar., 2001). PCR metoda je sprovedena uz pomoć komercijalnog kita "HotStar Taq Master Mix Kit" (Qiagen, Hilden, Nemačka) sa malim modifikacijama uputstva proizvođača. Tačnije, PCR mešavina za svaki uzorak se sastojala od 12,5 µl Hot Star Taq Master Mixa (u kojem se nalazi Hot Star Taq DNA polimeraza u jedinstvenom pufernom sistemu i izbalansiranim koncentracijama MgCl₂ i dezoksi-nukleotidnih baza), po 25 pmol od oba prajmera koncentracije 100 pmol/µl, i 9 µl PCR čiste vode. Ovako pripremljenim mešavinama smo dodali ekstrahovanu DNK naših uzoraka u

količini od po 3 μ l. Tako je ukupna zapremina PCR mešavine iznosila 25 μ l. Kao pozitivna kontrola je upotrebljena DNK referentnog virusa PCV2 soj „Stoon 1010“ iz Kanade. Temperaturni ciklus „thermocycler“-a (Thermocycler Gradient, Eppendorf, Nemačka) u kojem se odvijala reakcija bio je sledeći: aktivacija hemijski blokirane termostabilne Taq polimeraze 15' na 95°C, nakon čega je sledilo 40 ponovljenih ciklusa denaturacije 30 sekundi na 95°C, vezivanja prajmera («annealing») 30 sekundi na 55°C i sinteza komplementarnih lanaca («extension») 30 sekundi na 72°C, nakon čega je sledilo konačno podešavanje i izduživanje lanaca DNK 10 minuta na 72°C i hlađenje na 4°C do detekcije dobijenog PCR produkta na gelu. Upotrebljeni prajmeri u reakciji su specifično umnožavali fragment ORF2 dela genoma veličine 501 baznih parova (bp). Dokazivanje PCR produkata vršeno je elektroforezom (Hoefler HE 33 Mini Submarine, „Amersham Biosciences“) na 1,5% agaroznom gelu („Invitrogen Life Technologies“, Velika Britanija) i vizuelizacijom na transiluminatoru („TFX-35.M“, Vilber Lourmat, Francuska).

Od imunohistohemijskih metoda korišćena je trostepena streptavidin-biotin metoda (LSAB2). U tkivnim isečcima je najpre izvršeno blokiranje endogene peroksidaze u 3% H₂O₂ u metanolu na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta. Zatim je izvršeno demaskiranje antigena primenom proteinaze K (Dako Proteinase K, Ready-to-use, REF S3020, Dako) u trajanju od četiri minuta. Sva ispiranja i razblaženja tokom reakcije rađena su u TRIS-HCl puferu pH 7,6. Zatim su isecci inkubirani sa primarnim monoklonskim antitelom za PCV2 (Porcine Circovirus Type 2 Monoclonal Antibody, Lot No:RB0608, Rural Technologies, Inc. Brookings, SD) u razređenju 1:500, u trajanju od 60 minuta na sobnoj temperaturi. Za detekciju je korišćen kit Dako Cytomation LSAB2 system-HRP (K0675, Dako). Vizuelizacija reakcije postignuta je primenom diaminobenzidina (DAB+, K3468, Dako) u trajanju od 10 do 15 minuta. Na mestu pozitivne reakcije javljaju se precipitati smeđe boje. Kontrastiranje isečaka izvršeno je u hematoksilinu (Mayerov hematoksilin) u trajanju od dve

sekunde. Nakon bojenja iseći su montirani pomoću vodenog medijuma za montiranje Glycergel (C563, Dako).

Kao negativna kontrola tokom imunohistohemijskog ispitivanja uzoraka korišćeni su istovetni tkivni iseći koji nisu tretirani primarnim antitelom.

Kao pozitivna kontrola tokom imunohistohemijskog ispitivanja korišćeni su tkivni iseći kod kojih je prethodno, metodom PCR i imunohistohemijski, potvrđeno prisustvo *Cap* antigena PCV2.

Sa ciljem da se u ispitanim tkivima utvrdi prisustvo i lokalizacija genoma PCV2, urađena je hromogena *in situ* hibridizacija na tkivnim isećima limfih čvorova (submandibularni, medijastinalni, mezenterijalni i ingvinalni superficialni), tonzila, slezine, Pajerovih ploča, ileocekalne valvule, pluća, jetre, bubrega i srca domaćih i divljih svinja. Na tkivnim isećima je izvršena hibridizacija genoma divljeg virusa sa komercijalnom, PCV2 specifičnom, komplementarnom i replikativnom oligonukleotidnom genomskom probom (CP i RFP genomski proba). CP genomski proba u tkivnim isećima prepoznaje jednolančanu i dvolančanu DNK, takođe i ORF1 mRNK cirkovirusa svinja 2, tj. kako virus u mirovanju tako i virus u fazi replikacije. Karakteristika RFP genomski probe je da je ona specifična samo za dvolančanu DNK PCV2, tj. za virusni genom u fazi umnožavanja, i hibridizacija se može obaviti isključivo sa genomom PCV2 koji je u fazi replikacije. U oba slučaja korišćena je digoksigeninom obeležena, komercijalna oligonukleotidna genomski proba sastavljena od 41 nukleotidne baze, koja je sintetisana na osnovu referentnog soja PCV2. Nukleotidni niz CP genomski probe PCV2 bio je sledeći:

DIG-5'-CCTTCCTCATTACCCTCCTCGCCAACAATAAAATAATCAAAA-3'
(PCV2 CP, 1017255, TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Nemačka).

Nukleotidna sekvenca za RFP genomski probu PCV2 bila je:

DIG-5'-TTTGATTATTTTATTGTTGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGG-3'
(PCV2 RPF, 1017256, TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Nemačka).



Prvo su tkivni iseći debljine oko 4 μ m postavljeni na specijalne, pozitivno naelektrisane, silinizirane mikroskopske pločice (Chem Mate Capillary Gap Microscope Slides, Ref S2025, Dako). Zatim je izvršena deparafinizacija tkivnih isečaka u ksilolu i rehidracija kroz seriju različito postotnog etanola. Iseći su ispirani trokratno u Autobuferu (Ref 372182, Biomeda) i podvrgnuti proteolitičkom tretmanu primenom Pepsina (Ref P7012, Sigma) u trajanju od 10 minuta na temperaturi od 37°C radi lakše penetracije genomske probe. Aktivnost pepsina je prekinuta podizanjem temperature na 105°C u trajanju od osam minuta. Nakon trokrotnog ispiranja u Autobuferu izvršena je denaturacija DNK primenom 100% Formamida (Ref 22, 119-8, Sigma) u trajanju od pet minuta, na temperaturi od 105°C. Nakon pripreme rastvora za hibridizaciju (11.25 ml 100% Formamid, 3,75 gr Chondroitin sulfat (Ref 320699, Calbiochem), 12,5 ml 20XSSC, 2,5 ml 0,50 mM Phosphat buffer, 0,125 gr Blocking Reagent (Rosche Diagnostics) i 20 ml redestilovane vode) u njega je dodata genomska proba (CP ili RFP) u količini od 10 μ l. Tako pripremljeni rastvor sa Dig obeleženom genomskom probom nanešen je na tkivne isečke, i u fazi pre-hibridizacije inkubiran na 105°C u trajanju od pet minuta. Hibridizacija korišćene genomske probe i divljeg virusa u tkivima postignuta je inkubacijom isečaka u trajanju od 60 minuta na 37°C. Nakon inkubacije izvršeno je trokratno ispiranje u 0,5 X SSC i u 0,25 X SSC puferima. Iseći su zatim inkubirani u rastvoru za blokiranje - pufer 1 (pufer pH 7.5 sa sadržajem 3% Triton 100x (Ref23,472-9, Aldrich), 1% normalnog kozjeg seruma, 100 mM Tris, 150 mM NaCl u destilovanoj vodi) u trajanju od pet minuta na sobnoj temperaturi. Iseći su zatim inkubirani anti-Digoksigenin antitelima obeleženim alkalnom fosfatazom (Anti Digoxigenin AP Fab fragments, Cat.No. 11093274910, Rosche Diagnostics) u razređenju 1:500 u puferu 1, na temperaturi od 37°C, u trajanju od 60 minuta. Iseći su zatim trokratno ispirani u puferu 1 i puferu 2 (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂*6H₂O, 0.004% Tween 20 (Cat.No.23,472-9, Aldrich), 0.0025% Brij 35 (Ref 84184, Sigma)). Vizuelizacija

mesta hibridizacije postignuta je primenom veoma osetljive citohemijske reakcije između alkalne fosfataze, vezane za anti-Dig antitelo, i hromogena NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Cat.No. 11681451001, Rosche Diagnostics) kao supstrata. Nakon isteka tretmana isečaka sa anti-Dig antitelima urađeno je trokratno ispiranje u seriji pufera 1 i 2, nanet je hromogeni rastvor NBT/BCIP (3% rastvor u puferu 2) i izvršena njegova inkubacija u trajanju od 20 minuta na temperaturi od 37°C. Nakon što je obojena reakcija prekinuta ispiranjem u puferu 3 (1M bazični Tris pH 8 sa 0.5M EDTA u 1l destilovane vode) iseći su obojeni Fast Green-om u trajanju šest do sedam minuta, isprani pod tekućom vodom i pokriveni vodenim medijumom za pokrivanje. Na mestu pozitivne reakcije uočava se precipitat zrnaste strukture, tamnoplave boje.

Kao negativna kontrola tokom ispitivanja hibridizacijom *in situ* korišćeni su istovetni tkivni iseći koji nisu tretirani genomskom probom.

Kao pozitivna kontrola tokom ispitivanja hibridizacijom *in situ* korišćeni su tkivni iseći kod kojih je prethodno metodom PCR i hibridizacijom *in situ* potvrđeno prisustvo PCV2.

Histološki kriterijumi za klasifikaciju stepena oštećenja limfatičnog tkiva kod PCVAD definisani su na osnovu kriterijuma koje su opisali Chianini i saradnici (*Chianini i sar., 2003*). Na osnovu intenziteta utvrđenih histopatoloških promena u limfatičnom tkivu, koja su od značaja za PCVAD, tri stepena oštećenja su definisana, kako je to prikazano u tabeli br. 1. Po navedenoj kategorizaciji, intenzitet histopatoloških oštećenja prikazan je kao: blaga tkivna lezija (I); tkivna lezija srednjeg intenziteta (II); i tkivna lezija jakog intenziteta (III). Oznakom BL označeno je odsustvo promena koji su od značaja za PCVAD.

Tabela br. 1. Kriterijumi za analizu intenziteta histopatoloških promena u limfatičnom tkivu, koji su od značaja za PCVAD

Parametri	Kriterijumi za korišćenu analizu			
	Odsustvo (BL)	Blag (I)	Srednji (II)	Jak (III)
Deplecija limfocita	Bez deplecije	Blaga deplecija u B i T zavisnim zonama	Umerena deplecija u B i T zavisnim zonama	Izražena deplecija u B i T zavisnim zonama; čest nedostatak limfnih folikula
Infiltracija makrofagima	Bez infiltracije makrofagima	Mali broj makrofaga	Umereni broj makrofaga	Veliki broj makrofaga
Prisustvo infektivnog granuloma	Odsustvo granuloma	Odsustvo granuloma	Odsustvo granuloma	Često prisustvo granuloma
Prisustvo multijedarnih džinovskih ćelija	Odsustvo multijedarnih džinovskih ćelija	Odsustvo multijedarnih džinovskih ćelija	Retko prisustvo pojedinačnih multijedarnih džinovskih ćelija	Često prisustvo multijedarnih džinovskih ćelija
Narušena arhitektura limfatičnog tkiva	Arhitektura nije narušena	Arhitektura nije narušena	Arhitektura nije narušena	Često je narušena uobičajena arhitektura; otkrivanje strome

Rezultati imunohistohemijske (IHC) analize i komplementarne probe hibridizacije *in situ* (CP ISH) na limfatičnom tkivu su uz pomoć semikvantitativne metode grupisani u četiri grupe, od strane dva nezavisna pregledača. Grupe su definisane na osnovu broja imunopozitivnih ćelija na

isečcima limfatičnog tkiva. Kao kriterijum za definisanje grupa, uzet je broj pozitivnih ćelija na ukupno 100 izbrojenih ćelija po vidnom polju. Ukupno je 10 vidnih polja pregledano po isečku limfatičnog tkiva pod uvećanjem objektiva 20X. Lezije limfatičnog tkiva su na osnovu spomenutog kriterijuma grupisani na sledeći način: negativno (-), nema prisutnih imunopozitivnih ćelija; slabo pozitivno (+), < 20% pozitivnih ćelija; umereno pozitivno (++), 20-50% pozitivnih ćelija; i izrazito pozitivno (+++), > 50% pozitivnih ćelija. Kod ostalih ispitanih organa (pluća, jetra, bubreg i srce), pozitivna reakcija IHC i CP ISH nije grupisana na osnovu intenziteta u više grupa, već je označen kao negativan (-), nema prisutnih imunopozitivnih ćelija; ili kao pozitivan (+), prisutni su pozitivne ćelije u različitom broju.

Rezultati ispitivanja replikativne forme hibridizacije *in situ* (RFP ISH) na limfatičnom tkivu i ostalim ispitanim organima (pluća, jetra, bubreg i srce) označeni su kao: negativni (-), nema prisutnih imunopozitivnih ćelija; ili kao pozitivni (+), prisutne su pozitivne ćelije u različitom broju.

Kod domaćih svinja, jedinka koja je pokazivala kliničke znake kržljivosti i kod koje je PCR analizom dokazano prisustvo PCV2 u tkivima, okarakterisana je da boluje od PMWS sindroma (sistemski oblik PCVAD) u slučaju kada je intenzitet patohistoloških promena u limfatičnom tkivu u kategoriji promena srednjeg ili jakog intenziteta (II, III), uz obavezno prisustvo umereno pozitivnog ili izrazito pozitivnog (++, +++) IHC i CP ISH signala.

Kod divljih svinja, opravdana sumnja o prisustvu PMWS sindroma postavljena je u slučaju kada su kod inficirane mlade jedinke prisutne patohistološke promene u limfatičnom tkivu u kategoriji promena srednjeg ili jakog intenziteta (II ili III), uz obavezno prisustvo umereno pozitivnog (++) ili izrazito pozitivnog (+++) IHC i CP ISH signala.

U cilju statističke obrade podataka korišćeni su deskriptivni statistički parametri, uz pomoć kojih su se opisivale ispitivane promene kod domaćih i divljih svinja. Statistička signifikantnost razlika ispitivanih grupa promena

između domaćih i divljih svinja ustanovljavala se uz pomoć t-testa proporcije. Signifikantnost razlika je određena na nivou značajnosti od 5% i 1%. Dobijeni rezultati statističke analize prikazani su tabelarno i grafički. Statistička analiza je izvršena u statističkom paketu GraphPad PRISM 4.0 i Microsoft Office Excel-u.



5. REZULTATI ISPITIVANJA

5.1. Rezultati kliničkih ispitivanja domaćih svinja

Kod svih ispitanih prasadi evidentirano je kržljanje jakog intenziteta. Prasad zaostala u rastu imala su nakostrešenu dlaku, izražen kičmeni stub i druge koštane izbočine. Obolela prasad su imala pogrbljeno držanje tela i bledu kožu. Kod većine bilo je prisutno poremećeno disanje. Dispnoja je često bila toliko izražena da su se obolela prasad izdvajala od grupe, dalje od hranilice. Obolela prasad su glavu držala oborenu, sa otvorenim ustima. Zbog teške dispnoje uočavao se i fenomen „pumpanja“. Neka od obolelih prasadi imala su afoničan glas. Kod velikog broja ispitanih prasadi konstatovano je krmeljanje očiju zbog konjuktivitisa jačeg ili slabijeg intenziteta. U boksovima u kojima je veća naseljenost, obolela prasad su pokazivala teturav hod i simptome krajnje iscrpljenosti. Većina ispitane prasadi imala je zacrvenjen anus i perinealnu regiju zaprljanu retkim izmetom koji je sadržavao nedovoljno svarenu hranu. Kod nekih prasadi zapažena je dehidracija većeg stepena, i pozitivan test kožnog nabora u abdominalnoj regiji. Neka prasad su imala opstipaciju uz pojavu tenezmi. Telesna temperatura prasadi sa simptomima PMWS sindroma je varirala. većina je imala blago povećanje telesne temperature iznad fiziološke vrednosti. Prilikom podizanja prasadi uočeno je povećanje ingvinalnih superficijalnih limfnih čvorova.

Domaće svinje kontrolne grupe bile su u dobroj telesnoj kondiciji i nisu pokazivale kliničke znake bolesti.

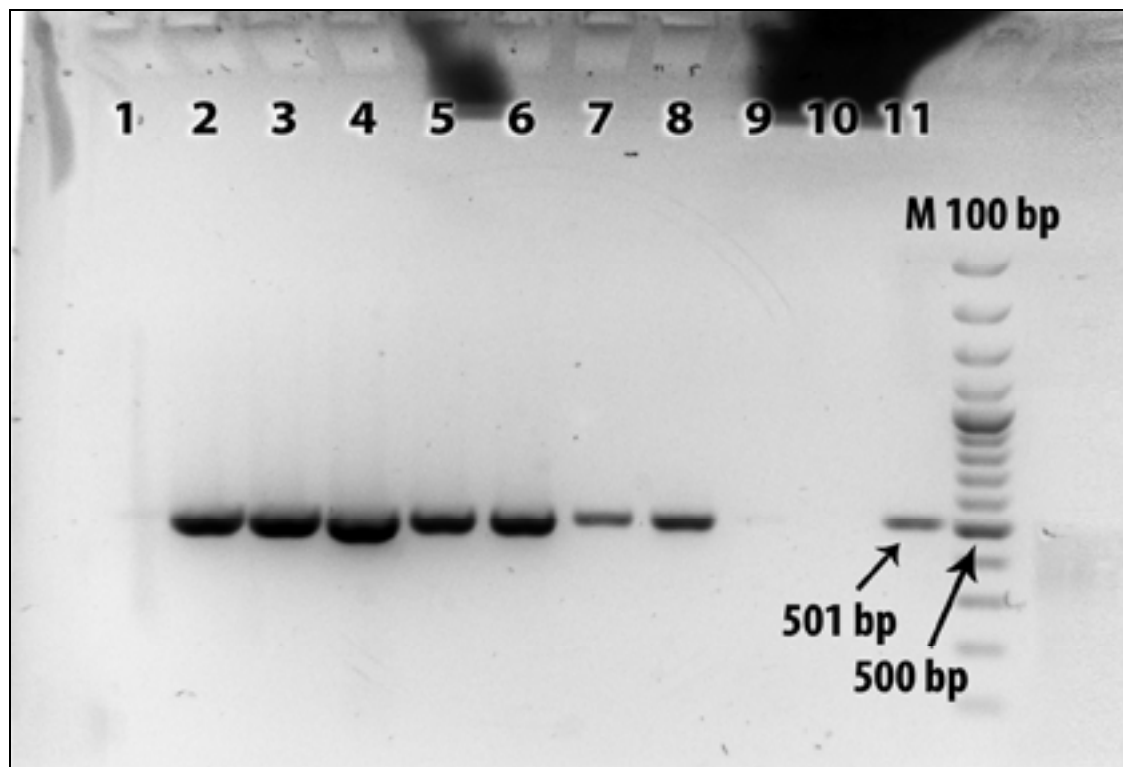


5.2. Rezultati PCR analize

Primenom lančane reakcije polimeraze (PCR) dokazano je prisustvo PCV2 u ispitivanim uzorcima pluća, slezine i ingvinalnog superficijalnog limfnog čvora, poreklom od divljih svinja i od domaćih svinja sa simptomima PMWS sindroma. U pozitivnim uzorcima, kao što se vidi na slici br. 1, dokazan je PCR produkt očekivane dužine (501 bp), koji odgovara fragmentu referentnog soja „Stoon 1010“ PCV2.

Rezultati su pokazali da je 60/60 (100%) ispitanih domaćih svinja i 16/60 (26,67%) ispitanih divljih svinja inficirano sa PCV2. Treba naglasiti, takođe, da je infekcija domaćih svinja sa PCV2 utvrđena na svih osam pregledanih farmi.

U ispitanim uzorcima pluća, slezine i ingvinalnog limfnog čvora poreklom od domaćih i divljih svinja kontrolne grupe nije dokazano prisustvo PCV2.



Slika 1. Rezultat elektroforeze PCR testa za detekciju PCV2.

5.3. Patoanatomske promene

U limfatičnom tkivu, plućima, jetri, bubrezima i srcu ispitanih domaćih i divljih svinja ustanovljene su raznovrsne patoanatomske promene, kao što je prikazano u tabeli br. 2.

U limfatičnom tkivu, plućima, jetri, bubrezima i srcu ispitanih domaćih i divljih svinja kontrolne grupe, nisu uočene patoanatomske promene.

Tabela br. 2. Najučestalije patoanatomske promene kod ispitanih domaćih i divljih svinja

Makroskopske promene	Domaće svinje	Divlje svinje
Generalno povećanje limfnih čvorova	42/60	49/60
Nekrotične promene na limfnim čvorovima	5/60	12/60
Zapaljenje ileocekalne valvule	52/60	60/60
Pneumonična pluća	54/60	45/60
Konsolidacija kranio-ventralnih plućnih režnjeva	46/60	4/60
Pneumonična pluća sa <i>Metastrongylus spp.</i>	0/60	41/60
Fibrozne promene na jetri	5/60	13/60
Zapaljenje seroza	22/60	0/60
Zapaljenje creva	48/60	42/60
Bubrezi sa belim tačkastim pegama	19/60	39/60



5.3.1. Patoanatomske promene u tonzilama

Kod 25/60 domaćih (41,66%) i 10/60 divljih (16,17%) svinja uočena je blaga hiperemija i edem tonzilarnog tkiva (*slika 2A*). Kod domaćih svinja se kod 5/60 (8,33%) moglo uočiti da su kripte tonzila izražene, sa žutim, nekrotičnim sadržajem koji je izlazio na pritisak. Ta promena je zapažena kod 47/60 (78,33%) divljih svinja.

5.3.2. Patoanatomske promene u limfnim čvorovima

Uvećanje limfnih čvorova bila je najučestalija promena i ustanovljena je kod 42/60 (70,00%) domaćih i 49/60 (81,67%) divljih svinja. Uvećani limfni čvorovi bili su edematozni, svetlo-žute, ili bele boje kod domaćih svinja, odnosno svetlo-smeđe do sive boje kod divljih svinja. Konzistencija im je bila čvrsto-elastične, a na površini preseka slabo se raspoznavala kora i srž (*slika 2B, 2C, 2D*).

Kod pojedinih domaćih svinja na submandibularnim limfnim čvorovima subkapsularno su uočene promene oker-žuto do svetlo-smeđe boje, dok je kod divljih svinja ista promena imala smeđu boju. Promena boje nije zahvatala dublje slojeve limfnog čvora, već samo površni sloj kore. Konzistencija ovako promenjenih limfnih čvorova bila je čvrsto-elastična. Na poprečnom preseku vidljiv je bio edem, sočnost površine preseka, i često nije bilo moguće razlikovati koru i srž (*slika 2B*).

Medijastinalni limfni čvorovi su uglavnom bili uvećani, ovalnog do duguljastog oblika, tamno-žute boje kod domaćih svinja, odnosno smeđe boje kod divljih svinja, čvrsto-elastične konzistencije. Kod jako uvećanih limfnih čvorova veličina im se kretala od dva do četiri centimetara, kod nekih divljih svinja čak do 8 centimetara, ljubičaste boje, glatke i sjajne površine i meke do

tvrdno-elastične konzistencije. Ovakvi limfni čvorovi su prominirali između plućnih režnjeva (*slika 4A*), površina preseka im je bila sočna, i kod većine se slabo raspoznavala kora i srž.

Mezenterijalni limfni čvorovi su bili izduženog do okruglastog oblika, žute ili svetlo-smeđe boje kod domaćih svinja, sivo-bele do svetlo-smeđe boje kod divljih svinja, čvrsto-elastične konzistencije. Na površini preseka uglavnom se nije raspoznavala kora i srž. Uvećani mezenterijalni čvorovi su se ne retko videli kao paketi u mezenterijumu imitirajući izgled creva (*slika 3A i 3B*).

Ingvinalni superficijalni limfni čvorovi su bili izduženog oblika. Kod domaćih svinja boja im je bila svetlo-žuta, kod divljih svinja svetlo-smeđa. Uglavnom su bili uvećani zbog čega su se jasno isticali u ingvinalnoj regiji (*slika 2C i 2D*). Veličina im je u pojedinim slučajevima dostizala dužinu od šest do osam centimetara, uz meko-elastičnu do tvrdno-elastičnu konzistenciju. Kod većine ispitanih svinja površina preseka ingvinalnih superficijalnih limfnih čvorova bila je edematozna, zamućenog izgleda, bez jasne granice kore i srži. Uz ovaj nalaz kod nekih jedinki uočena je i hiperplazija folikula. Kod 5/60 (8,33%) domaćih i 12/60 (20,00%) divljih svinja na površini preseka uočena su fokalna nekrotična polja.

5.3.3. Patoanatomske promene u slezini

Kod 40/60 (66,67%) ispitanih domaćih i 30/60 (50,00%) divljih svinja zapaženo je uvećanje slezine različitog stepena i karaktera. Uglavnom je slezina bila zaobljenih rubova, mrke boje i testaste konzistencije i površina preseka bila je zrnaste građe. Kod 8/60 (13,33%) divljih svinja površina preseka slezine bila je tamno-mrke boje, kašaste konzistencije i prelivala se preko rubova preseka. Kod domaćih svinja sa peritonitisom na površini slezine nalazile su se fibrinske naslage svetlo-žute boje (*slika 5D*) koje su se lako odvajale od površine. Retko je

konstatovano infarktno područje tamne boje, veličine do pola centimetra na rubu slezine, uglavnom kod divljih svinja.

5.3.4. Patoanatomske promene u tankim crevima

Tanka creva su kod 48/60 (80,00%) domaćih i kod 42/60 (70,00%) divljih svinja imala zapaljenske promene. Krvni sudovi mezenterijuma i zidova tankih creva bili su inicirani, hiperemični. Površina seroze tankih creva uglavnom je bila sjajna, glatka i providna. Kod jedinki kod kojih je bio prisutan peritonitis seroza je imala zamućeni izgled, često sa fibrinskim naslagama žute boje (slika 5D) koje su se lako odvajale od creva. U nekim slučajevima prisutan je bio meteorizam različitog intenziteta, a na istanjenom crevnom zidu uočavani su inicirani krvni sudovi (slika 5C). Zapaljenski proces je tanka creva uglavnom zahvatao segmentalno. Pajerove ploče su se jasno isticale subserozno, uglavnom su bile hiperemične i imale granulisanu strukturu. Crevni zid je najčešće bio zadebljan, edematozan i hiperemičan. Prilikom otvaranja creva isticao je redak sadržaj neprijatnog mirisa, uglavnom žute boje kod domaćih svinja i žuto-zelene boje kod divljih svinja, ponekad sa primesama krvi. Kada je crevni sadržaj bio hemoragičan sluznica creva je bila edematozna i tamno-crvene boje. Kod 9/60 (15,00%) divljih svinja u crevnom sadržaju, poreklom iz zadnjih partija tankih creva i iz debelih creva, uočen je veliki broj valjkastih parazita sivo-bele boje, dužine jedan do pet centimetara, prečnika oko 0,3 mm.

5.3.5. Patoanatomske promene u ileocekalnoj valvuli

Ileocekalna valvula je kod 52/60 (86,67%) domaćih svinja i kod 60/60 (100,00%) divljih svinja bila uvećana, edematozna. Često su uočeni nekrotični

predelim, koji su, pre svega kod divljih svinja 20/60 (30,00%), duboko prodirali u limfatično tkivo valvule (slika 3C i 3D). Ove nekrotične promene na ileocekalnoj valvuli divljih svinja bile su žuto-zelene ili braon boje. Nakon uklanjanja nekrotične mase na tim mestima ostajali su veliki kraterasti defekti. Kod domaćih svinja opisane promene nisu bile jakog intenziteta. Ileocekalna valvula je kod njih bila blago uvećana, edematozna, hiperemična i sa slabije izraženim nekrotičnim promenama uočenim kod 11/60 (18,33%) jedinki.

5.3.6. Patoanatomske promene u plućima

U plućima kod 54/60 (90,00%) ispitanih domaćih svinja uočene su promene koje su ukazivale na zapaljenje različitog karaktera, raširenosti i intenziteta. Pluća su bila uvećana i zaobljenih rubova. Pneumonične promene divljih svinja ustanovljene su na plućima kod 45/60 (75,00%) jedinki. Kod njih su ove promene uglavnom bile ograničene na kaudalne lobuse, u vidu blagih okruglih uzdignuća van ravni plućnog parenhima. Ove promenjene plućne regije divljih svinja bile su sive boje, tvrdo-elastične konzistencije, i ređe su zahvatale i kranijalne lobuse pluća. Na površini preseka kaudalnih lobusa pluća kod 41/60 (68,33%) divljih svinja uočavan je veliki broj valjkastih parazita, končastog oblika, bele boje, koji su ispunjavali bronhije (slika 4D). Paraziti su po morfološkim karakteristikama odgovarali opisu *Metastrongylus spp.* Parenhim pluća u okolini opisanih promena bio je sa prisutnim emfizematoznim i atelektatičnim lobulusima. Za razliku od divljih svinja, kod 46/60 (76,67%) domaćih svinja kranioventralni plućni lobusi bili su zahvaćeni promenama (slika 4B i 4C), koje su se ogledale u konsolidaciji i ljubičastom prebojavanju delova plućnog parenhima. Konsolidovani delovi pluća su bili testaste do tvrdo-elastične konzistencije, na površini preseka sočni, sa žutom ili roze prozirnom tečnošću koja se spontano cedila sa površine preseka. Promenjeni

pneumonični delovi pluća su u potpunosti bili bez vazduha. Neposredno pored konsolidovanih delova na površini preseka mogle su se uočiti i emfizematozne regije. Često je na serozi promenjenih delova pluća uočeno prisustvo tankih fibrinskih naslaga. Atektatični delovi pluća često su srasli sa porebrićom. Na poprečnom preseku iz bronhija se cedio penušav sadržaj žute ili bele boje. U plućima ispitanih domaćih i divljih svinja često je bio izražen interlobularni edem koji razdvaja plućne lobuluse i ističe lobularni izgled plućnog parenhima (*slika 4B*). Kod manjeg broja domaćih svinja u plućnom parenhimu su uočena jasno ograničena polja, tamno-ljubičaste boje, prekrivena debelim fibrinskim naslagama. Kod 20/60 (33,33%) ispitanih domaćih svinja u grudnoj duplji je bio prisutan eksudat fibrinoznog karaktera, uglavnom sa adhezijama seroza. Ove fibrinske naslage su bile svetlo-žute boje i lako su se odvajale od površine, osim u uznapredovanim stanjima kada su prožete vezivnim tkivom uz prisustvo priraslica. Kod 52/60 (86,67%) ispitanih domaćih svinja prilikom pregleda pluća u grudnoj duplji je uočena prozirna tečnost (*slika 5A*), žute ili roze boje, u neujednačenoj količini. Opisane promene na plućima su uglavnom bile posledica infekcije sa sekundarnim uzročnicima.

5.3.7. Patoanatomske promene u jetri

Hiperemija i blago uvećanje jetre bio je najčešći nalaz ustanovljen kod ispitanih domaćih i divljih svinja. Površina jetre je uglavnom bila sjajna i glatka, kod divljih svinja češće zrnastog izgleda. Kod 5/60 (8,33%) ispitanih domaćih svinja veličina jetre bila je smanjena, svetlo-žute boje i tvrdo-elastične konzistencije. Ova pojava bila je prisutna kod 13/60 (21,67%) divljih svinja, uglavnom starijeg uzrasta. Boja jetre ispitanih svinja je varirala, najčešće je bila svetlo-mrke boje kod domaćih, i tamno-mrke kod divljih svinja. Međutim, nađene su jetre žute boje, tamno-mrke boje, koje su neretko imale mozaičan

izgled i kod domaćih i kod divljih svinja. Uglavnom se na poprečnom preseku parenhima jetre jasno uočavala krv koja se cedila, kao posledica hiperemije. Kod domaćih svinja kod kojih je peritonitis bio prisutan na površini jetre se često zapažalo prisustvo fibrinskih naslaga svetlo-žute boje, koje su se lako odvajale od površine jetre (*slika 5D*). Kod nekoliko ispitanih svinja, sa izraženim fibrinoznim peritonitisom uz organizaciju fibrinskih masa, jetra je u potpunosti srasla sa okolnim organima. Kod 6/60 (10,00%) domaćih svinja i kod 12/60 (20,00%) divljih svinja na površini jetre su se multifokalno mogla uočiti mlečna polja, koja su prodirala i u dublji parenhim jetre. Kod manjeg broja ispitanih domaćih i divljih svinja na jetri se moglo zapaziti i prisustvo žuto-belih nekrotičnih ognjišta, veličine od jedan do tri milimetra, sa multifokalnom lokalizacijom na površini i u dubljem sloju parenhima. Žučna bešika je najčešće bila nepromenjena.

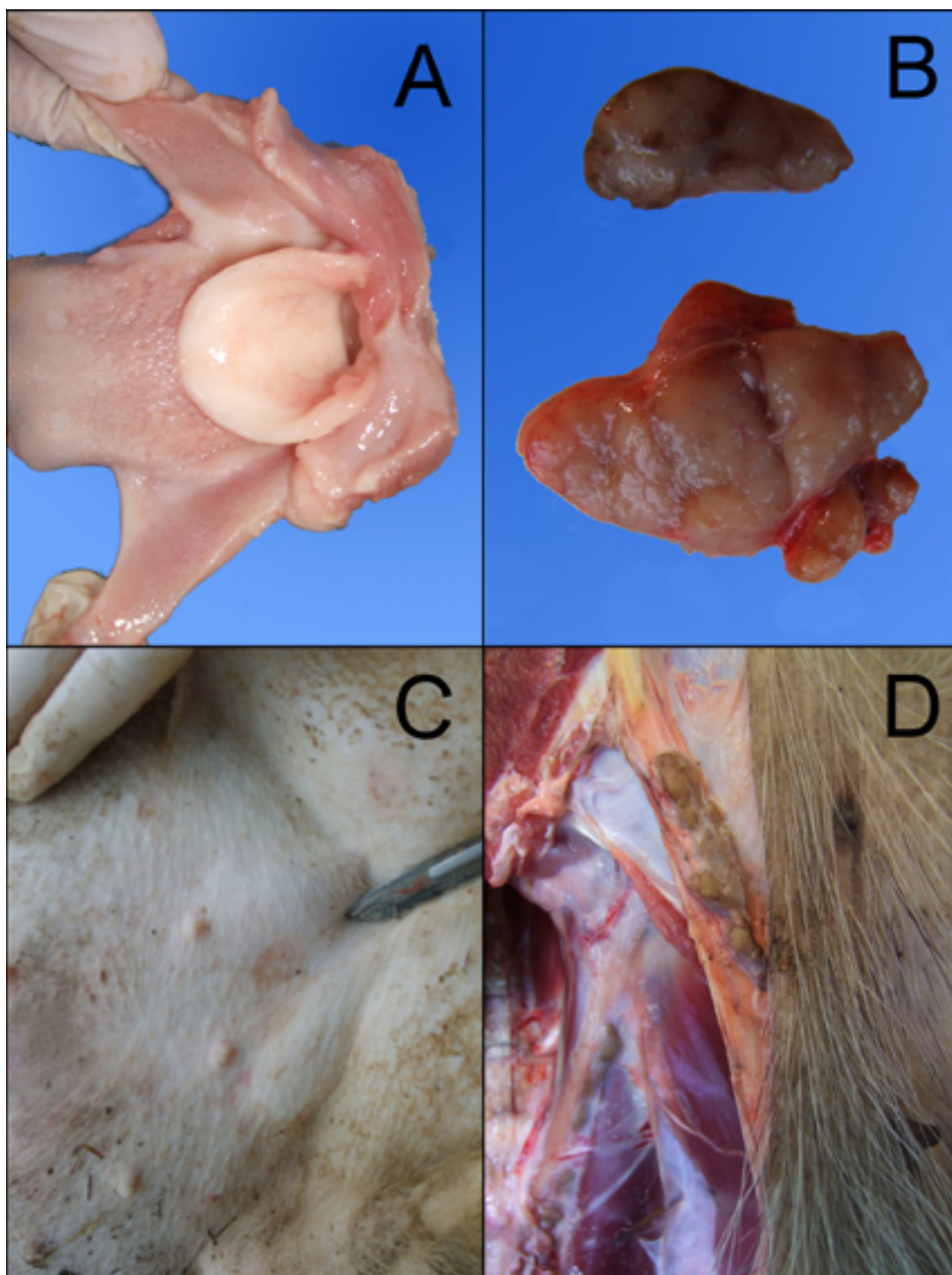
5.3.8. Patoanatomske promene u bubrezima

Kod većine ispitanih domaćih i divljih svinja bubrezi su bili uvećani i bleđi. Na površini bubrega uočene su bele pege kod 19/60 (31,67%) domaćih i kod 39/60 (65%) divljih svinja. Ove promene su bile promera jedan do tri milimetra i multifokalno su bile raspoređene (*slika 6A*). Na površini preseka kore bubrega uočena su polja bele boje, veličine oko jednog milimetra koji su multifokalno distribuirani po kori. Kod divljih svinja, naročito starijeg uzrasta, površina bubrega je često bila neravna sa kraterastim udubljenjima veličine jedan do nekoliko milimetra, bele boje, koji su prodirali u koru (*slika 6B*). Hiperemija je takođe bila čest nalaz na bubrezima ispitanih domaćih i divljih svinja.

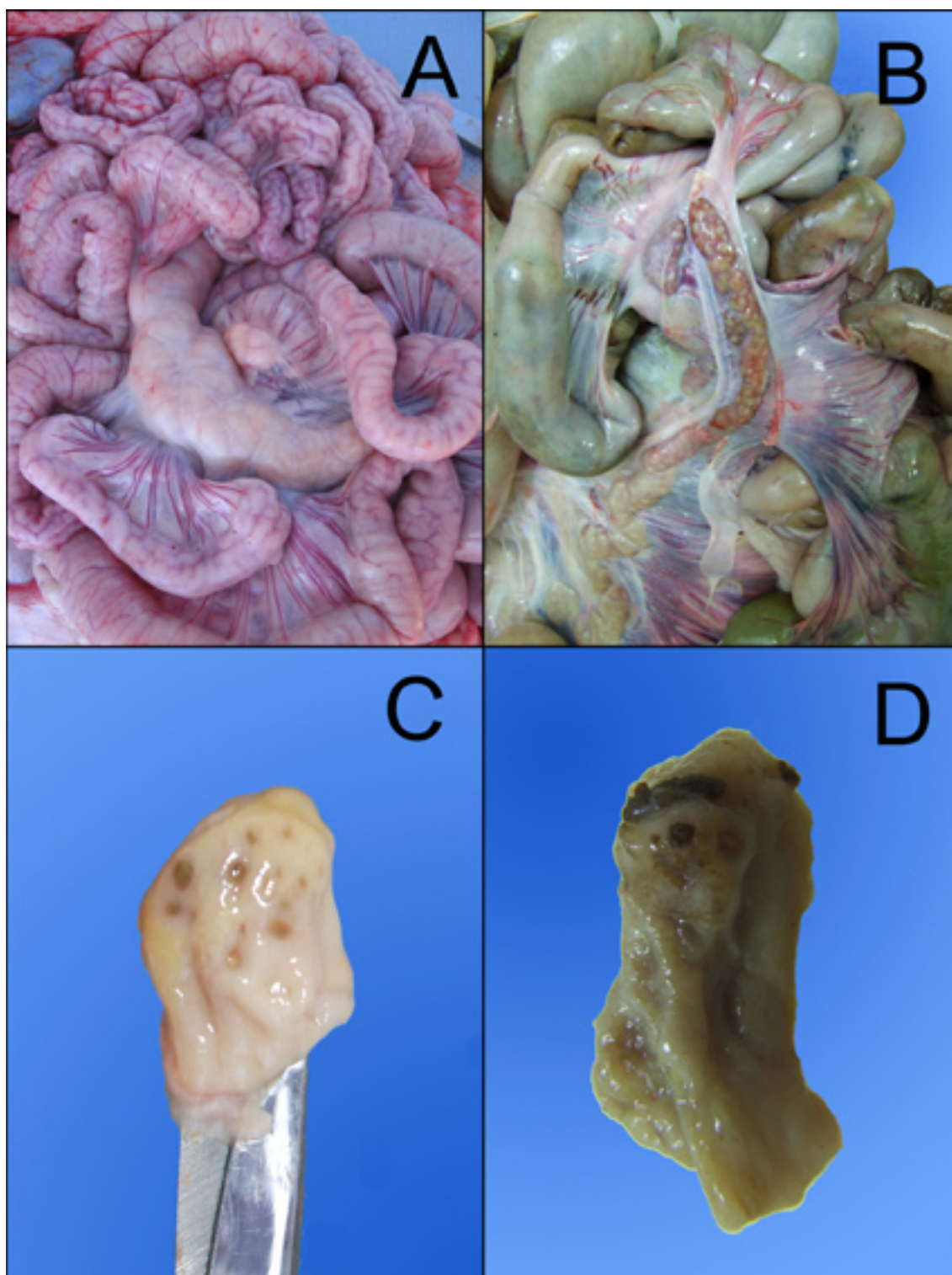
5.3.9. Patoanatomske promene u srcu

Prilikom otvaranja perikarda domaćih svinja često je uočena povećana količina prozirne tečnosti žute ili roze boje u srčanoj kesi (*slika 5B*). Perikard je u tim slučajevima pokazivao znake zapaljenja. Često su konstatovane fibrinske naslage na perikardu (*slika 5D*). Fibrinozni perikarditis je uglavnom bio ograničen samo na spoljašnji list perikarda, kada su se ove promene javljale u sklopu pleuritisa. U ovim stanjima uočene su priraslice sa pleurom. Kod svinja sa izraženom konsolidacijom pluća srčani mišić je bio hipertrofičan, dok je kod nekih bio istanjenih zidova i sa proširenim komorama. Bila su zapažena i diskretna tačkasta subepikardijalna krvavljenja, uglavnom kod domaćih svinja.

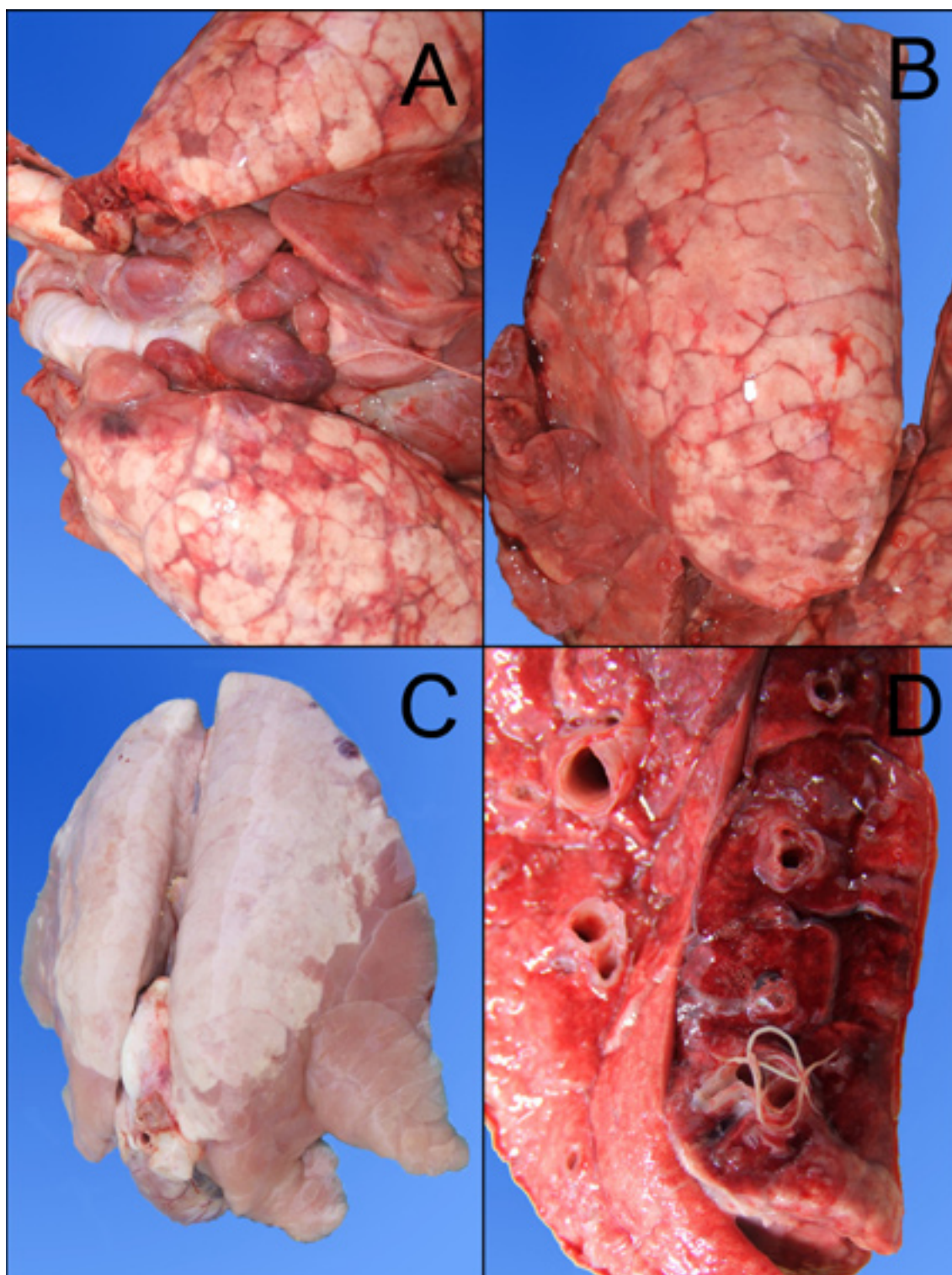




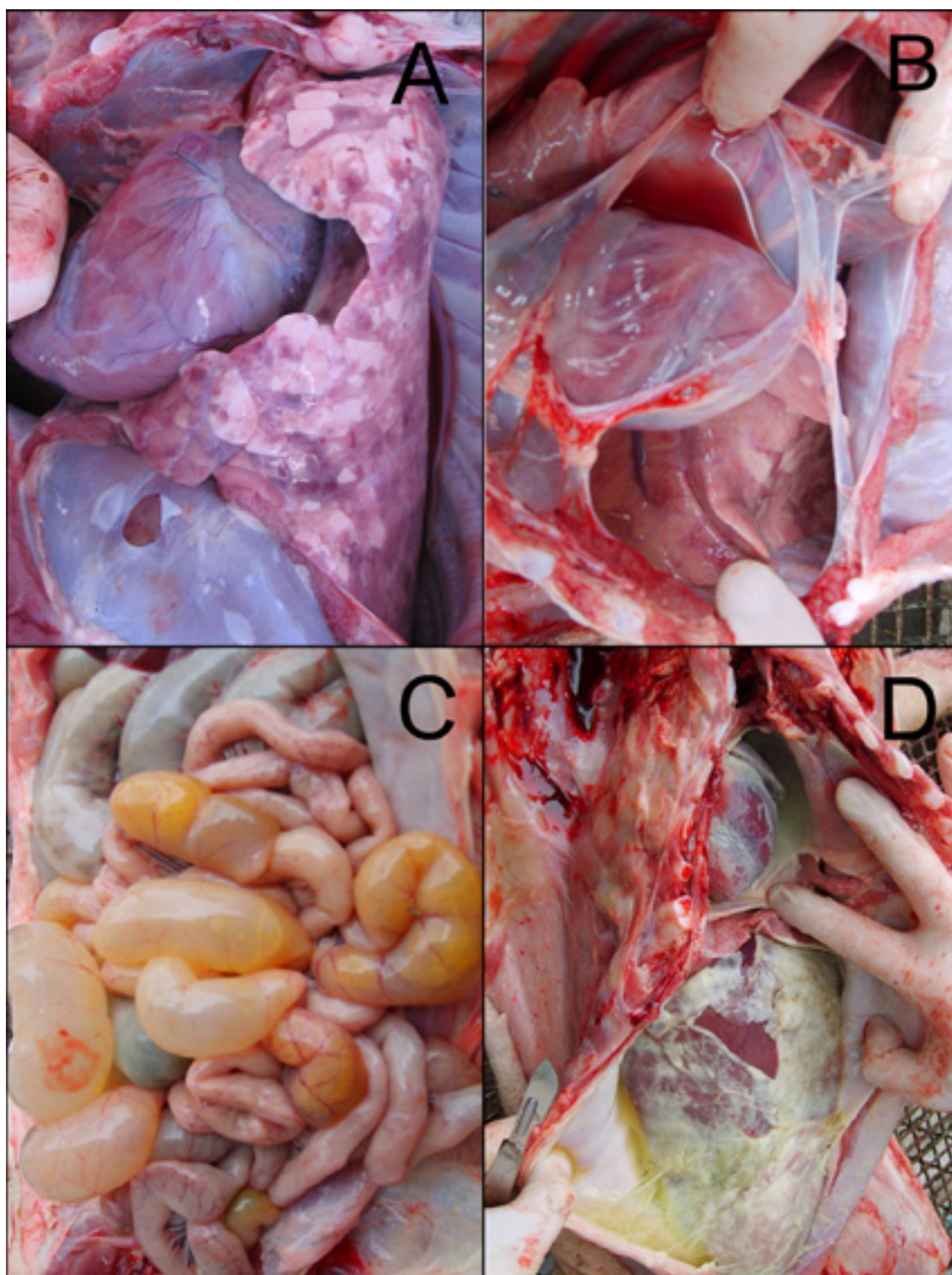
Slika 2. **A.** Tonzila domaće svinje, hiperemija i edem. **B.** Submandibularni limfni čvor divlje svinje, povećan, edematozan, замуćenog izgleda i bez jasne granice kore i srži-dole; bez promena-gore. **C.** Ingvinalni superficijalni limfni čvorovi domaće svinje, svojom veličinom se ističu u ingvinalnoj regiji. **D.** Ingvinalni superficijalni limfni čvor divlje svinje, uvećan, edematozan, izduženog oblika i sivo-žute boje.



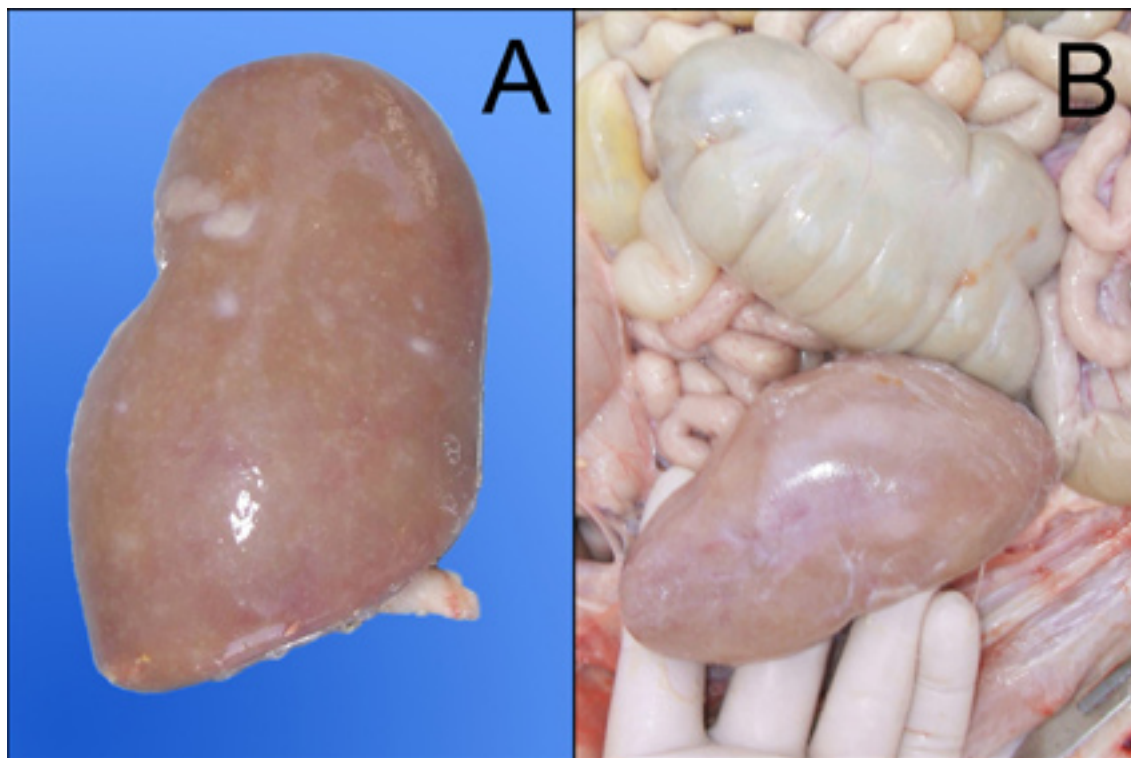
Slika 3. **A.** Mezenterijalni limfni čvorovi domaće svinje, uvećani, edematozni, jasno se ističu u hiperemičnom mezenterijumu. **B.** Mezenterijalni limfni čvorovi divlje svinje, uvećani, imitiraju izgled creva. **C.** Ileocekalna valvula domaće svinje, uvećana i edematozna. **D.** Ileocekalna valvula divlje svinje, uvećana, edematozna sa nekrotičnim poljima i kraterastim defektom.



Slika 4. **A.** Pluća domaće svinje sa uvećanim, edematoznim i hiperemičnim medijastinalnim limfnim čvorovima. **B.** Pluća domaće svinje, interlobularni edem. **C.** Pluća domaće svinje, konsolidovani kranioventralni režnjevi. **D.** Kaudalni plućni lobus divlje svinje sa većim brojem adultnih oblika plućnih vlašaca u bronhijama.



Slika 5. A. Grudna duplja domaće svinje sa seroznim eksudatom. B. Srčana kesa domaće svinje, perikarditis. C. Tanka creva domaće svinje, enteritis. D. Grudna i trbušna duplja domaće svinje, serozitis.



Slika 6. A. Bubrež domaće svinje sa multifokalnim belim pegama po površini. **B.** Bubrež divlje svinje, uvećan i bled sa ožiljcima.

5.4. Histopatološke promene

U limfatičnom tkivu, plućima, jetri, bubrezima i srcu ispitanih domaćih i divljih svinja ustanovljene su raznovrsne histopatološke promene, što je prikazano u tabeli br. 3 i 4.

Tabela br. 3. Učestalost i intenzitet histopatoloških promena od značaja za PCVAD u limfatičnim organima ispitanih domaćih i divljih svinja

	Tkivo	Intenzitet tkivne lezije			
		BL	I	II	III
Domaće svinje	Limfni čvorovi	7/60	6/60	32/60	15/60
	Pajerove ploče	12/60	7/60	30/60	11/60
	Ileocekalna valvula	15/60	11/60	29/60	5/60
	Tonzile	11/60	7/60	31/60	11/60
	Slezina	30/60	3/60	21/60	6/60
Divlje svinje	Limfni čvorovi	39/60	13/60	6/60	2/60
	Pajerove ploče	45/60	10/60	4/60	1/60
	Ileocekalna valvula	47/60	7/60	5/60	1/60
	Tonzile	47/60	8/60	4/60	1/60
	Slezina	54/60	4/60	1/60	1/60



Tabela br. 4. Najučestalije histopatološke promene u plućima, jetri, bubrezima i srcu kod ispitanih domaćih i divljih svinja

Tkivo	Histopatološke promene	Domaće svinje	Divlje svinje
Pluća	Deplecija limfocita u BALT-u	31/60	7/6
	Intersticijalna pneumonija	51/60	22/60
	Bronhopneumonija	52/60	45/60
	Vermiozna pneumonija	0/60	45/60
	Povećan broj pneumocita tipa II	48/60	18/60
	Fibrinozni pleuritis	19/60	0/60
Jetra	Infiltracija portne i periportne zone mononuklearnim ćelijskim elementima	47/60	31/60
	Multifokalna nekroza pojedinih hepatocita	18/60	16/60
	Perilobularna fibroza	4/60	15/60
Bubrezi	Multifokalni intersticijalni nefritis	28/60	31/60
	Glomerulonefritis	8/60	10/60
Srce	Infiltracija mononuklearnim ćelijama	11/60	12/60



Histopatološke promene različitog intenziteta, koje su od značaja za PCVAD, bile su prisutne kod domaćih i divljih svinja u različitom broju. Kod domaćih svinja promene slabog intenziteta ustanovljene su kod 6/60 (10,00%), promene srednjeg intenziteta kod 32/60 (53,33%) i promene jakog intenziteta kod 15/60 (25,00%) ispitanih jedinki. Kod 7/60 (11,67%) jedinki na limfatičnom tkivu nije bilo histopatoloških promena od značaja za PCVAD.

Histopatološkim ispitivanjima limfatičnog tkiva divljih svinja kod 39/60 (65,00%) ustanovljeno je da nema promena od značaja za PCVAD. Kod 13/60 (21,67%) su ustanovljene promene slabog intenziteta, kod 6/60 (10,00%) promene srednjeg intenziteta i kod 2/60 (3,33%) promene jakog intenziteta.

Kod domaćih i divljih svinja kontrolne grupe nisu ustanovljene promene od značaja za PCVAD.

5.4.1. Histopatološke promene u tonzilama

Histopatološkim pregledom isečaka tonzila ispitanih domaćih svinja utvrđene su raznovrsne promene. Promene koje su od značaja za PCVAD uočene su u tonzilama 49/60 (81,66%) domaćih i 13/60 (21,67%) divljih svinja, kao što je prikazano u tabeli br. 3. Površinski epitel je uglavnom bio nepromenjen. U subepitelnom predelu često je uočena infiltracija mononuklearnim ćelijskim elementima. Prisutni su bili folikuli sa ili bez jasno izraženim germinativnim centrima. Folikuli sa deplecijom limfocita su bili svetli, bez germinativnih centara i sa retkim limfocitima (*slika 7A*), kod 53/60 (88,33%) domaćih svinja, dok je ista promena zabeležena kod 21/60 (35,00%) divljih svinja, uglavnom mlađeg uzrasta. Različiti stepen deplecije limfocita uočen je i u interfolikularnim regijama. Kod svinja, kod kojih je interfolikularna deplecija limfocita bila jačeg intenziteta, isticala se fibrovaskularna stroma tonzile. Česta je bila pojava kriptitisa, kada je lumen kripte bio ispunjen

ćelijskim sadržajem u kojem su dominirali limfociti, ali su nađeni i makrofagi i plazmociti, a nekada i dominantno polimorfonuklearni granulociti. Kod divljih svinja čest je bio nalaz ćelijskog nekrotičnog detritusa u tonzilarnim kriptama. Takođe, ponekad je uočena i infiltracija trabekula i epitela kripti eozinofilnim granulocitima, pre svega kod divljih svinja.

5.4.2. Histopatološke promene u limfnim čvorovima

U limfnim čvorovima (submandibularni, medijastinalni, mezenterijalni i ingvinalni superficijalni limfni čvorovi) ustanovljene su promene od značaja za PCVAD, kao što se vidi iz tabele br. 3. Tkivne lezije različitog intenziteta ustanovljene su kod 53/60 (88,33%) domaćih i 21/60 (35,00%) divljih svinja. Uglavnom je ustanovljena deplecija limfocita folikularne, perifolikularne i interfolikularne zone (*slika 7B*), čime je često narušena arhitektura limfnog čvora (*slika 7D*). Folikuli u slučaju deplecije folikularnog tipa skoro da se ne uočavaju, u nekima se vide samo naznake parakortikalne zone u kojima su smešteni retki limfociti (*slika 7C*). Kod većine ispitanih domaćih svinja, i kod divljih svinja mlađeg uzrasta, folikularnu depleciju pratila je deplecija limfocita perifolikularne zone limfnog čvora. Kod njih se u isečcima limfnih čvorova prevashodno videla fibrovaskularna stroma (*slika 7D*). Kod obolelih svinja kod kojih je folikularna deplecija limfocita bila jače izražena difuzno limfatično tkivo okruživalo je smanjene folikule u čijim su se centrima nalazile brojne ovalne ćelije eozinofilne citoplazme. Ponekad je na mestu deplecije limfocita u limfnom folikulu zapaženo grupisanje epiteloidnih ćelija u vidu granuloma (*slika 8D*). Ne retko, zapažene su multijedarne džinovske ćelije u sklopu infektivnog granuloma (*slika 8C*) ili solitarno. Ostaci folikula često su predstavljali mrežu retikularnih ćelija sa retkim malim limfocitima (*slika 7C*).

U većini limfnih čvorova ispitanih domaćih svinja, a u manjem broju i kod divljih svinja, zabeležena je i interfolikularna deplecija limfocita koja se karakteriše smanjenjem broja limfocita i otkrivanjem vezivno-vaskularne strome u interfolikularnoj regiji (*slika 7B*). Interfolikularna deplecija limfocita je često bila udružena sa edemom, pri čemu limfni čvor ima izgled mreže u kojoj se multifokalno vide grupice malih limfocita i makrofaga. Nešto više limfatičnog tkiva prisutno je oko trabekula. Zadebljale trabekule su ne retko infiltrovane eozinofilnim granulocitima. Ponekad, uz opisane promene u fibrovaskularnoj stromi limfnog čvora, zapažene su obilne subkapsularne hemoragije i brojni makrofagi sa hemosiderinom (*slika 8A*). Ova promena je utvrđena kod 5/60 (8,33%) divljih svinja.

Limfni čvorovi, u kojima je deplecija limfocita bila slabije izražena, ponekad imaju izgled „zvezdanog neba“, pri čemu se u gusto napakovanom limfatičnom tkivu vide svetli prostori, ponekad prazni ili sadrže degenerisane makrofage ili njihove ostatke (*slika 8B*). Folikularnu i interfolikularnu depleciju limfocita pratila je dilatacija kortikalnih (*slika 8A*) i trabekularnih sinusa, u kojima su zapaženi makrofagi sa obilnom svetlom citoplazmom i retikularne ćelije. Mononuklearni ćelijski infiltrat je uočen i u kapsuli limfnog čvora i vezivnom tkivu trabekula. Kod velikog broja ispitanih limfnih čvorova uočena je infiltracija sa eozinofilnim granulocitima, pre svega kod divljih svinja. Opisane promene najčešće su viđene u ingvinalnim superficijalnim, medijastinalnim i mezenterijalnim limfnim čvorovima, nešto ređe u submandibularnim limfnim čvorovima domaćih i divljih svinja. Pored opisanih promena, kod 6/60 (10,00%) domaćih i 4/60 (6,67%) divljih svinja sa izraženom folikularnom deplecijom limfocita zapažena je koagulaciona nekroza (*slika 9A*) i nekrotični vaskulitis, uz trombozu krvnih sudova.

Pored ustanovljene deplecije limfocita zapaženi su i limfni čvorovi sa hiperplazijom folikularnog i interfolikularnog tkiva. U tom slučaju su uočeni veliki folikuli sa brojnim, gusto naseljenim limfocitima koji su bez jasne granice

.....

prelazili u interfolikularno limfatično tkivo. Interfolikularna zona u tim limfnim čvorovima bila je prožeta gusto napakovanim limfocitima. Takođe, u velikom broju limfnih folikula izraženi su bili germinativni centri. Ove promene su zapažene uglavnom na medijastinalnim i mezenterijalnim limfnim čvorovima kod 28/60 (46,67%) divljih svinja, pre svega kod onih jedinki kod kojih su, pored zapaljenskih procesa na plućima i crevima, bili prisutni i adultni parazitski oblici. Kod ovih jedinki se takođe učestalo moglo uočiti prisustvo povećanog broja eozinofilnih granulocita u medijastinalnim i mezenterijalnim limfnim čvorovima, uglavnom difuzno raspoređeno u interfolikularnim zonama, subkapsularnim i trabekularnim sinusima.

5.4.3. Histopatološke promene u slezini

U isečcima slezine 30/60 (50,00%) ispitanih domaćih svinja i 6/60 (10,00%) divljih svinja mlađeg uzrasta uočena je deplecija limfocita, koja se ogledala u slabo izraženom periarterijskom limfatičnom omotaču (*slika 9D*). Deplecija limfocita bila je različitog stepena i zahvatala je periarterijski limfocitni omotač (PALS). Zapažena je i infiltracija makrofagima koji su imali obilnu citoplazmu i ponekad su bili grupisani u vidu granuloma, oko kojih su prisutni retki limfociti. Kod 15/60 (25,00%) domaćih i kod 45/60 (75,00%) divljih svinja zapažena je hipercelularnost periarterijskog limfatičnog omotača, i u tom slučaju je bela pulpa dominirala nad crvenom pulpom. U crvenoj pulpi izražena je bila hiperemija krvnih sudova i sinusoidnih prostora. Kod velikog broja domaćih i divljih svinja u sinusoidnim prostorima slezine mogli su se naći i eozinofilni i neutrofilni granulociti u povećanom broju. Eozinofilni granulociti ponekad infiltruju i zadebljale trabekule, što je češće uočeno kod divljih svinja. Trabekularni sinusi slezine često su bili prošireni i hiperemični, ne retko su se u njima mogli naći mnogobrojni hemosiderociti.

5.4.4. Histopatološke promene u tankim crevima

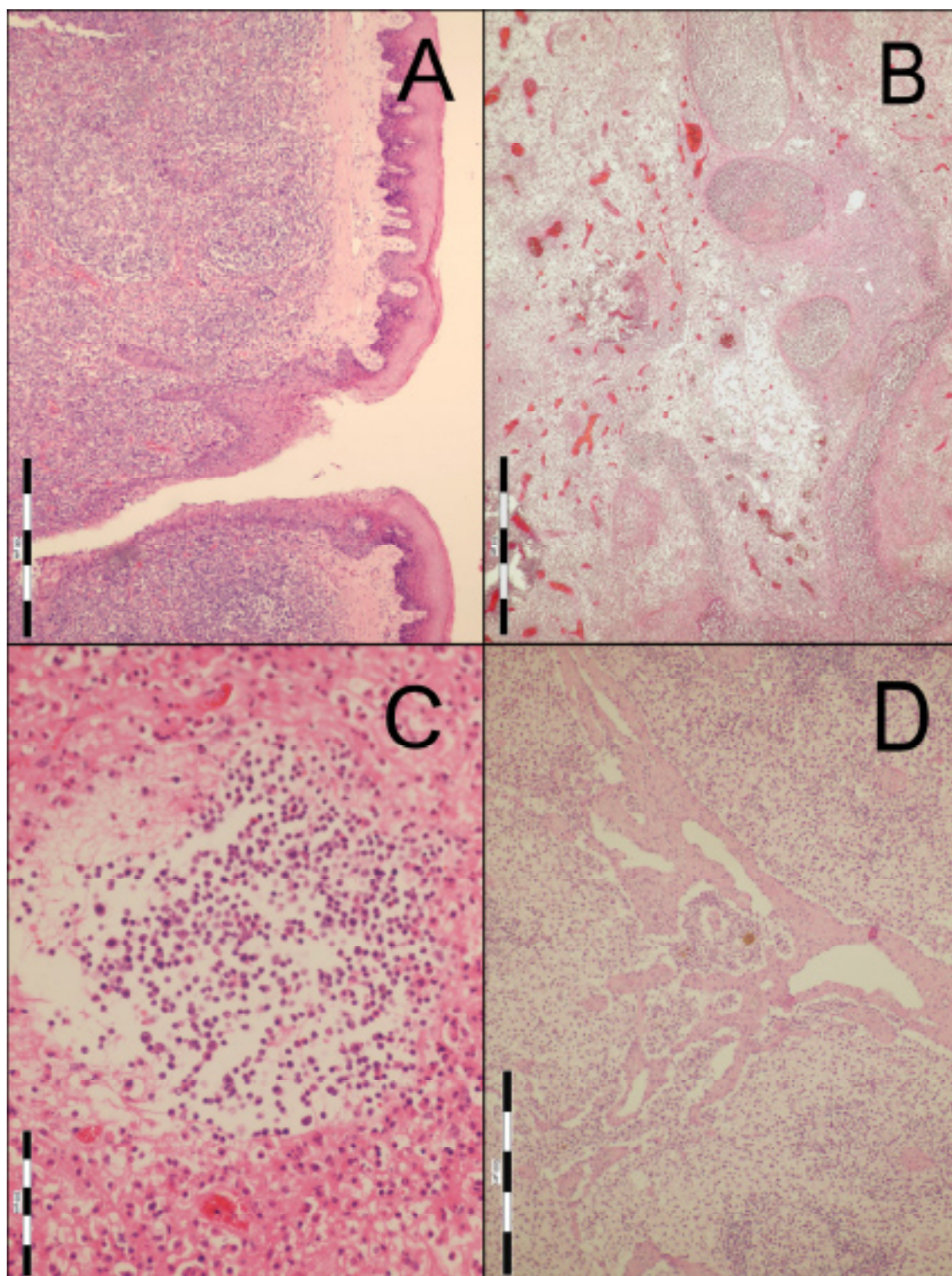
Najčešći nalaz prilikom histopatološkog pregleda tankih creva ispitanih domaćih i divljih svinja bio je infiltracija mononuklearnim ćelijskim elementima lamine proprije mukoze i tunike submukoze, uz često prisustvo neutrofilnih granulocita. Kod 23/60 (38,33%) divljih svinja je zabeležena infiltracija lamine proprije mukoze sa eozinofilnim granulocitima. U nekim isečcima creva limfociti su uočeni u povećanom broju, i između samih enterocita. Crevni zid je uglavnom bio edematozan sa dilatiranim, hiperemičnim krvnim sudovima. Kod većine ispitanih svinja promene su bile prisutne i u Pajerovim pločama. Folikuli Pajerovih ploča kod 48/60 (80,00%) domaćih svinja pokazivali su različit stepen deplecije limfocita (*slika 9C*). Kod intenzivne deplecije limfocita uočeno je nakupljanje makrofaga u folikulima na mestu deplecije limfocita, često grupisanih u centrima limfnih folikula čime su podsećali na granulom. Ponekad su uočene velike, multijedarne džinovske ćelije u stromi oko folikula i blizu crevnih resica. U velikom broju divljih svinja, i kod nekih ispitanih domaćih svinja, folikuli Pajerovih ploča su bili izraženo hipercelularni sa gusto naseljenim limfocitima. Ovakvi hiperplastični folikuli su često imali promenjeni oblik uz infiltraciju eozinofilnim granulocitima oko folikula i u lamini propriji mukoze creva.

5.4.5. Histopatološke promene u ileocekalnim valvulama

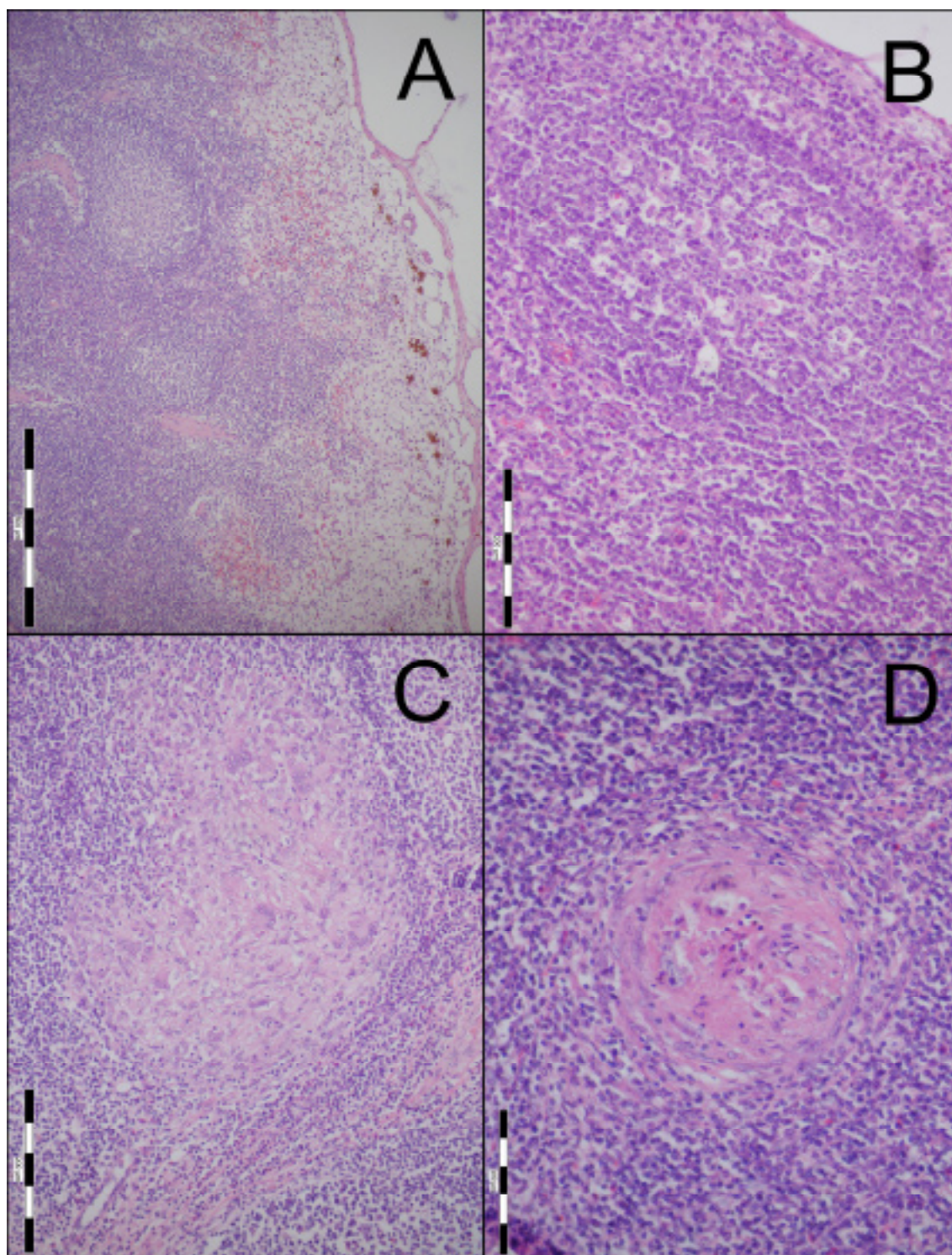
Najučestaliji nalaz na ileocekalnim valvulama kod 45/60 (75,00%) ispitanih domaćih svinja i kod 13/60 (21,66%) divljih svinja, bilo je deplecija limfocita u limfnim folikulima, uz mononuklearnu ćelijsku infiltraciju tunike mukoze i submukoze, sa izraženim proširenjem Liberkinijevih kripti. Limfni folikuli u submukozi imali su depleciju limfocita različitog intenziteta kako je u

tabeli br. 3 prikazano. Često se u depleciranim folikulima uočavala retikularna stroma i prisustvo solitarnih i grupisanih makrofaga. Ponekad su se u submukozi ileocekalne valvule, na mestu depleciranih folikula, mogli uočiti znaci granulomatoznog zapaljenja uz prisustvo epiteloidnih i multijedarnih džinovskih ćelija (*slika 9B*), sa periferno postavljenim jedrima svetle citoplazme. Difuzno limfatično tkivo je uglavnom bilo izraženo, sa razbacanim limfocitima, makrofagama i retkim plazma ćelijama u submukozi. Infiltracija mononuklearnim ćelijama je uočena u mukozi i submukozi. Često su u ovim predelima uočeni i neutrofilni i eozinofilni granulociti. Kod većine ispitanih domaćih, i skoro kod svih divljih svinja zapažen je kriptitis. Liberkinijeve kripte su bile proširene i ispunjene nekrotičnim detritusom eozinofilnog karaktera, u sredini sa degenerisanim ćelijama kod 11/60 (18,33%) domaćih svinja. Na ileocekalnim valvulama kod 20/60 (30,00%) divljih svinja zapaženi su nekrotični predeli koji su često zahvatali više spojenih kripte. Na dnu kripte su često uočene deobe stem ćelija.

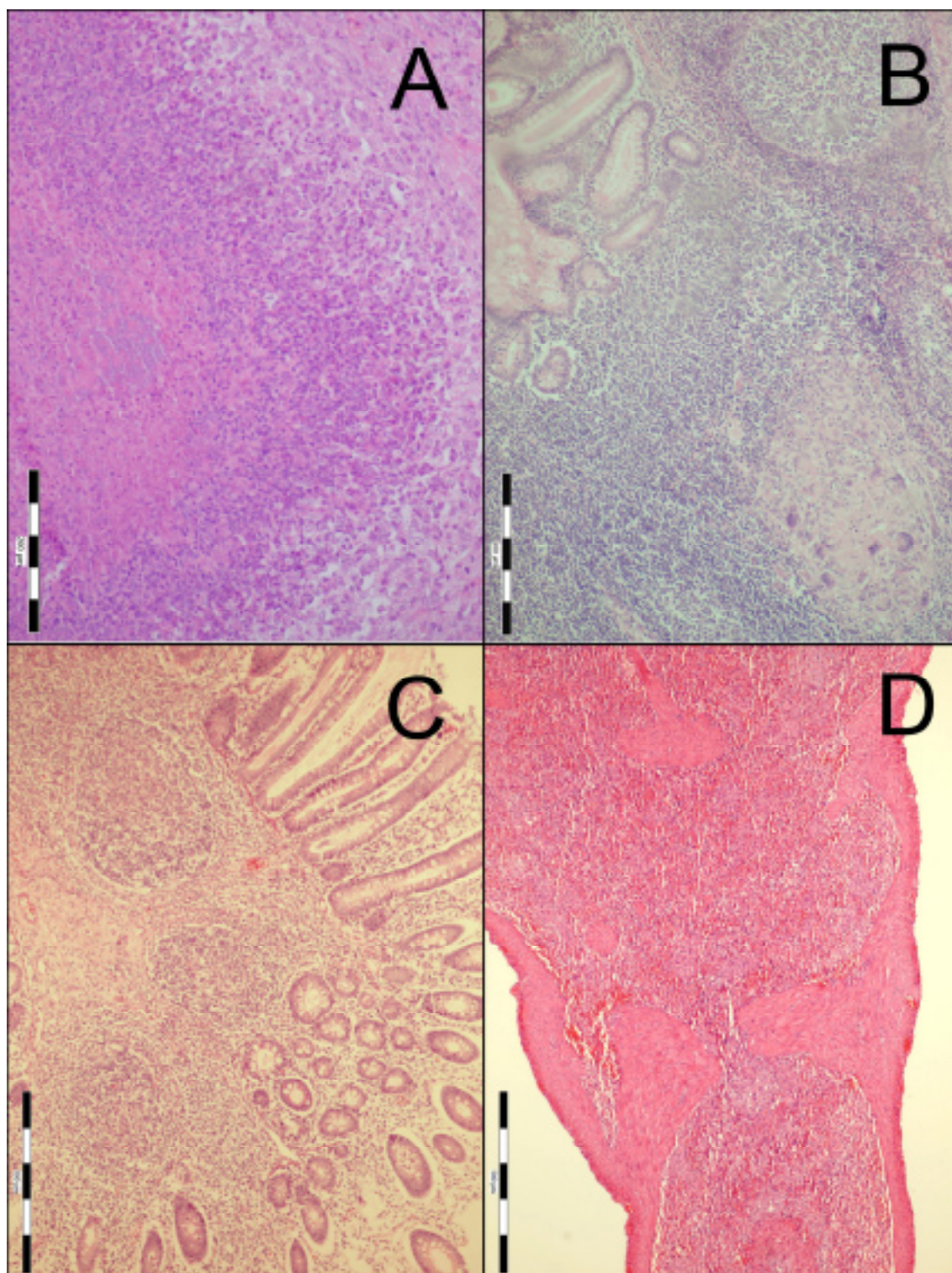




Slika 7. A. Tonzila divlje svinje, deplecija limfocita u limfnom folikulu. HE. Bar: 500 μ m
 B. Mezenterijalni limfni čvor domaće svinje, deplecija limfocita folikularne, perifolikularne i interfolikularne zone. HE. Bar: 500 μ m. C. Medijastinalni limfni čvor divlje svinje, istaknuta retikularna osnova. HE. Bar: 100 μ m. D. Submandibularni limfni čvor domaće svinje, narušena arhitektura limfnog čvora. HE. Bar: 500 μ m.



Slika 8. **A.** Ingvinalni superfcijalni limfni čvor domaće svinje, folikularna deplecija limfocita, dilatacija kortikalnog sinusa i prisustvo hemosiderina. HE. Bar: 500 μ m. **B.** Mezenterijalni limfni čvor domaće svinje, blaga deplecija folikularne zone i izgled "zvezdanog neba". HE. Bar: 200 μ m. **C.** Ingvinalni superfcijalni limfni čvor domaće svinje, Infektivni granulom. HE. Bar: 200 μ m. **D.** Mezenterijalni limfni čvor domaće svinje, infektivni granulom u sredini limfnog folikula. HE. Bar: 100 μ m.



Slika 9. A. Ingvinalni superficialni limfni čvor domaće svinje, koagulaciona nekroza u folikulu. HE. Bar: 200 μ m B. Ileocekalna valvula domaće svinje, deplecija limfocita uz infiltraciju makrofagima i prisustvo infektivnog granuloma. HE. Bar: 200 μ m, C. Tanko crevo divlje svinje, umerena deplecija limfocita Pajerove ploče. HE. Bar: 500 μ m. D. Slezina divlje svinje, slabo izražena bela pulpa. HE. Bar: 500 μ m.

5.4.6. Histopatološke promene u plućima

Prilikom histopatološkog pregleda pluća domaćih svinja kod 51/60 (85,00%) uočene su promene koje ukazuju na intersticijalnu pneumoniju različitog intenziteta (*slika 10A i 10B*), kao i promene karakteristične za gnojnu bronhopneumoniju 52/60 (86,67%) (*slika 10C*). Kod 45/60 (75,00%) divljih svinja bile su prisutne promene karakteristične za gnojnu i verminoznu bronhopneumoniju. U plućima je često evidentiran edem koji zahvata interlobularnu stromu, a ne retko i same alveole.

Zadebljanje interlobularnih septi, koje su bile edematozne i sa izraženim vezivno-tkivnim elementima, često je uočeno. Kod 51/60 (85,00%) ispitanih pluća obolelih domaćih svinja, alveolarne pregrade su bile zadebljale, uz prisustvo velikog broja mononuklearnih ćelijskih elemenata (*slika 10A*). U ovom ćelijskom infiltratu dominirali su limfociti, makrofagi i fibroblasti.

Često je uočeno i umnožavanje pneumocita tipa II (*slika 11A*), kao što je to prikazano u tabeli br 4. Njihova proliferacija je ponekad toliko bila izražena, da su osim uglova alveola, često popunjavali skoro ceo alveolarni prostor. Makrofagi su osim u interalveolarnim pregradama uočeni i u samim alveolarnim prostorima gde su viđeni kao velike ćelije, prosvetljene ili penušave citoplazme, ponekad sa ostacima fagocitovanog materijala (*slika 11A*). U nekim isečcima pluća u alveolama su se osim makrofaga nalazili degenerisani polimorfonuklearni granulociti i sluzav sadržaj (*slika 10C*). U uznapredovalim stanjima mogli su se uočiti i vezivno-tkivni elementi i organizacija alveolarnog sadržaja.

Zapaljenske promene su zapažene na bronhijama i bronhiolama. Uočeno je prisustvo većeg ili manjeg broja mononuklearnih ćelijskih elemenata u vezivnom tkivu oko bronhusa i bronhiola, u pripadajućim krvnim sudovima, a

često i u samom zidu bronhija i bronhiola. Peribronhitis i bronhitis nekada su imali gnojni karakter. U tim slučajevima uočen je veliki broj neutrofilnih granulocita oko bronhusa i bronhiola, kao i u njihovom zidu i u samom lumenu (*slika 10C*). Nekada se mogao videti fibrozni bronhiolitis sa organizovanim sadržajem. Kod divljih svinja, čest je bio nalaz vernimozne bronhopneumonije 45/60 (75,00%). Tada, u zidu bronhija, bronhiola, u peribronhijalnom vezivnom tkivu, i u peribronhijalnim limfnim folikulima prisutni su bili eozinofilni granulociti u velikom broju. Lumen bronhija je bio ispunjen parazitima (*slika 10D*) i ćelijskim detritusom.

Promene na bronhoalveolarnom limfatičnom tkivu (BALT-u) su takođe zapažene kod obolelih svinja, kako je prikazano u tabeli br. 4. Kod domaćih svinja te promene su se uglavnom ogledale u depleciji limfocita različitog intenziteta. U nekim depleciranim folikulima se mogla uočiti stroma i prisustvo povećanog broja makrofaga, dok su kod manjeg broja folikuli bili hiperplastični sa gusto naseljenim limfocitima. Kod divljih svinja sa verminoznom bronhopneumonijom u hiperplastičnom bronhoalveolarnom limfnom tkivu bili su prisutni gusto naseljeni limfociti, i veliki broj eozinofilnih granulocita.

Zapaljenje plućne maramice, koja je bila zadebljana, često sa debelim fibrinskim naslagama u kojima su zapaženi i vezivnotkivni elementi, zapaženo je kod 19/60 (31,67%) domaćih svinja. U uznapredovalim procesima dolazilo je do potpune organizacije fibrinskih naslaga.

5.4.7. Histopatološke promene u jetri

Najučestalija histopatološka promena u jetri ispitanih domaćih i divljih svinja bila je infiltracija portne regije mononuklearnim ćelijskim elementima (*slika 11C*), kao što je prikazano u tabeli br 4. Grupe mononuklearnih ćelija su nađene i u sinusoidnim prostorima parenhima jetre, a

često i prisustvo povećanog broja Kupferovih ćelija. Neke Kupferove ćelije imale su zarezasto jedro nalik na srp, dok su druge imale okruglasto ili zvezdasto jedro. U periportnom delu lobulusa ponekad su viđene multifokalne nekroze pojedinačnih hepatocita. Spomenute promene uglavnom nisu narušavale strukturu režnjića jetre. Kod 4/60 (6,67%) domaćih svinja i kod 16/60 (26,67%) divljih svinja uočeni su znaci periportne fibroze. U tom slučaju, pored izraženih interlobularnih vezivno-tkivnih septi, uočen je i gubitak većeg broja hepatocita uz difuznu infiltraciju mononuklearnim ćelijama i fibroblastima, uz narušenu arhitekturu lobulusa različitog intenziteta.

5.4.8. Histopatološke promene u bubrezima

U bubrezima kod 28/60 (46,67%) domaćih i kod 31/60 (51,67%) divljih svinja zapaženi su znaci intersticijalnog nefritisa različitog intenziteta. Mononuklearni ćelijski infiltrat je uglavnom bio lokalizovan u kori bubrega fokalno, oko glomerula i tubula (*slika 11B*). Hipercelularnost glomerula uz edem vaskularne petlje, koja je potpuno ispunjavala prostor Bowmanove kapsule, uočen je kod 8/60 (13,33%) domaćih svinja. Kod divljih svinja je kod 21/60 (35,00%) uočeno prisustvo gnojnog pielonefritisa, gde su u ćelijskom infiltratu parenhima bubrega i bubrežne karlice prevladavali neutrofilni granulociti.

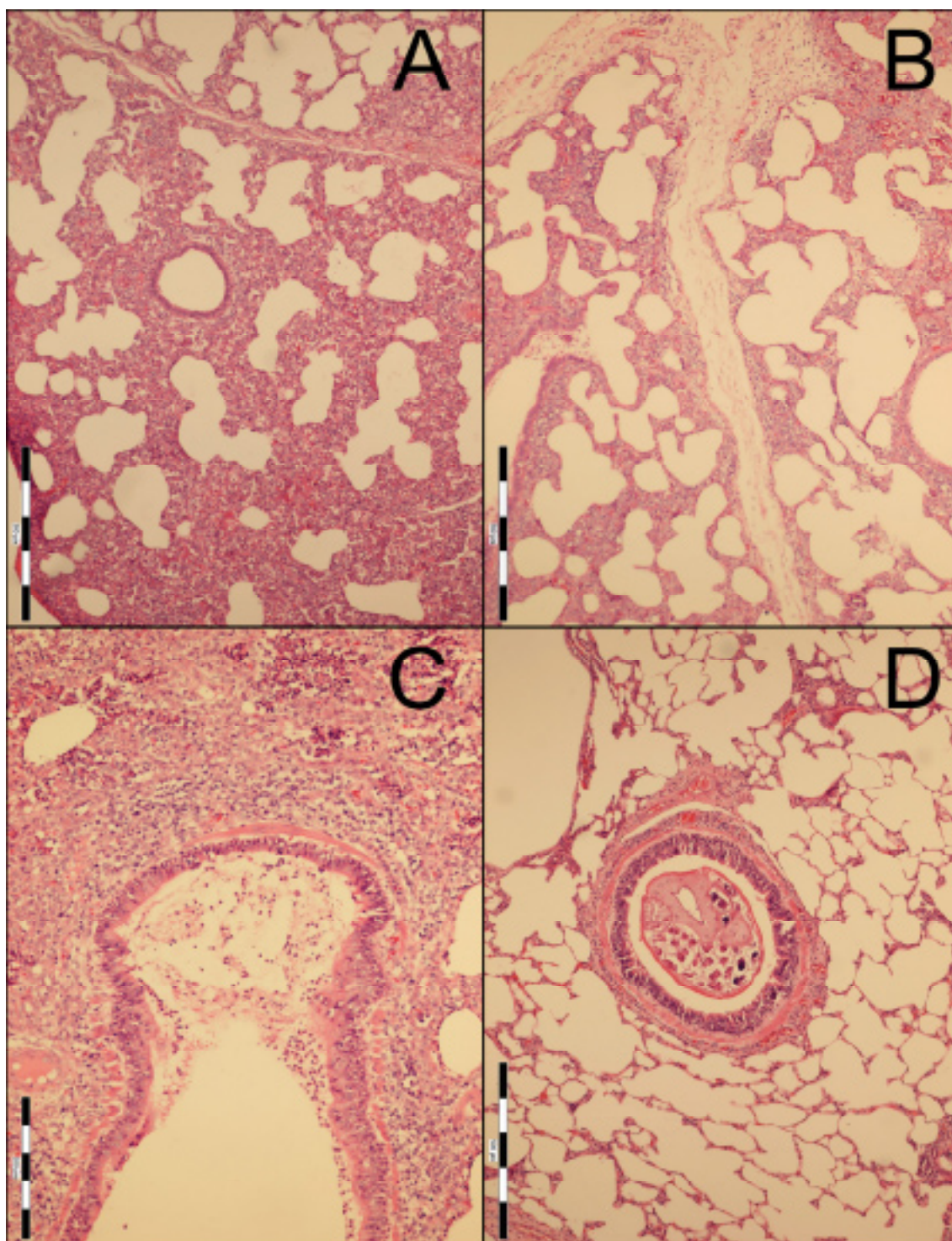
5.4.9. Histopatološke promene u srcu

Prilikom histopatološkog pregleda srca zapažena je infiltracija miokarda mononuklearnim ćelijama (*slika 11D*) kod 11/60 (18,33%) domaćih i kod 12/60 (20,00%) divljih svinja. Mononuklearni ćelijski infiltrat se nalazio difuzno raspoređen između snopova mišićnih ćelija srca. Njihova veća aglomeracija

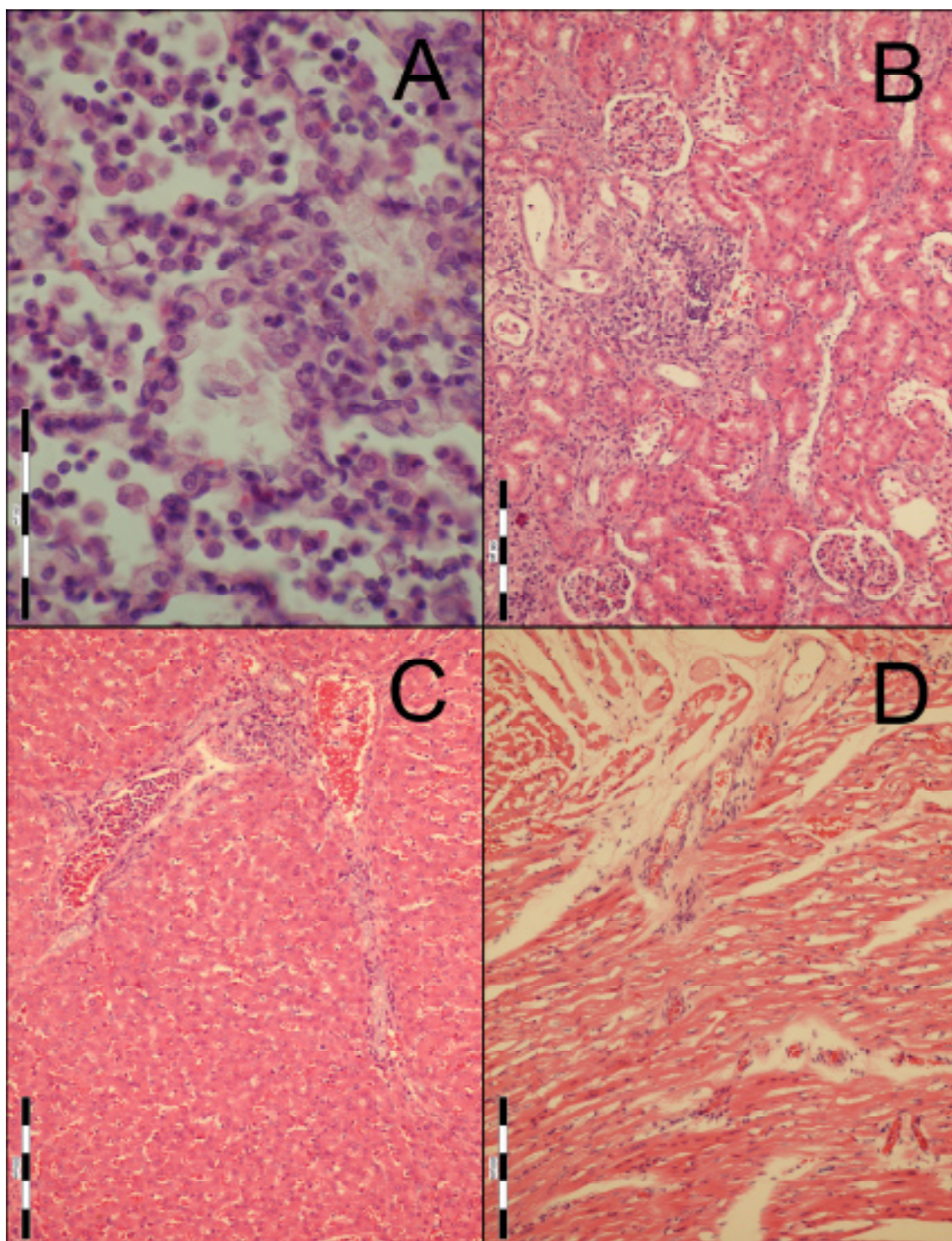
..... Rezultati ispitivanja

zapažena je perivaskularno. Uočene su promene i na kapilarima miokarda, u vidu nabubrelih endotelnih ćelija. Takođe se mogla videti i mestimična vakuolizacija miokardiocita, a kod nekih i nekroza.





Slika 10. **A.** Pluća domaće svinje, zadebljale alveolarne pregrade uz obilnu infiltraciju mononuklearnim ćelijskim elementima. HE. Bar: 500 μ m. **B.** Pluća domaće svinje, edem interlobularnog vezivnog tkiva. HE. Bar: 500 μ m. **C.** Pluća domaće svinje, infiltracija alveola i bronhiola polimorfonuklearnim ćelijskim elementima: HE. Bar: 200 μ m. **D.** Pluća divlje svinje sa adultnim oblikom plućne vlašī u lumenu bronhiole. HE. Bar: 500 μ m.



Slika 11. **A.** Pluća domaće svinje, umnoženi pneumociti tipa II uz prisustvo mononuklearnog ćelojskog infiltrata u alveolama. HE. Bar: 200μm. **B.** Bubrež divlje svinje, fokalna infiltracija kortikalne zone mononuklearnim ćelijskim elementima. HE. Bar: 200μm. **C.** Jetra domaće svinje, infiltracija portne regije mononuklearnim ćelijama. HE. Bar: 200μm. **D.** Srce domaće svinje, hiperemija miokarda i infiltracija mononuklearnim ćelijskim elementima. HE. Bar: 500μm.

5.5. Distribucija *Cap* antigena PCV2

Distribucija i količina virusnog antigena je varirala u različitim tkivima, u odnosu na ukupan broj inficiranih domaćih i divljih svinja, kao što je to prikazano u tabeli br. 5 i 6.

Tabela br. 5. Distribucija i intenzitet ekspresije *Cap* antigena PCV2 u limfatičnom tkivu inficiranih domaćih svinja

	Tkivo	IHC				PCR	
		-	+	++	+++	Σ pozitivno	Σ pozitivno
Domaće svinje	Tonzile	18/60	9/60	22/60	11/60	42/60	ni
	Pajerove ploče	10/60	6/60	30/60	14/60	50/60	ni
	Ileocekalna valvula	14/60	8/60	28/60	10/60	46/60	ni
	Slezina	15/60	7/60	29/60	9/60	45/60	60/60
	Limfni čvorovi	9/60	7/60	31/60	13/60	51/60	60/60 ^a
Divlje svinje	Tonzile	53/60	6/60	1/60	0/60	7/60	ni
	Pajerove ploče	52/60	5/60	2/60	1/60	8/60	ni
	Ileocekalna valvula	52/60	5/60	2/60	1/60	8/60	ni
	Slezina	55/60	4/60	1/60	0/60	5/60	16/60
	Limfni čvorovi	49/60	8/60	2/60	1/60	11/60	16/60 ^a

Legenda: ni= nije ispitano; ^a = ingvinalni superficijalni limfni čvorovi.



Tabela br. 6. Ekspresija *Cap* antigena PCV2 u plućima, jetri, bubrezima i srcu ispitanih domaćih i divljih svinja.

Tkivo	Domaće svinje		Divlje svinje	
	IHC		IHC	
	-	+	-	+
Pluća	12/60	48/60	52/60	8/60
Jetra	28/60	32/60	54/60	6/60
Bubrezi	40/60	20/60	55/60	5/60
Srce	60/60	0/60	60/60	0/60

U ispitivanom limfatičnom tkivu, plućima, jetri, bubrezima i srcu domaćih i divljih svinja kontrolne grupe nije ustanovljena ekspresija *Cap* antigena PCV2.

Kako se iz tabela vidi pozitivna reakcija na prisustvo *Cap* antigena PCV2, utvrđena je kod većine ispitanih domaćih svinja 51/60 (85,00%) i kod 11/60 (18,33%) divljih svinja. U brojnim ispitanim organima uočeno je da ćelije koje eksprimiraju virusni antigen uglavnom pokazuju citoplazmatsku pozitivnu reakciju. Ekspresija *Cap* antigena najčešće je uočena u makrofagima. Makrofagi koji su eksprimirali *Cap* antigen PCV2 imali su izraženu citoplazmatsku lokalizaciju signala, koja se ogledala u nalazu obilnih precipitata braon boje (*slika 12B i 12C*). Ovi precipitati imali su granuliranu strukturu. U jedrima makrofaga nije uočena pozitivna reakcija na prisustvo *Cap* antigena PCV2.

Intenzitet signala je zavisio od količine *Cap* antigena PCV2 i u limfatičnom tkivu je varirao između negativnog i izrazito pozitivnog. Kod

većine divljih svinja signal je bio slabijeg intenziteta, za razliku od domaćih svinja kod kojih je kod većine ustanovljen signal intenziteta umereno (*slika 12D*) do izrazito pozitivno (*slika 12C*), kao što se vidi u tabeli br. 5 i 6.

U limfnim čvorovima kod 51/60 (85%) domaćih i kod 11/60 (18,33%) divljih svinja utvrđena je ekspresija *Cap* antigena. Intenzitet signala u limfnim čvorovima je varirao i kretao se od negativnog do izrazito pozitivnog, kao što je prikazano u tabeli br. 5. Čelije pozitivne na *Cap* antigen PCV2 u limfnim čvorovima imale su homogenu do zrnastu, braon obojenu citoplazmu, i bile su smeštene difuzno u parenhimu limfnih čvorova (*slika 13A*). Veliki broj pozitivnih ćelija nalazio se oko trabekularnih (*slika 13B*) i kapsularnih sinusa, a manji broj u samim sinusima. Pozitivne ćelije su u velikom broju uočene i u samim depleciranim folikulima, naročito na mestima gde se videla granulomatozna zapaljenska reakcija i multijedarne džinovske ćelije (*slika 13C i 13D*). Kod ovakvih promena zapažene su velike ćelije grupisane koncentrično i slojevito u čijoj se citoplazmi nalazio obilan precipitat braon boje. Pozitivni makrofagi su se nalazili u perifolikularnom i interfolikularnom predelu. Čelijska populacija koja je imala pozitivnu citoplazmatsku reakciju na *Cap* antigen u limfnim čvorovima, uglavnom je pripadala grupi makrofaga. Retko su se u depleciranim folikulima mogle uočiti male okrugle ćelije koje su cele braon obojene i verovatno pripadale limfocitima.

Cap antigen PCV2 dokazan je u tonzilama kod 42/60 (70,00%) domaćih i kod 7/60 (11,67%) divljih svinja. U tonzilama ispitanih svinja veliki broj ćelija je ekspimirao *Cap* antigen. Intenzitet signala u tonzilama domaćih svinja je varirao i kretao se od negativnog do izrazito pozitivnog, dok je kod divljih svinja uglavnom ustanovljen signal slabog intenziteta, kao što se vidi iz tabele br. 5. Najveći broj ćelija sa pozitivnim signalom uočen je subepitelijalno u limfatičnom tkivu tonzila. Difuzno raspoređene ćelije, sa obilnom citoplazmatskom pozitivnom reakcijom, viđene su u limfnim folikulima tonzila kao i u interfolikularnoj stromi (*slika 12D*). Mestimično, u folikulima su viđene i

male okrugle ćelije, pozitivne na spomenuti virusni antigen. Ponekad je uočena pozitivna ćelija i u kripti tonzile.

Imunoreaktivnost različitog intenziteta, kao što je prikazano u tabeli br.5 uočen je i u slezini ispitanih domaćih i divljih svinja. Ćelijsku populaciju koja je pozitivna na *Cap* antigen PCV2 sačinjavali su makrofagi. Ove ćelije su imale obilnu citoplazmu sa precipitatom braon boje u njoj, difuzno raspoređene u beloju pulpi slezine odnosno pretežno u PALS-u (*slika 14B*). U slezini kod nekih domaćih i divljih svinja uočeno je da se u depleciranom PALS-u nalaze ćelije koje imaju pozitivnu citoplazmatsku reakciju i koncentrično-slojevito su bile raspoređene oko centralnog krvnog suda (*slika 14A*). Makrofagi sa pozitivnom citoplazmatskom reakcijom na *Cap* antigen uočeni su i oko trabekularnih sinusa, a u manjem broju i u samim trabekulama.

Različit stepen imunoreaktivnosti, na prisustvo *Cap* antigena PCV2, uočen je u crevima kod 50/60 (83,33%) domaćih i kod 8/60 (13,33%) divljih svinja. Kao što se iz tabele br. 5 vidi, kod većine domaćih svinja intenzitet signala je bio izraženiji nego kod divljih svinja. Najintenzivnija ekspresija *Cap* antigena PCV2, uočena je u GALT-u. U tankim crevima najveći broj pozitivnih ćelija, sa prisustvom *Cap* antigena u njima, dokazan je u Pajerovim pločama (*slika 14C*). Ovde je bio prisutan veliki broj difuzno raspoređenih ćelija, makrofaga, koje su imale citoplazmu sa bogatim sadržajem imunopozitivnog signala. Ređe, uočeno je prisustvo infektivnog granuloma u depleciranim predelima Pajerovih ploča, sa jakom ekspresijom *Cap* antigena PCV2 (*slika 14D*). Pozitivni makrofagi su takođe uočeni i u difuznom limfatičnom tkivu lamine proprije mukoze tankog creva. Ovde su se ponekad mogle videti i velike ćelije sa više jedara, multijedarne džinovske ćelije, čija je citoplazma intenzivno pozitivna. Retko su zapažene i male okrugle ćelije, limfociti, sa braon precipitatom, lokalizovane u folikulu Pajerovih ploča ili u lamini propriji mukoze. Kod nekih obolelih prasadi uočeno je da su na prisustvo *Cap* antigena pozitivno reagovale i epitelne ćelije crevnih kripti. Enterociti su pokazivali

blagu citoplazmatsku pozitivnu reakciju, lokalizovanu u apikalnom delu ćelije (*slika 15D*). U debelim crevima najintenzivnija pozitivna reakcija, na prisustvo *Cap* antigena, uočena je u illeocekalnoj valvuli. Pozitivna reakcija je ustanovljena kod 46/60 (76,67%) domaćih i kod 8/60 (13,33%) divljih svinja. U difuznom limfatičnom tkivu ileocekalne valvule, kao i u predelima gde su limfociti organizovani u vidu folikula, viđene su brojne ćelije, makrofagi, koje su imale obilnu citoplazmu ispunjenu pozitivnim signalom. Najveći broj pozitivnih makrofaga nalazio se difuzno ili koncentrično raspoređeno u depleciranim folikulima, a manji broj u vezivnom tkivu oko Liberkinijevih kriпти. Ponekad su se u Liberkinijevim kriптama mogli uočiti enterociti, koji slično enterocitima tankog creva, sadrže virusni antigen u apikalnom delu svoje citoplazme. Ovaj deo citoplazme sadrži retke granule svetlo-braon boje.

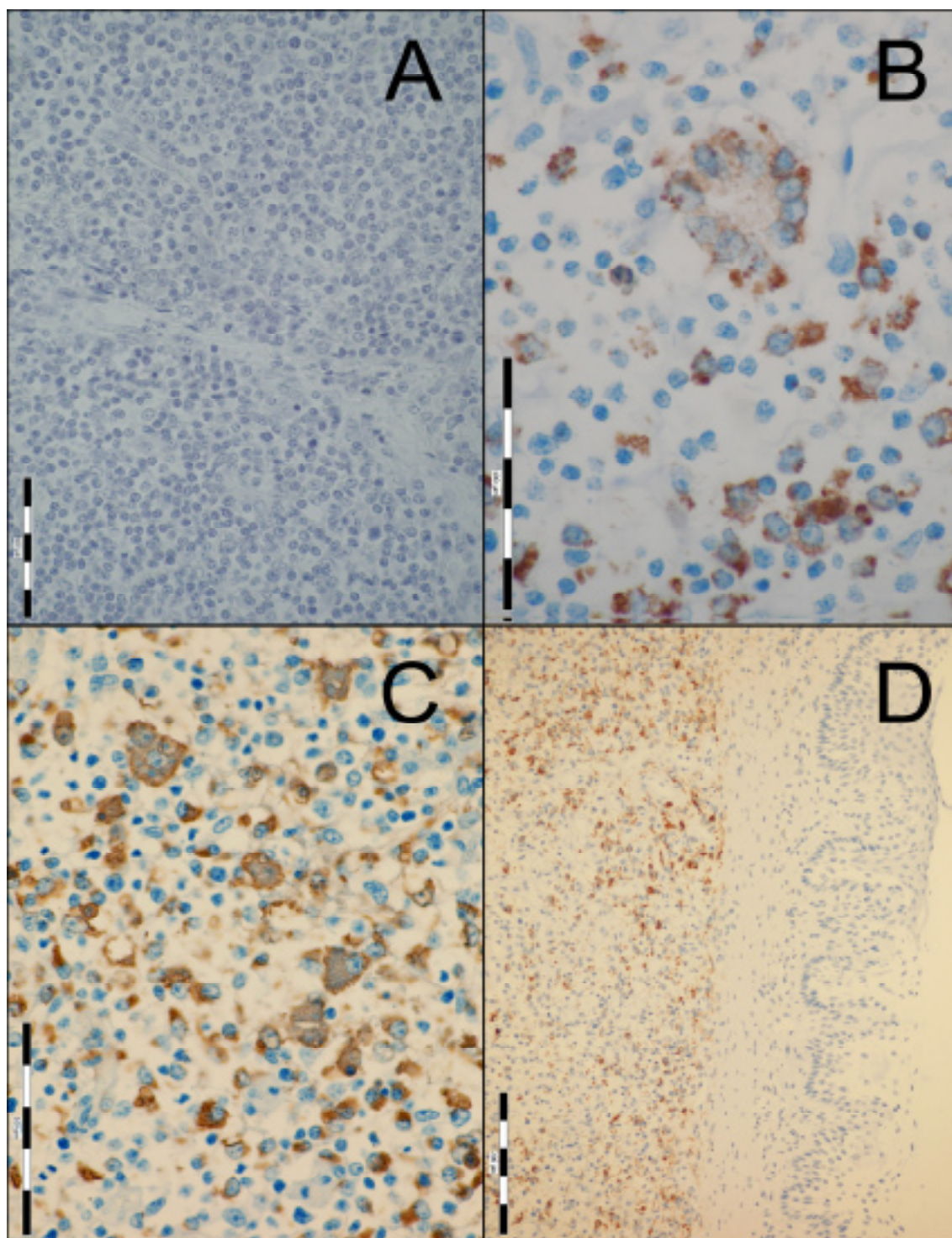
Ćelijska populacija u plućima ispitanih domaćih i divljih svinja, u kojima je zabeležen *Cap* antigen PCV2, uglavnom je bila sastavljena od mononuklearnih ćelija sa citoplazmatskom lokalizacijom antigena. Ove ćelije su utvrđene u zadebljalim alveolarnim septama (*slika 15A*), nekada na samoj površini alveola, ređe slobodno u njenom lumenu kod 48/60 (80,00%) domaćih i kod 8/60 (13,33%) divljih svinja. Ne retko, zapažene su velike ćelije u uglovima alveola koje odgovaraju pneumocitima tipa II, i koje eksprimiraju *Cap* antigen. Često su ćelije pozitivne na virusni antigen uočene i peribronhijalno u BALT-u. *Cap* antigen se takođe mogao videti i u ćelijama zapaljenskog eksudata koji je ispunjavao lumen bronhija, bronhiola i alveola (*slika 15B*). Imunopozitivna reakcija bila je uočljiva i u trepljastim epitelnim ćelijama bronhija i bronhiola, pre svega u apikalnom delu citoplazme spomenutih ćelija, blizu treplji (*slika 15C*).

U isečcima jetre, kod 32/60 (53,33%) ispitanih domaćih i kod 6/60 (10,00%) divljih svinja, *Cap* antigen PCV2 je detektovan u malim količinama. Pozitivna reakcija na prisustvo virusnog antigena uočena je u portnim i sinusoidnim prostorima jetre. U portnim prostorima su zapažene retke,

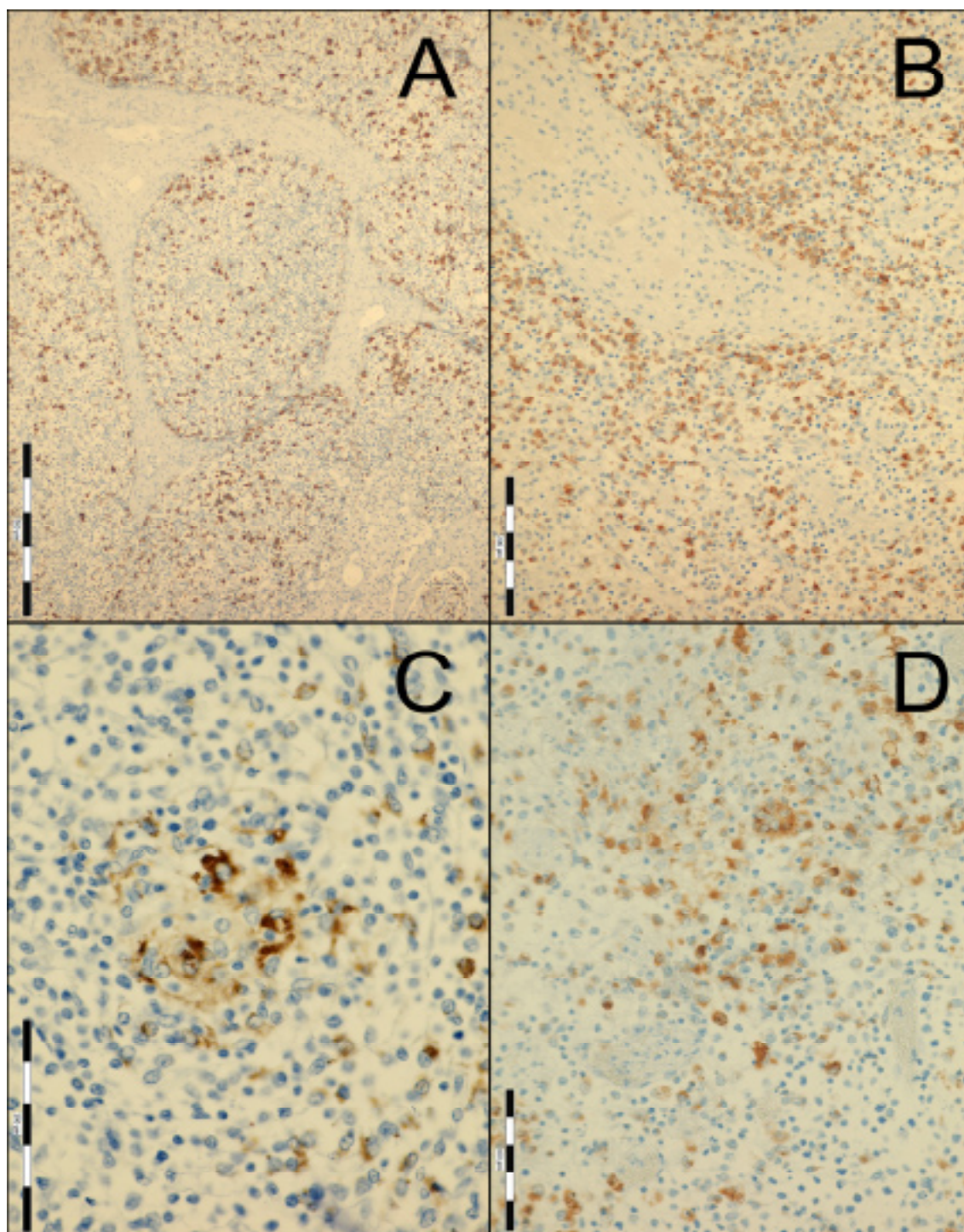
izdužene ćelije koje eksprimiraju virusni antigen (*slika 16A*). Epitelne ćelije bilijarnih izvodnih kanalića su u nekim isečcima jetre takođe bile pozitivne (*slika 16B*). Ponekad su u sinusoidnim prostorima jetrinog lobulusa, blizu portnog prostora, uočene pozitivne ćelije sa diskretnim citoplazmatskim signalom.

Cap antigen PCV2 je dokazan u bubrezima kod 20/60 (33,33%) domaćih i kod 5/60 (8,33%) divljih svinja. Ćelije u kojima je virusni antigen prisutan su uglavnom bile ćelije mononuklearog infiltrata i tubulociti. U peritubularnom mononuklearnom infiltratu bubrežnog korteksa mogle su se uočiti ćelije koje eksprimiraju *Cap* antigen PCV2 (*slika 16C*). U tubulocitima je ovaj antigen detektovan u citoplazmi (*slika 16D*). Ove promene su bile ograničene samo na pojedine tubule.

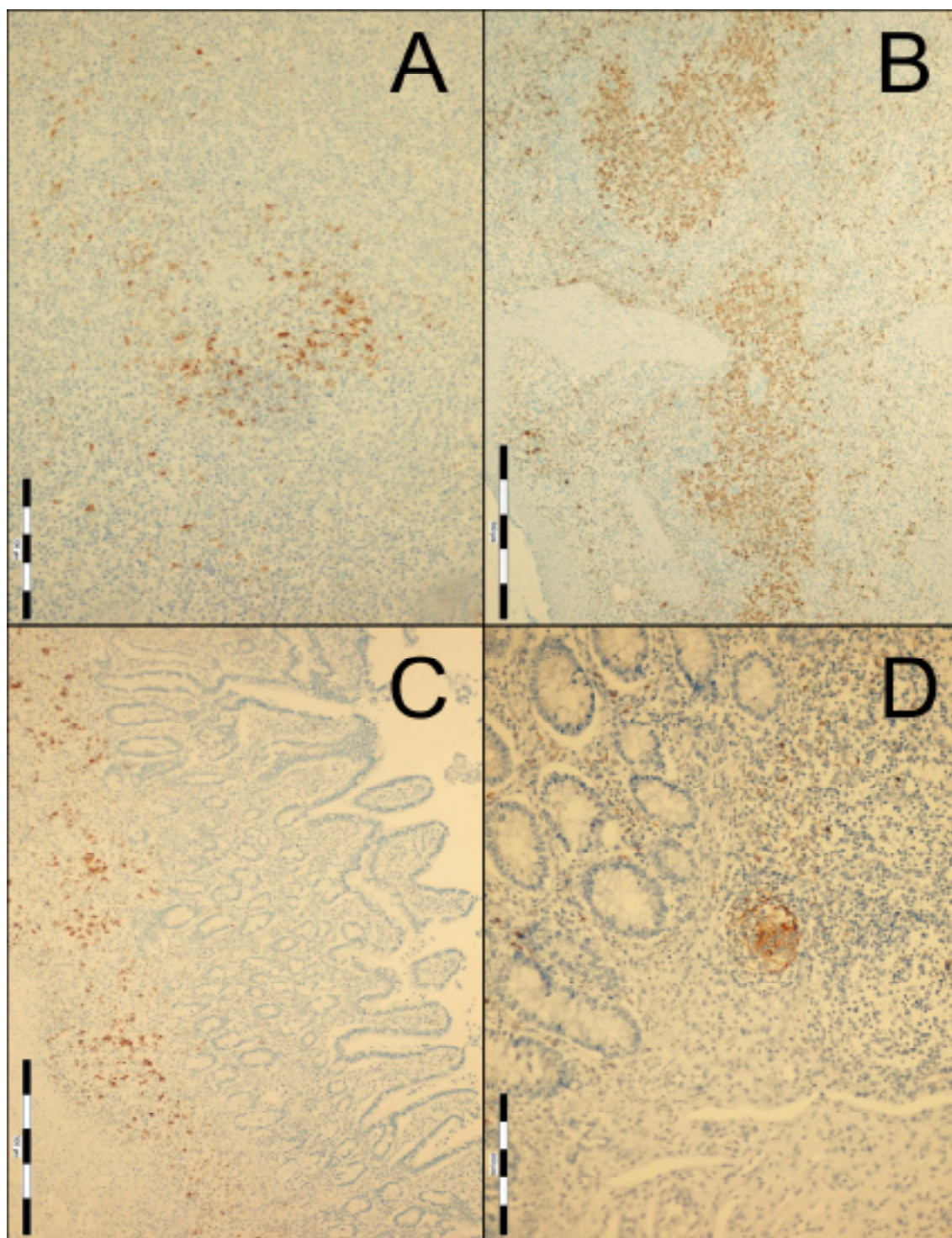
U ispitanim uzorcima srca ispitanih domaćih i divljih svinja nisu uočene ćelije koje eksprimiraju *Cap* antigen PCV2.



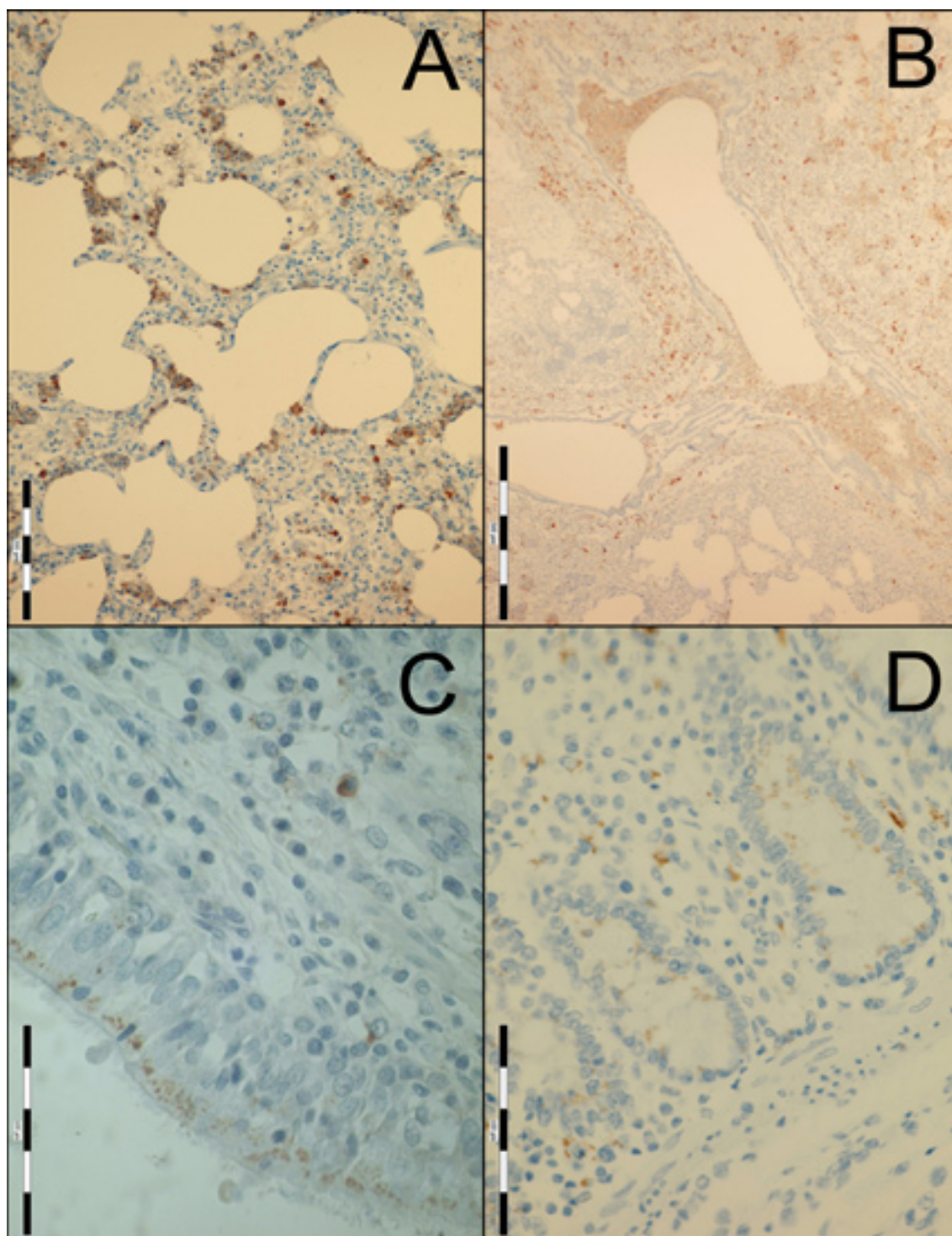
Slika 12. **A.** Medijastinalni limfni čvor domaće svinje kontrolne grupe. HC. Bar: 100 μ m. **B.** Ingvinalni superficialni limfni čvor domaće svinje, umerena ekspresija *Cap* antigena PCV2. IHC. Bar: 100 μ m. **C.** Submandibularni limfni čvor domaće svinje, intenzivna ekspresija *Cap* antigena PCV2. IHC. Bar: 100 μ m. **D.** Tonzila divlje svinje, umereni broj imunopozitivnih ćelija u subepitelijalnom folikularnom i difuznom limfatičnom tkivu. IHC. Bar: 200 μ m.



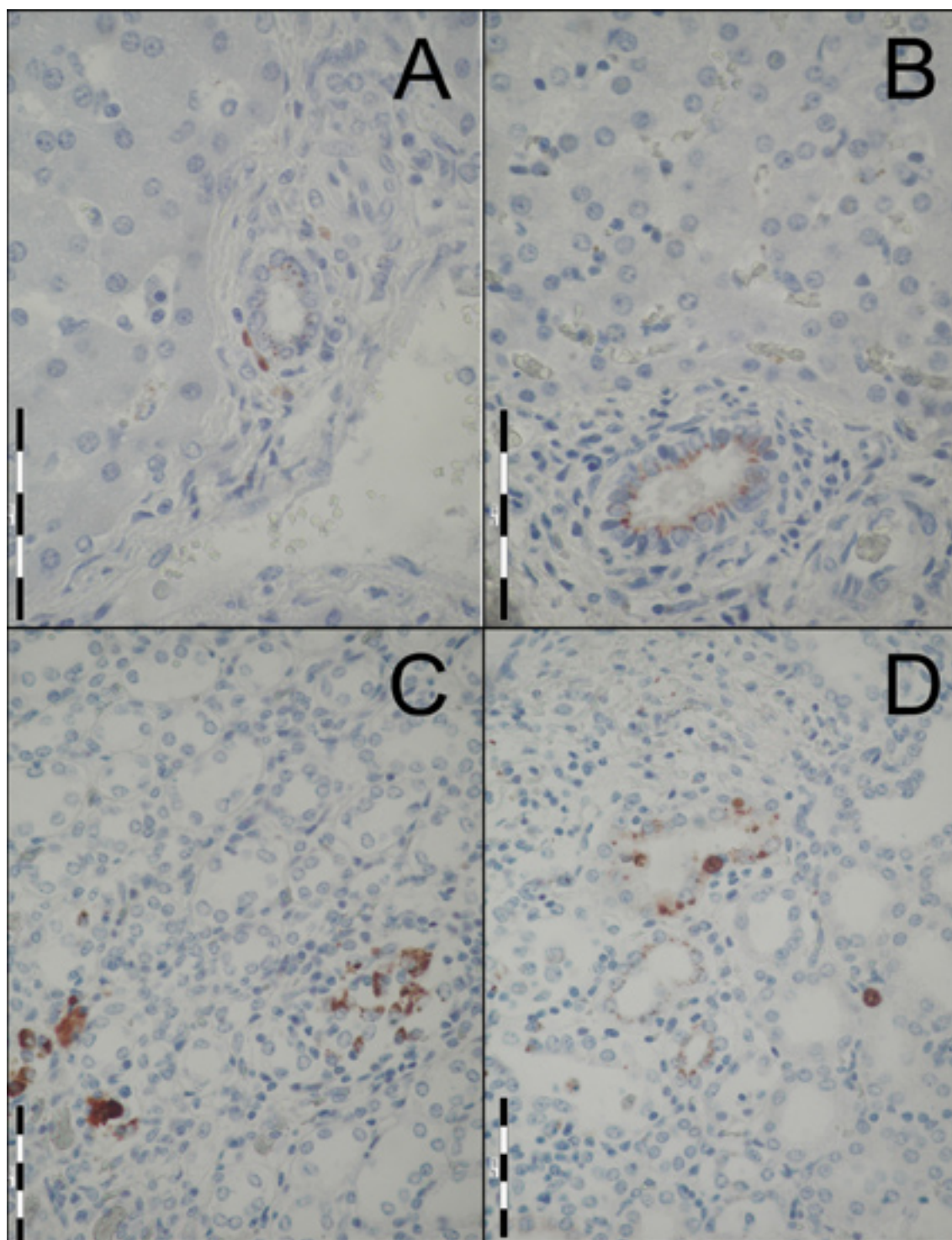
Slika 13. A. Ingvinalni superficialni limfni čvor domaće svinje, umereni broj imunopozitivnih ćelija. IHC. Bar: 500 μ m. B. Medijastinalni limfni čvor divlje svinje, veliki broj imunopozitivnih mononuklearnih ćelija u peritrabekularnom predelu. IHC. Bar: 200 μ m. C. Mezenterijalni limfni čvor divlje svinje, umerena ekspresija *Cap* antigena PCV2 u infektivnom granulomu. IHC. Bar: 100 μ m. D. Mezenterijalni limfni čvor domaće svinje, pozitivna multijedarna džinosvka ćelija i difuzno raspoređene mononuklearne ćelije ekspimiraju *Cap* antigena PCV2. IHC. Bar: 100 μ m.



Slika 14. **A.** Slezina divlje svinje, umerena ekspresija *Cap* antigena PCV2 u predelu periarterijskog limfatičnog omotača. IHC. Bar: 200 μ m. **B.** Slezina domaće svinje, jaka imunopozitivna reakcija u beloju pulpi oko centralne arterije. IHC. Bar: 500 μ m. **C.** Tanko crevo divlje svinje, intenzivna imunopozitivna reakcija u Pajerovij ploči. IHC. Bar: 500 μ m. **D.** Tanko crevo domaće svinje, jaka ekspresija *Cap* antigena PCV2 u granulomu u Pajerovoj ploči. IHC. Bar: 200 μ m.



Slika 15. **A.** Pluća domaće svinje, ekspresija *Cap* antigena u pneumocitima i mononuklearnom ćelijskom infiltratu. IHC. Bar: 200 μ m. **B.** Mnogobrojne imunopozitivne ćelije u bronholarnom eksudatu i u alveolama. IHC. Bar: 500 μ m. **C.** Pluća domaće svinje, ekspresija *Cap* antigena PCV2 u citoplazmi trepljastog epitela bronhiole. IHC. Bar: 100 μ m. **D.** Tanko crevo domaće svinje, imunopozitivni enterocita i mononuklearne ćelije lamine proprije mukoze. IHC. Bar: 100 μ m.



Slika 16. **A.** Jetra domaće svinje, ekspresija *Cap* antigena PCV2 u mononuklearnim ćelijama u portnoj zoni. IHC. Bar: 100 μ m. **B.** Jetra divlje svinje, epitelne ćelije žučnih izvodnih kanalića ekspimiraju *Cap* antigena PCV2. IHC. Bar: 100 μ m. **C.** Bubrež divlje svinje, pozitivne mononuklearne ćelije između tubula. IHC. Bar: 100 μ m. **D.** Bubrež domaće svinje, epitelne ćelije bubrežnih tubula sadrže *Cap* antigen PCV2. IHC. Bar: 100 μ m.

5.6. Distribucija jednolančane i dvolančane DNK PCV2

Tkivna distribucija i količina genoma PCV2 u različitim organima domaćih i divljih svinja prikazana je u tabeli br. 7 i 8.

U tkivnim uzorcima domaćih i divljih svinja kontrolne grupe nije ustanovljeno prisustvo genoma PCV2.

Kao što je u tabelama br 7 i 8 prikazano, prisustvo genoma PCV2 utvrđeno je kod 52/60 (86,67%) domaćih i kod 12/60 (20,00%) divljih svinja.

Pozitivna reakcija, koja se ogledala u nalazu nakupina precipitata tamno plave boje, utvrđena je pre svega u citoplazmi, a u značajno manjem broju ćelija i u ćelijskom jedru inficiranih ćelija. U cilju da se utvrdi da li se PCV2 umnožava u organizmu inficiranih domaćih i divljih svinja ispitana je tkivna distribucija jednolančane i dvolančane DNK PCV2 i utvrđena lokalizacija i tropizam PCV2. Genom PCV2 je uz pomoć CP ISH (komplementarna proba) dokazan kod 52/60 (86,67%) domaćih i kod 12/60 (20,00%) divljih svinja. Uz pomoć CP ISH genom PCV2 je kod domaćih i divljih svinja potvrđen u svim ispitanim organima osim u srcu. Primenom RFP ISH replikativna forma PCV2 je ustanovljena kod 28/60 (46,67%) domaćih i kod 4/60 (6,67%) divljih svinja. Kao što se iz tabele 7 i 8 vidi, pozitivna reakcija probe za replikativnu formu, tj prisustvo dvolančane DNK replikujućeg PCV2, uočena je u istim organima kao pozitivna reakcija primenom komplementarne probe, ali kod manjeg broja svinja i u značajno manjem broju ćelija (*slika 17B*). Količina virusnog genoma, utvrđena uz pomoć komplementarne probe, u različitim tkivima je varirala, pa čak i kod iste jedinke. Intenzitet signala u limfatičnom tkivu se kretao od negativnog do izrazito pozitivnog. Kod većine divljih svinja je signal bio slabiji nego kod domaćih svinja. Kod 4/60 (6,67%) divlje svinje u limfatičnom tkivu zapažen je signal umerenog i jakog intenziteta. Najintenzivniji signal je uočen u limfatičnom tkivu (limfni čvorovi, tonzile, slezina, Pajerove ploče, ileocekalna valvula), dok je u ostalim ispitanim organima (pluća, jetra i bubrezi) uočen signal slabijeg intenziteta (*tabela br. 7 i 8*).

Tabela br.7. Distribucija i intenzitet ekspresije genoma PCV2 u limfatičnom tkivu inficiranih domaćih i divljih svinja

Tkivo	CP ISH					Σ pozitivno	RFP ISH			PCR Σ pozitivno
	-	+	++	+++			-	+		
Domaće svinje	Tonzile	16/60	9/60	22/60	13/60	44/60	40/60	20/60	ni	
	Pajerove ploče	9/60	6/60	30/60	15/60	51/60	36/60	24/60	ni	
	Ileocekalna valvula	13/60	8/60	28/60	11/60	47/60	37/60	23/60	ni	
	Slezina	13/60	8/60	29/60	10/60	47/60	40/60	20/60	60/60	
	Limfni čvorovi	8/60	7/60	31/60	14/60	52/60	32/60	28/60	60/60 ^a	
Divlje svinje	Tonzile	53/60	6/60	1/60	0/60	7/60	59/60	1/60	ni	
	Pajerove ploče	51/60	5/60	3/60	1/60	9/60	58/60	2/60	ni	
	Ileocekalna valvula	51/60	5/60	3/60	1/60	9/60	58/60	2/60	ni	
	Slezina	55/60	3/60	2/60	0/60	5/60	59/60	1/60	16/60	
	Limfni čvorovi	48/60	8/60	3/60	1/60	12/60	56/60	4/60	16/60 ^a	

Legenda: ni = nije ispitano; ^a = ingvinalni superficijalni limfni čvorovi.

Tabela br. 8. Tkivna distribucija genoma PCV2 kod inficiranih domaćih i divljih svinja

	Tkivo	CP ISH		RFP ISH		PCR
		-	+	-	+	Σ Pozitivno
Domaće svinje	Pluća	12/60	48/60	30/60	30/60	60/60
	Jetra	28/60	32/60	46/60	14/60	ni
	Bubrezi	40/60	20/60	52/60	8/60	ni
	Srce	60/60	0/60	60/60	0/60	ni
Divlje svinje	Pluća	52/60	8/60	57/60	3/60	16/60
	Jetra	54/60	6/60	58/60	2/60	ni
	Bubrezi	55/60	5/60	58/60	2/60	ni
	Srce	60/60	0/60	60/60	0/60	ni

Legenda: ni= nije ispitano.

U većini uzoraka limfatičnog tkiva domaćih svinja sa simptomima PMWS sindroma signal umerenog i izrazitog intenziteta uočen je u citoplazmi ćelija koje po morfologiji odgovaraju različitim makrofagima (*slika 17A*). U ispitanim uzorcima poreklom od divljih svinja pozitivni signal je bio slabijeg intenziteta. Na osnovu distribucije hromogenog signala može se zaključiti da se i kod divljih i kod domaćih svinja verovatno radi o različitim antigen prezentujućim ćelijama, uključujući folikularne dendritične ćelije, interdigitirajuće dendritične ćelije, makrofage marginalne zone, medularne makrofage, epiteloidne ćelije, itd. Takođe, signal je uočen i u citoplazmi i u jedru malih okruglih ćelija koje po morfologiji odgovaraju limfocitima. Nadalje,

signal je uočen i u raznim epitelnim ćelijama kao što su: epitelne ćelije bubrežnih tubula, alveolarne ćelije, epitelne ćelije bronhiola, hepatociti, epitelne ćelije bilijarnih izvodnih kanalića i enterociti. Korišćenjem probe za replikativnu formu genoma PCV2 pozitivni signal je utvrđen u istim tkivima kao i kod komplementarne probe, ali u značajno manjem broju ćelija. Jačina signala za dvolančani DNK PCV2 kod domaćih i divljih svinja ni u jednom slučaju nije prelazio slab intenzitet, i uglavnom se javljao u retkim, pojedinačnim ćelijama.

Ćelije limfnih čvorova u kojima je kod 52/60 (86,76%) domaćih i kod 12/60 (20,00%) divljih svinja dokazano prisustvo genoma PCV2 uz pomoć komplementarne probe, su ćelije koje po morfološkim karakteristikama odgovaraju makrofagima. Pozitivne ćelije su smeštene uglavnom u zonama limfnih folikula sa deplecijom limfocita, oko trabekularnih i subkapsularnih sinusa (*slika 18A, 18B i 18C*). Takođe, pozitivne ćelije su zabeležene u perifolikularnim i parafolikularnim zonama limfnih čvorova (*slika 18D*). Nadalje, u limfnim folikulima i perifolikularno uočene su male okrugle ćelije sa prisutnim genomom PCV2, koje odgovaraju limfocitima (*slika 19A*). Intenzitet signala je jači kod većine domaćih svinja, u odnosu na signal koji je zabeležen kod divljih svinja. Pozitivni signal kod probe za replikativnu formu PCV2 je uočen u istoj vrsti ćelija kao kod komplementarne probe, samo u mnogo manjem broju ćelija. U ovom slučaju pozitivnu reakciju, najčešće u ćelijskom jedru, pokazale su pojedinačne ćelije, uglavnom smeštene u limfnim folikulima (*slika 17B i 19B*), kod 28/60 (46,67%) domaćih i 4/60 (6,67%) divljih svinja.

U tonzilama 44/60 (73,33%) domaćih i 7/60 (11,67%) divljih svinja prisutan je bio veliki broj ćelija koje pokazuju pozitívni signal komplementarne probe. Većina ćelija sa citoplazmatskim, ređe nuklearnim signalom uočena je subepitelijalno u limfnim folikulima i difuznom limfatičnom tkivu (*slika 19C i 19D*). Pozitivne ćelije po morfološkim osobinama odgovaraju makrofagima, ređe limfocitima. Intenzitet signala komplementarne probe, kao što se iz tabele br. 7 vidi, varirao je od slabo do izrazito pozitivnog. Kod većine domaćih svinja

je bio jačeg a kod divljih uglavnom slabijeg intenziteta. Signal poreklom od replikativne forme genoma PCV2, dokazan je kod 20/60 (33,33%) domaćih i 1/60 (1,67%) divljih svinja. Čelijska populacija koja je bila pozitivna na replikativnu formu PCV2, po morfologiji odgovara limfocitima.

U slezini 47/60 (78,33%) domaćih i 5/60 (8,33%) divljih svinja je zapažen pozitivan signal komplementarne probe različitog intenziteta. Pozitivne ćelije su pre svega makrofagi, ređe i limfociti, smešteni u beloj pulpi. U većini pozitivnih ćelija utvrđena je citoplazmatska lokalizacija virusnog genoma. Imunoreaktivne ćelije su koncentrično raspoređene oko centralne arterije, a ređe difuzno oko trabekularnih sinusa (*slika 20A*). Pozitivni signal replikativne forme genoma PCV2, ustanovljen je kod 20/60 (33,33%) domaćih i kod 1/60 (1,67%) divljih svinja. U tom slučaju, jedarni signal poticao je od pojedinačnih ćelija smeštenih u PALS-u (*slika 20B*). Ove ćelije imaju istu morfologiju kao pozitivne ćelije kod komplementarne probe i predstavljaju retke makrofage i limfocite.

Različit intenzitet signala komplementarne probe uočen je u tankim crevima kod 51/60 (85,00%) domaćih i 9/60 (15,00%) divljih svinja, kao što je to prikazano u tabeli br. 7. Signal poreklom od probe za replikativnu formu PCV2 dokazan je u crevima kod 24/60 (40,00%) domaćih i kod 2/60 (3,33%) divljih svinja. Pozitivni signal obe probe je najčešće uočen u GALT-u. U Pajerovim pločama je zabeleženo prisustvo umerenog do velikog broja makrofaga i limfocita koji su eksprimirali citoplazmatski, a ređe i jedarni signal (*slika 20C*) komplementarne probe. Takođe, signal je uočen i u makrofagima i limfocitima difuznog limfatičnog tkiva crevne submukoze (*slika 20C*). Ređe, u jedru pojedinačnih enterocita, smeštenih u bazalnom delu crevnih resica, uočeno je postojanje pozitivnog signala komplementarne i replikativne probe (*slika 21C i 21D*). U debelim crevima je pozitivan signal komplementarne i replikativne probe uglavnom uočen u ileocekalnoj valvuli, kao što je prikazano u tabeli br. 7. U difuznom limfatičnom tkivu i u limfnim folikulima ileocekalne valvule nalazile su se ćelije sa pozitivnim signalom u citoplazmi, ređe u jedru. Ove ćelije

su najčešće makrofagi, ređe limfocitima. Najveći broj makrofaga, koji su dali pozitivnu komplementarnu probu, nalazilo se u limfnim folikulima i u submukozi oko Liberkinijevih kriпти (*slika 20D*).

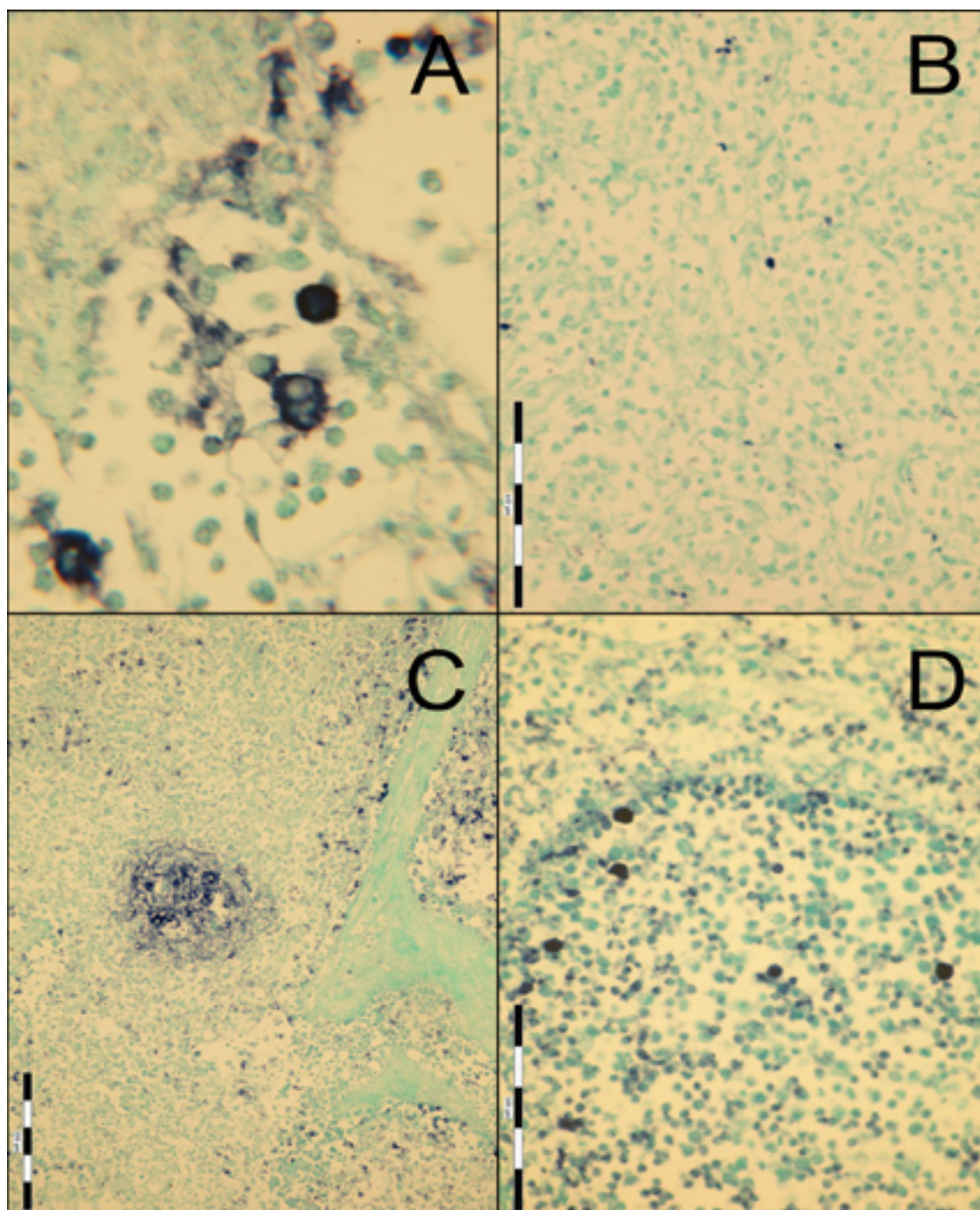
U plućima ispitanih domaćih i divljih svinja, virusni genom je u različitoj količini dokazan kod 48/60 (80,00%) domaćih i kod 8/60 (13,33%) divljih svinja, kao što je prikazano u tabeli br. 8. Komplementarnom probom je genom PCV2 utvrđen u citoplazmi makrofaga smeštenih u intersticijumu lobulusa, ređe u makrofagama alveola. U zonama intersticijalne pneumonije, u zadebljalom alveolarnom zidu, imunopozitivni makrofagi su bili glavna ćelijska populacija. Kada su znaci intersticijalne pneumonije bili intenzivni, pozitivni signal komplementarne probe, a ređe i signal poreklom od replikativne probe utvrđen je i u jedru alveolarnih epitelnih ćelija (*slika 21A*). Ovaj signal je ponekad lokalizovan u uglovima alveola, u ćelijama koje po morfologiji odgovaraju pneumocitima tipa II (*slika 21B*). Takođe, pozitivni signal komplementarne probe uočen je i u pojedinačnim epitelnim ćelijama bronhija i bronhiola. Pozitivni signal komplementarne probe različitog intenziteta, ređe i signal poreklom od replikativne probe, zabeležen je u peribronhijalnom limfatičnom tkivu. U tom slučaju makrofagi sa citoplazmatskim signalom, u manjem broju i limfociti sa jedarnim signalom, bili su difuzno raspoređeni u BALT-u (*slika 22B*). Pozitivni citoplazmatski signal komplementarne probe zabeležen je i u ćelijama zapaljenskog eksudata koji ispunjava lumen alveola, bronhija i bronhiola (*slika 22A*).

U jetri ispitanih svinja, genom PCV2 ustanovljen je komplementarnom probom kod 32/60 (53,33%) domaćih i kod 6/60 (10,00%) divljih svinja. Pozitivni signal komplementarne probe utvrđen je najčešće u ćelijama mononuklearnog infiltrata periportne regije, Kupferovim ćelijama proširenih hepatičnih sinusa (*slika 22C*), u epitelnim ćelijama žučnih izvodnih kanalića, a ređe i u jedru hepatocita lokalizovanih bliže portne regije. Signal slabog intenziteta, poreklom od probe za replikativnu formu PCV2, zapažen je kod

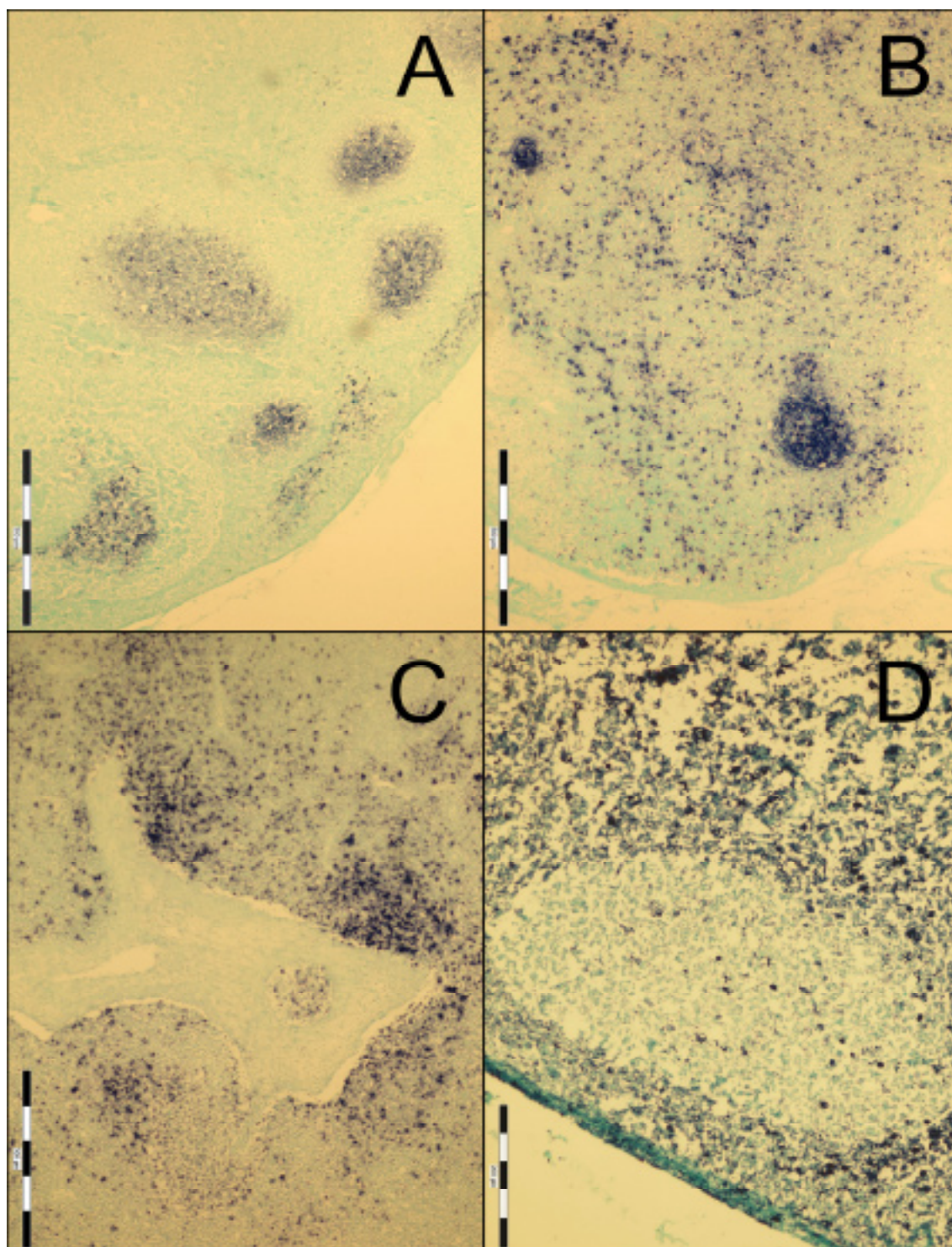
14/60 (23,33%) domaćih i kod 2/60 (3,33%) divljih svinja. Kod njih, replikativna forma PCV2 bila je prisutna u jedru epitelnih ćelija žučnih izvodnih kanalića, u jedru hepatocita blizu portne regije i retkim Kupferovim ćelijama.

U bubregu 20/60 (33,33%) domaćih i 5/60 (8,33%) divljih svinja genom PCV2 dokazan je komplementarnom probom. Ciljne ćelije za genom PCV2 bile su ćelije mononuklearnog infiltrata i epitelne ćelije bubrežnih tubula (*slika 22D*). Pozitivni signal komplementarne probe je najčešće uočen u kortikalnoj zoni bubrega, u predelima fokalnog intersticijalnog nefritisa, pre svega u citoplazmi infiltrujućih makrofaga. Retko je zabeležen pozitivan signal i u epitelnim ćelijama bubrežnih tubula. Signal poreklom od replikativne forme PCV2 je u bubrezima utvđen kod 8/60 (13,33%) domaćih i kod 2/60 (3,33%) divljih svinja, u vidu jedarne pozitivne reakcije retkih epitelnih ćelija bubrežnih kanalića.

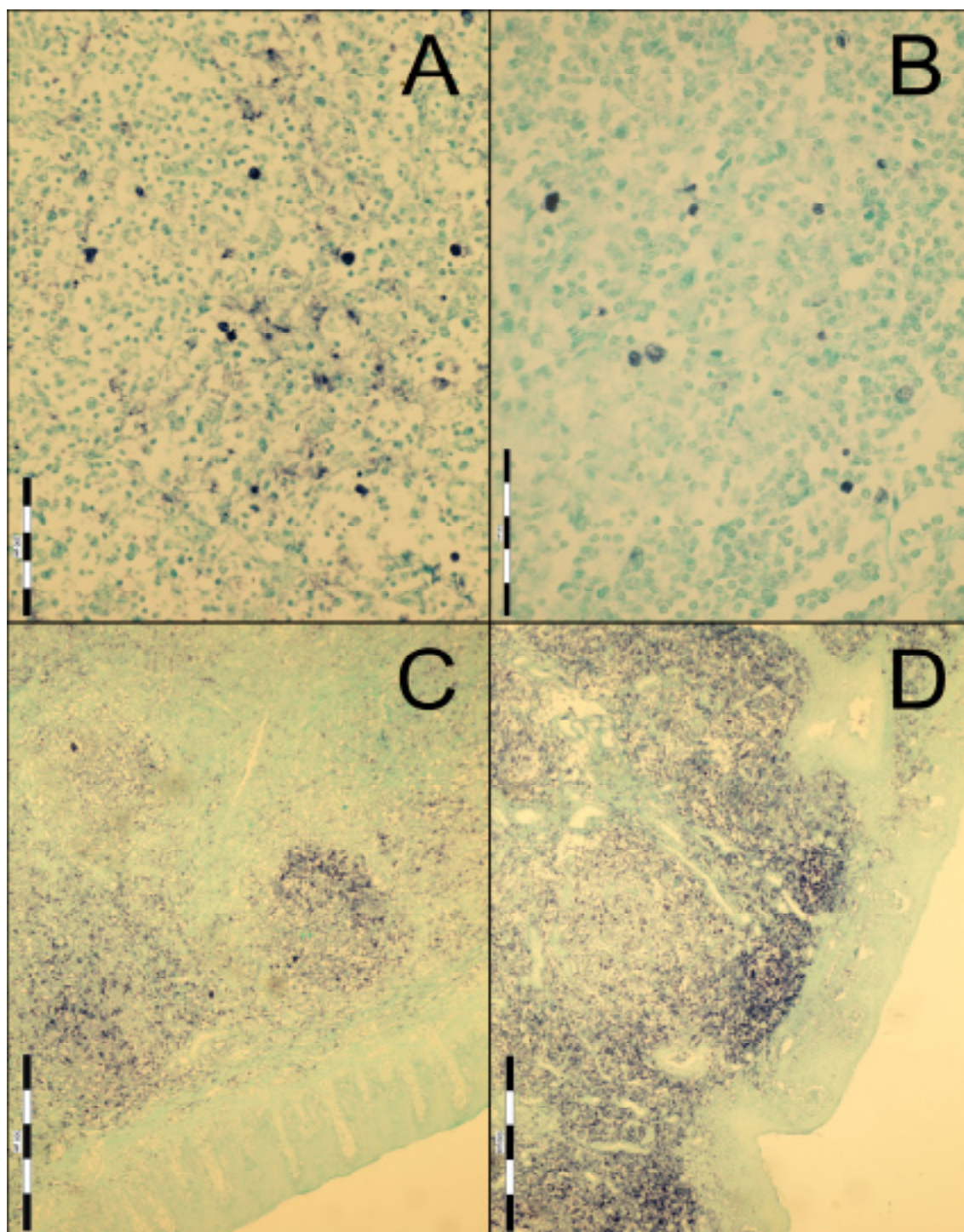
U srcu ispitanih domaćih i divljih svinja nije uočena pozitivna reakcija koja bi potvrdila prisustvo genoma PCV2.



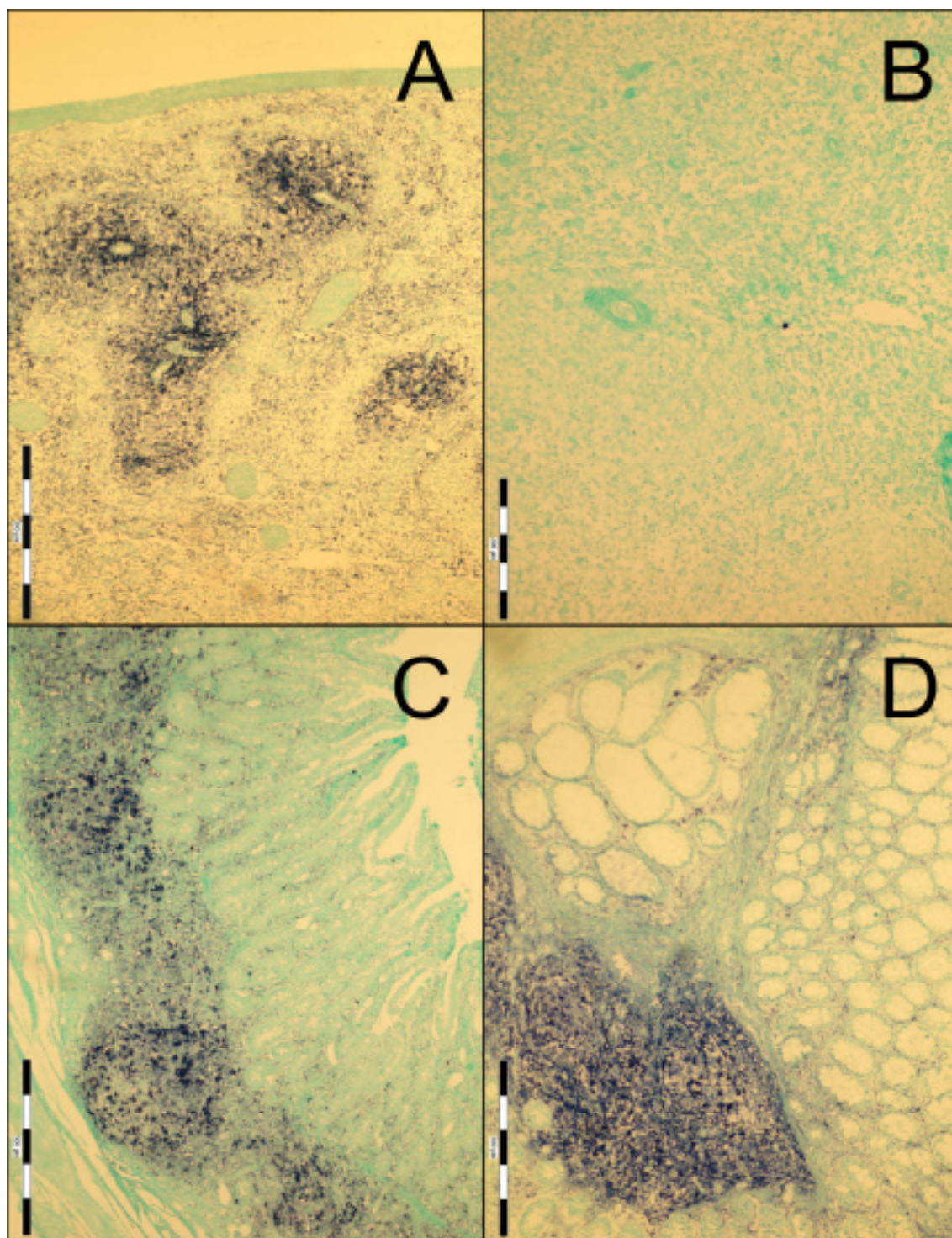
Slika 17. A. Submandibularni limfni čvor domaće svinje, prisustvo genoma PCV2 u citoplazmi (u sredini dole) i jedru (u sredini gore) mononuklearnih ćelija limfnog folikula. CP ISH. 1000X. B. Ingvinalni superficijalni limfni čvor domaće svinje, intranuklearni signal u malom broju ćelija. RFP ISH. Bar: 100µm. C. Mezenterijalni limfni čvor domaće svinje, prisustvo genoma PCV2 u sklopu infektivnog granuloma. CP ISH. Bar: 200µm. D. Mezenterijalni limfni čvor domaće svinje, u limfnom folikulu uočavaju se velike, okruglaste mononuklearne ćelije pretežno sa jedarnom ekspresijom genoma PCV2. CP ISH. Bar: 100µm.



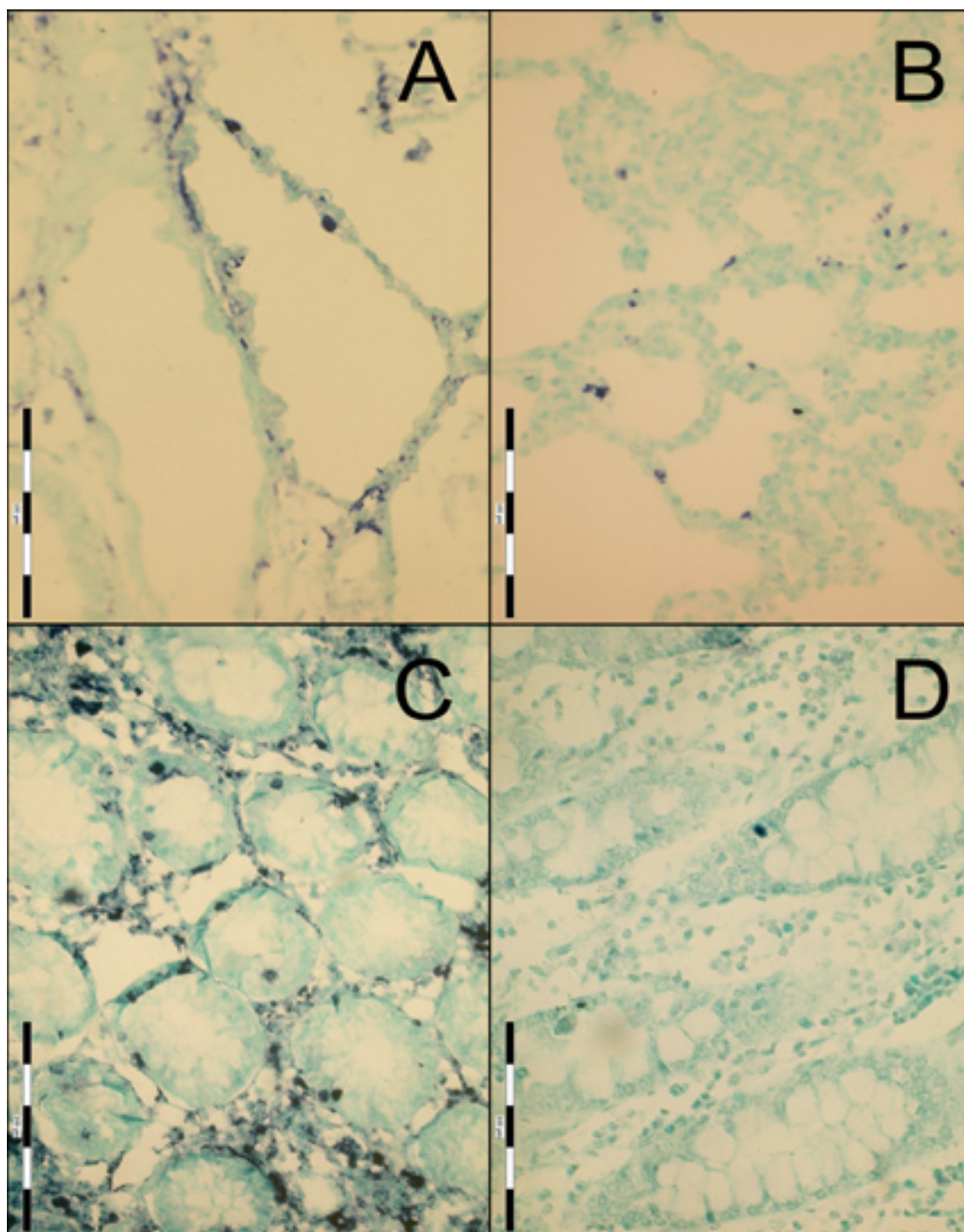
Slika 18. **A.** Mezenterijalni limfni čvor divlje svinje, folikularna ekspresija genoma PCV2. CP ISH. Bar: 500 μ m. **B.** Medijastinalni limfni čvor domaće svinje, inenzivna, difuzna ekspresija genoma PCV2. CP ISH. Bar: 500 μ m. **C.** Ingvinalni superficijalni limfni čvor domaće svinje, intenzivna imunopozitivna reakcija. CP ISH. Bar: 500 μ m. **D.** Mezenterijalni limfni čvor divlje svinje, prisustvo mnogobrojnih makrofaga i limfocita sa citoplazmatskim i jedarnim signalom genoma PCV2. CP ISH. Bar: 200 μ m.



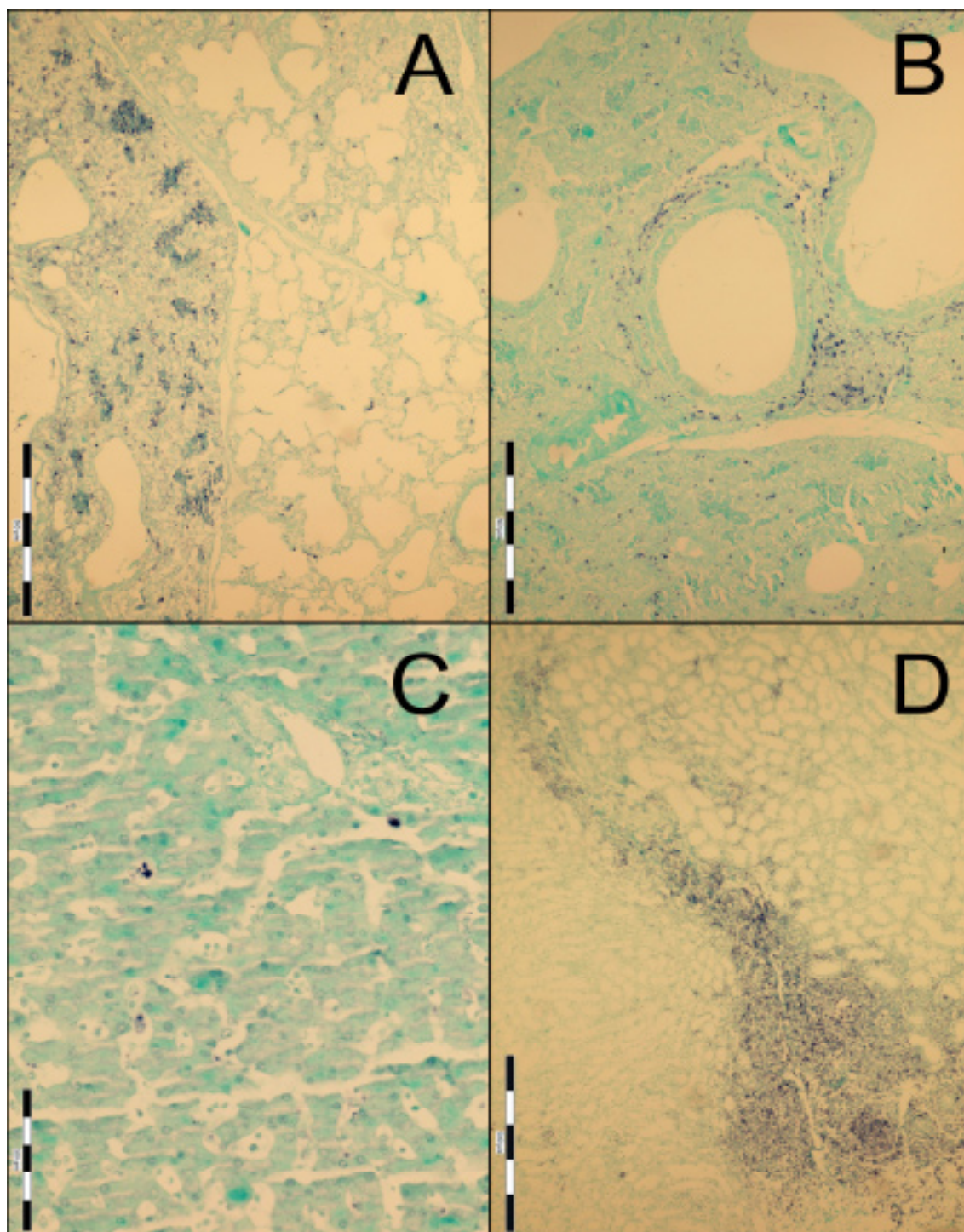
Slika 19. A. Ingvinalni superficialni limfni čvor domaće svinje, ekspresija genoma PCV2 u difuzno raspoređenim makrofagima. CP ISH. Bar: 100µm. B. Mezenterijalni limfni čvor divlje svinje, makrofagi i limfociti u limfnom folikulu sa intranuklearnim signalom replikativne forme PCV2. RFP ISH. Bar: 100µm. C. Tonzila divlje svinje, umerena ekspresija genoma PCV2 u limfnim folikulima. CP ISH. Bar: 500µm. D. Tonzila domaće svinje, intenzivna imunopozitivna reakcija limfatičnog tkiva i pojedinih epitelnih ćelija. CP ISH. Bar: 500µm.



Slika 20. **A.** Slezina domaće svinje, intenzivna ekspresija genoma PCV2 u beloj pulpi. CP ISH. Bar: 500 μ m. **B.** Slezina divlje svinje, pojedinačni signal poreklom od replikujućeg PCV2 u beloj pulpi. RFP ISH. Bar: 200 μ m. **C.** Tanko crevo domaće svinje, jak pozitivni signal genoma PCV2 u Pajerovoj ploči. CP ISH. Bar: 500 μ m. **D.** Ileocekalna valvula divlje svinje, intenzivna ekspresija genoma PCV2 u difuznom i folikularnom limfatičnom tkivu. CP ISH. Bar: 500 μ m.



Slika 21. **A.** Pluća domaće svinje, ekspresija genoma PCV2 u jedru epitelnih ćelija alveola. CP ISH. Bar: 100µm. **B.** Pluća domaće svinje, pojedinačni pneumociti u uglovima alveola sadrže replikujuću formu PCV2. RFP ISH. Bar: 100µm. **C.** Tanko crevo divlje svinje, u jedru pojedinih enterocita i mnonuklearnim ćelijama lamine proprije mukoze eksprimira se genom PCV2. CP ISH. Bar: 100µm. **D.** Tanko crevo divlje svinje, ekspresija replikujućeg genoma PCV2 u jedru enterocita. RFP ISH. Bar: 100µm.



Slika 22. A. Pluća domaće svinje, ekspresija gena PCV2 u eksudatu alveola i bronhiola. CP ISH. Bar: 500 μ m. B. Pluća domaće svinje, ekspresija gena PCV2 u peribronhiolarnom limfatičnom tkivu. Pojedinačne epitelne ćelije bronhiola ekspimiraju genom virusa. CP ISH. Bar: 500 μ m. C. Jetra domaće svinje, pojedinačne mononuklearne ćelije u portnoj regiji i retke Kupferove ćelije ekspimiraju replikativnu formu PCV2. RFP ISH. Bar: 100 μ m. D. Bubrež domaće svinje, ćelije mononuklearnog ćelijskog infiltrata i retki tubulociti ekspimiraju genom PCV2. CP ISH. Bar: 500 μ m.

5.7. Razlike u zastupljenosti i intenzitetu, za PCVAD značajnih, histopatoloških promena na limfatičnom tkivu domaćih i divljih svinja

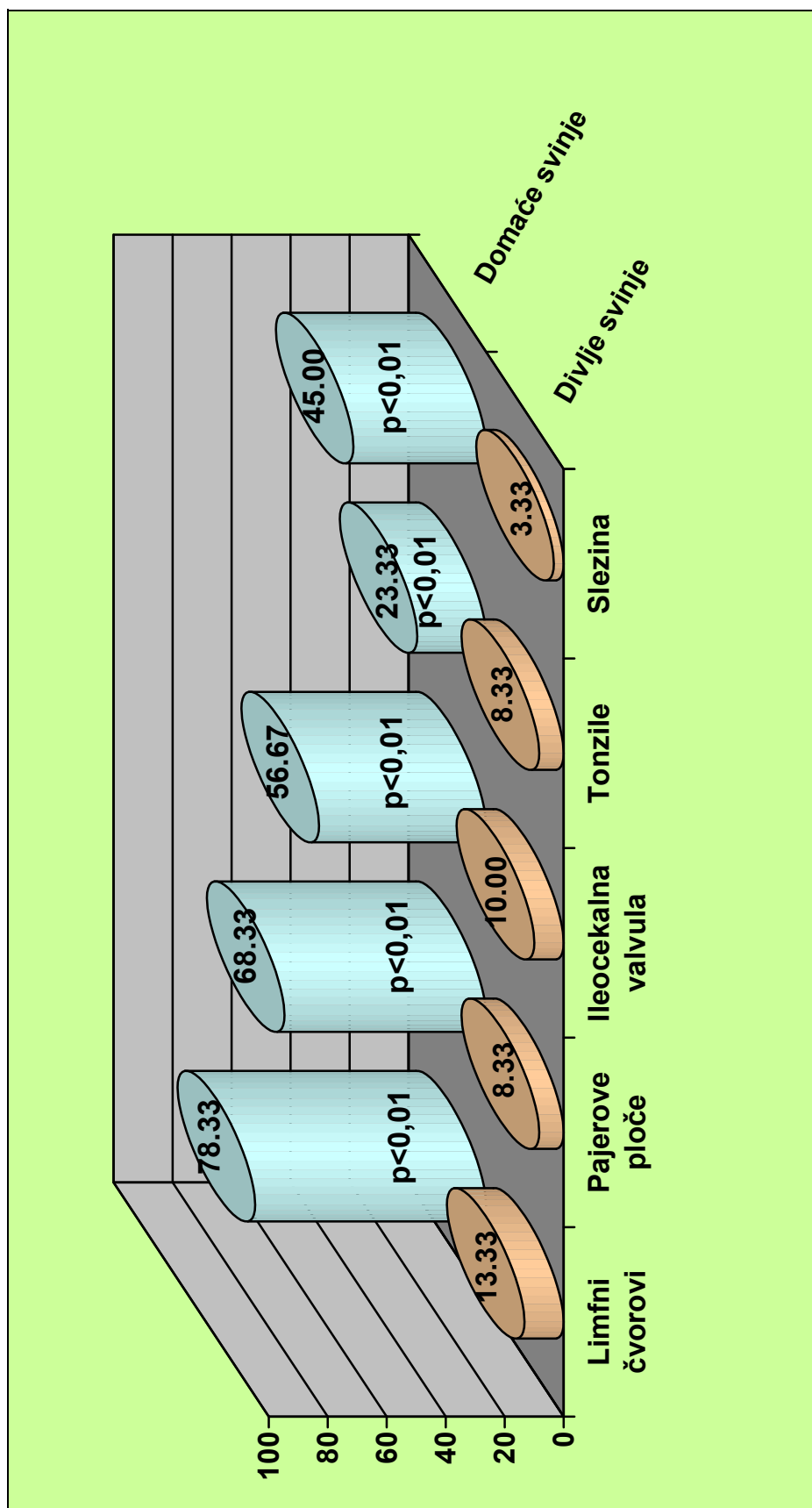
Statističkom analizom učestalosti histopatoloških promena na limfatičnom tkivu, koje su od značaja za PCVAD, je utvrđeno da su one značajno češće kod domaćih u odnosu na divlje svinje (*tabela br. 9 i dijagram br. 1*). Nadalje, utvrđeno je da se kod domaćih svinja na limfnim čvorovima značajno češće pojavljuju lezije drugog i trećeg stepena nego kod divljih svinja ($p < 0.01$). Takođe je utvrđena statistički vrlo značajna razlika u učestalosti pojave histopatoloških promena drugog i trećeg stepena na Pajerovim pločama i ileocekalnoj valvuli. Ove promene su češće kod domaćih u odnosu na divlje svinje ($p < 0.01$). Na slezini domaćih svinja pojava promena trećeg stepena je bila učestalija nego na slezini divljih svinja ($p < 0.05$).

Tabela br. 9. Statistička značajnost razlike u zastupljenosti histopatoloških promena određenog intenziteta utvrđenih na limfatičnom tkivu između domaćih i divljih svinja

	Tkivo	Intenzitet tkivnog oštećenja			
		BL	I	II	III
Domaće svinje	Limfni čvorovi	11,67 ^a	10,00	53,33 ^b	25,00 ^c
	Pajerove ploče	20,00 ^a	11,67	50,00 ^b	18,33 ^c
	Ileocekalna valvula	25,00 ^a	18,33	48,33 ^b	8,33
	Tonzile	18,33 ^a	11,67	51,67 ^b	18,33 ^c
	Slezina	50,00 ^a	5,00	35,00 ^b	10,00 ^A
Divlje svinje	Limfni čvorovi	65,00 ^a	21,67	10,00 ^b	3,33 ^c
	Pajerove ploče	75,00 ^a	16,67	6,67 ^b	1,67 ^c
	Ileocekalna valvula	78,33 ^a	11,67	8,33 ^b	1,67
	Tonzile	78,33 ^a	13,33	6,67 ^b	1,67 ^c
	Slezina	90,00 ^a	6,67	1,67 ^b	1,67 ^A

Legenda: istim slovima a, b, c = $p < 0,01$; istim slovima A = $p < 0,05$.





Dijagram br. 1. Statistička značajnost razlike učestalosti (%) tkivne lezije srednjeg i jakog intenziteta u limfatičnom tkivu između domaćih i divljih svinja, koji uslovljavaju PCVAD.

5.8. Razlike u zastupljenosti i intenzitetu ekspresije Cap antigena PCV2 u limfatičnom tkivu domaćih i divljih svinja

Statističkom analizom prisustva i intenziteta ekspresije *Cap* antigena PCV2 u limfatičnom tkivu utvrđeno je da se on značajno češće i u većoj količini javlja kod domaćih u odnosu na divlje svinje (*tabela br. 10 i dijagram br. 2*).

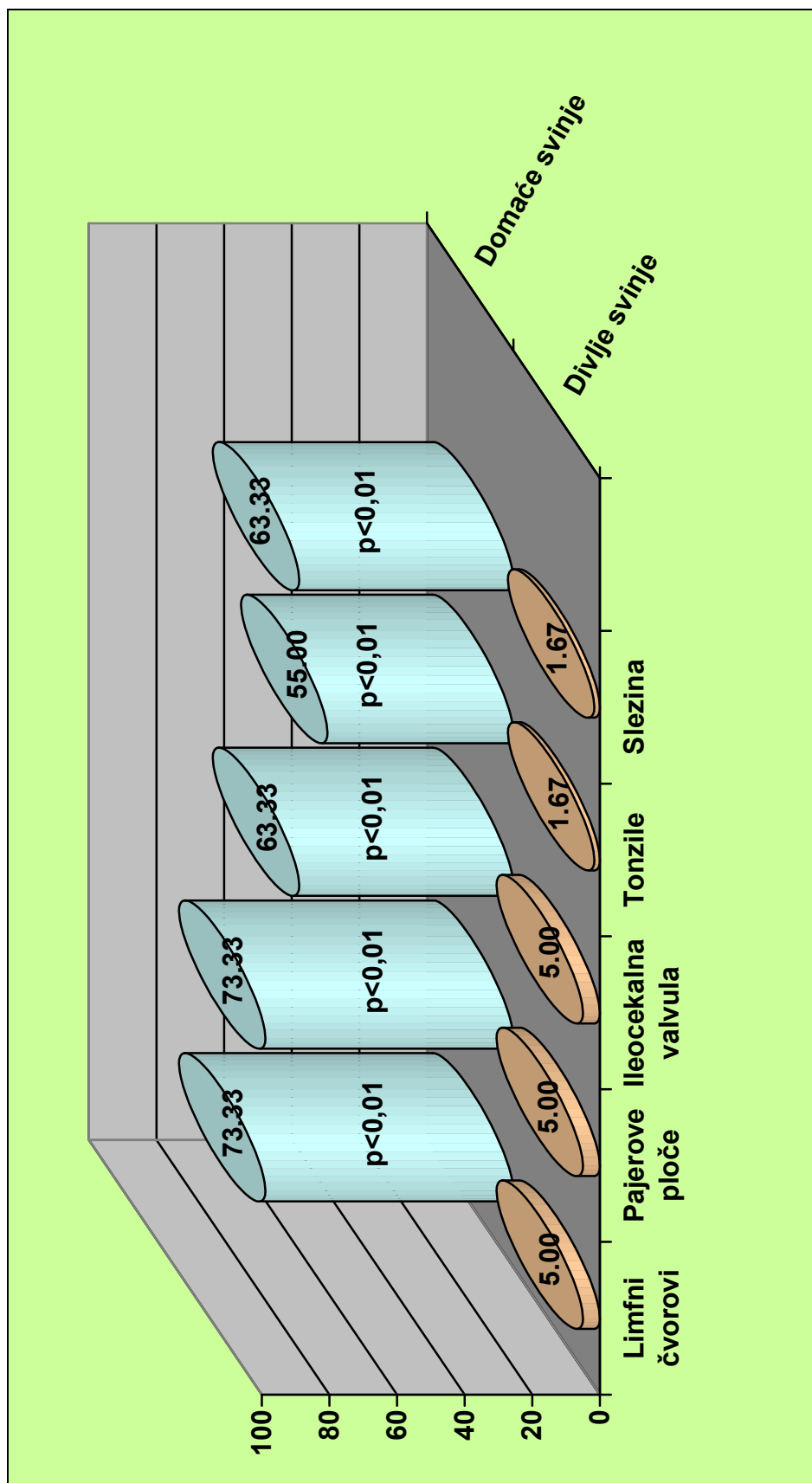
Kako se iz tabele i dijagrama vidi, nalaz umerene i velike količine *Cap* antigena PCV2 u tonzilama, Pajerovim pločama, ileocekalnoj valvuli, slezini i limfnim čvorovima je značajno učestaliji, kod domaćih nego kod divljih svinja ($p < 0.01$). Nasuprot ovome, nije ustanovljena statistički značajna razlika u učestalosti nalaza male količine *Cap* antigena PCV2 u istim tkivima između domaćih i divljih svinja ($p > 0.05$).

Tabela br. 10. Statistička značajnost razlike u ekspresiji *Cap* antigena PCV2 u limfatičnom tkivu između inficiranih domaćih i divljih svinja

	Tkivo	Intenzitet ekspresije					PCR	
		IHC						
		-	+	++	+++	Σ pozitivno	Σ pozitivno	
Domaće svinje	Tonzile	30,00 ^a	15,00	36,67 ^b	18,33 ^c	70,00 ^d	ni	
	Pajerove ploče	16,67 ^a	10,00	50,00 ^b	23,33 ^c	83,33 ^d	ni	
	Ileocekalna valvula	23,33 ^a	13,33	46,67 ^b	16,67 ^c	76,67 ^d	ni	
	Slezina	25,00 ^a	11,67	48,33 ^b	15,00 ^c	75,00 ^d	100,00 ^e	
	Limfni čvorovi	15,00 ^a	11,67	51,67 ^b	21,67 ^c	85,00 ^d	*100,00 ^e	
Divlje svinje	Tonzile	88,33 ^a	10,00	1,67 ^b	0,00 ^c	11,67 ^d	ni	
	Pajerove ploče	86,67 ^a	8,33	3,33 ^b	1,67 ^c	13,33 ^d	ni	
	Ileocekalna valvula	86,67 ^a	8,33	3,33 ^b	1,67 ^c	13,33 ^d	ni	
	Slezina	91,67 ^a	6,67	1,67 ^b	0,00 ^c	8,33 ^d	26,67 ^e	
	Limfni čvorovi	81,67 ^a	13,33	3,33 ^b	1,67 ^c	18,33 ^d	*26,67 ^e	

Legenda: istim slovima a, b, c, d, e = $p < 0,01$; * = ingvin. superfic. limfni čvor; ni = nije ispitano





Dijagram br. 2. Statistička značajnost razlike učestalosti (%) ekspresije srednjeg i jakog imunopozitivnog signala Cap antigena PCV2 u limfatičnom tkivu između domaćih i divljih svinja, koji uslovljavaju PCVAD.

5.9. Razlike u zastupljenosti i intenzitetu ekspresije genoma PCV2 u limfatičnom tkivu domaćih i divljih svinja

Rezultati ispitivanja hibridizacije *in situ* ukazuju na statistički vrlo značajne razlike između domaćih i divljih svinja, u pogledu prisustva genoma PCV2 u limfatičnom tkivu (*tabela br. 11 i dijagram br. 3*).

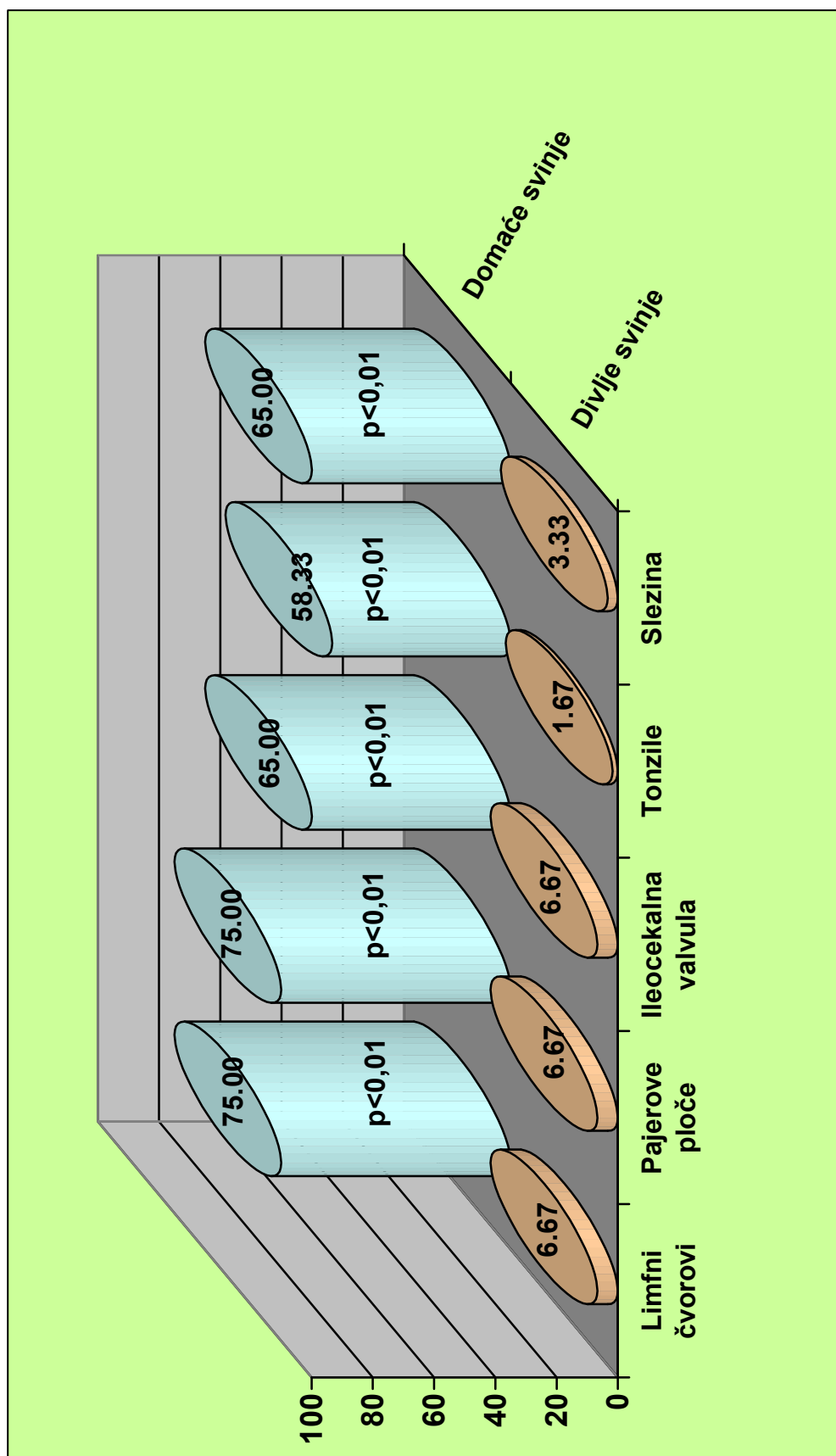
Kako je u tabeli i grafikonu prikazano, statistički vrlo značajne razlike su ustanovljene, između domaćih i divljih svinja, u pojavi signala komplementarne probe umerenog i jakog intenziteta. Signal umerenog i jakog intenziteta u tonzilama, Pajerovim pločama, ileocekalnoj valvuli, slezini i limfnim čvorovima uočen je kod značajno većeg broja domaćih nego divljih svinja ($p < 0.01$). Takođe, statistički veoma značajna razlika uočena je i kod pojave signala replikativne forme genoma PCV2, koji je bio učestaliji u limfatičnom tkivu domaćih svinja ($p < 0.01$).



Tabela br. 11. Statistička značajnost razlike u ekspresiji genoma PCV2 u limfatičnom tkivu između inficiranih domaćih i divljih svinja

Tkivo	CP ISH					RFP ISH		PCR Σ Pozitivno	
	-	+	++	+++	Σ Pozitivno	-	+		
Domaće svinje	Tonzile	26,67 ^a	15,00	36,67 ^b	21,67 ^c	73,33 ^d	66,67 ^e	33,33 ^f	ni
	Pajerove ploče	15,00 ^a	10,00	50,00 ^b	25,00 ^c	85,00 ^d	60,00 ^e	40,00 ^f	ni
	Ileocekalna valvula	21,67 ^a	13,33	46,67 ^b	18,33 ^c	78,33 ^d	61,67 ^e	38,33 ^f	ni
	Slezina	21,67 ^a	13,33	48,33 ^b	16,67 ^c	78,33 ^d	66,67 ^e	33,33 ^f	100,00 ^g
	Limfni čvorovi	13,33 ^a	16,67	51,67 ^b	23,33 ^c	86,67 ^d	53,33 ^e	46,67 ^f	*100,00 ^g
Divlje svinje	Tonzile	88,33 ^a	10,00	1,67 ^b	0,00 ^c	11,67 ^d	98,33 ^e	1,67 ^f	ni
	Pajerove ploče	85,00 ^a	8,33	5,00 ^b	1,67 ^c	15,00 ^d	96,67 ^e	3,33 ^f	ni
	Ileocekalna valvula	85,00 ^a	8,33	5,00 ^b	1,67 ^c	15,00 ^d	96,67 ^e	3,33 ^f	ni
	Slezina	91,67 ^a	5,00	3,33 ^b	0,00 ^c	8,33 ^d	98,33 ^e	1,67 ^f	26,67 ^g
	Limfni čvorovi	80,00 ^a	13,33	5,00 ^b	1,67 ^c	20,00 ^d	93,33 ^e	6,67 ^f	*26,67 ^g

Legenda: istim slovima a, b, c, d, e, f, g = p<0,01; *= ingvinalni superficijalni limfni čvor; ni = nije ispitano



Dijagram br. 3. Statistička značajnost razlike učestalosti (%) ekspresije srednjeg i jakog imunopozitivnog signala CP ISH, u limfatičnom tkivu između domaćih i divljih svinja, koji uslovljavaju PCVAD.

6. DISKUSIJA

U ispitanim organima, primenom PCR analize, utvrđeno je prisustvo genoma PCV2 kod 100,00% domaćih svinja, i kod 26,67% divljih svinja. Ovi rezultati potvrđuju da su pomenute jedinke inficirane sa PCV2. Kako je iz literature poznato da samo prisustvo PCV2 ne podrazumeva i pojavu bolesti (*Allan i Ellis, 2000; Kim i sar., 2001; Chae, 2004*), u ovom radu je istovremeno urađena histopatološka verifikacija karakterističnih lezija u različitim tkivima i dokazan PCV2 u njima, primenom imunodijagnostičkih metoda. U istim tkivnim lezijama je imunohistohemijskom metodom dokazano prisustvo i ćelijska distribucija *Cap* antigena PCV2. Uz pomoć hibridizacije *in situ* potvrđena je lokalizacija genoma i tropizam PCV2.

Prve slučajeve cirkovirusnih infekcija kod svinja u Republici Srbiji, koji su se manifestovali u vidu PMWS sindroma, opisali su Ivetić i saradnici 2003. godine. Prve filogenetske analize PCV2 sa naših područja datiraju iz iste godina (*Toplak i sar., 2003*). Od tada se cirkovirusne infekcije u našoj zemlji (*Becskei i sar., 2010*), kao i u zemljama u okruženju: Slovenija (*Toplak i sar., 2003*), Hrvatska (*Jemeršić i sar., 2004; Lipej i sar. 2007*), Mađarska (*Kiss i sar., 2000; Molnár i sar., 2007*), Rumunija (*Cadar i sar. 2007*) endemski javljaju, nanoseći velike ekonomske gubitke svinjarskoj proizvodnji. Bez obzira na tu činjenicu, u našoj zemlji je i dalje malo publikovanih naučnih saznanja o prisustvu cirkovirusnih infekcija u populaciji domaćih, a još manje kod divljih svinja. To je razlog zašto se pristupilo ispitivanju prisustva cirkovirusnih infekcija kako u zapatima

intenzivno uzgajanih domaćih svinja, tako i u zapatima divljih svinja koje žive na slobodnom prostoru.

Od 1991. godine, kada je oboljenje prvi put opisano, do danas mnogo se saznalo o patogenezi, dijagnozi i kontroli PCVAD oboljenja. Generalni stav kanadskog svetskog naučnog komiteta danas jeste da je PCV2 neophodan činilac u nastanku PCVAD oboljenja, s tim da je u većini slučajeva neophodno i prisustvo određenih drugih činilaca, kao što su udružene infekcije, imunostimulacija, neke genetske karakteristike domaćina i dr. Takođe, postalo je evidentno da se PCVAD oboljenja klinički mogu manifestovati u vidu generalizovane sistemske bolesti (PMWS), respiratorne forme, crevne forme, reproduktivne smetnje i možda još u nekim oblicima koji su zasad nedovoljno poznati. Dobrim odabirom određenih modernih dijagnostičkih metoda može da se potvrdi PCVAD oboljenje. Te metode imaju za cilj da se dokaže prisustvo PCV2 u tkivnoj leziji. Bez obzira na mnoge date odgovore PCVAD oboljenja i dalje predstavljaju veliku nepoznanicu, pre svega što se tiče razumevanja molekularne patogenezе i virulencije koju ispoljavaju različiti izolati PCV2.

Primenom lančane reakcije polimeraze (PCR) dokazano je prisustvo PCV2 u svim ispitanim uzorcima pluća, slezine i ingvinalnih superficijalnih limfnih čvorova, poreklom od domaćih svinja sa simptomima PMWS sindroma. Takođe, utvrđeno je da je PCV2 bio prisutan u plućima, slezini i ingvinalnim superficijalnim limfnim čvorovima kod 16 ispitanih divljih svinja. U pozitivnim uzorcima dokazan je PCR produkt očekivane dužine (501 bp), koji odgovara fragmentu referentnog soja „Stoon 1010“ PCV2. Ovi nalazi govore u prilog tome da je 100% ispitanih domaćih svinja, i 26,67% ispitanih divljih svinja bilo inficirano sa PCV2. Dobijeni rezultati svedoče o prisustvu cirkovirusa u zapatima domaćih i divljih svinja na našem području. Infekcija je prisutna u svim ispitanim zapatima domaćih svinja koji su poreklom sa različitih lokaliteta epizootiološkog područja Severno-bačkog okruga. Dokazano je, takođe, da su različite starosne kategorije divljih svinja, koje žive u otvorenim i zatvorenim

lovištima Severno-bačkog okruga, takođe nosioci PCV2, i kao takvi predstavljaju moguće prirodne rezervoare virusa. Uporedivši stepen zaraženosti zapata divljih svinja na našem području u odnosu na ispitivanja izvršena u Sloveniji, Nemačkoj i Mađarskoj, uočljivo je da je kod nas slična epizootiološka situacija kao u Sloveniji i Mađarskoj. Istraživanja prisustva PCV2 uz pomoć PCR analize u populaciji divljih svinja u Sloveniji potvrdila su prisustvo PCV2 kod 25% ispitanih jedinki (*Toplak i sar., 2004*), što je skoro isti stepen zaraženosti zapata kao na našem podneblju. U Mađarskoj je utvrđeno da je 20,50% ispitanih divljih svinja zaraženo sa PCV2 (*Cságola i sar., 2006*). U Nemačkoj je infekcija divljih svinja sa PCV2 mnogo učestalija i zabeležena je kod 63,10% ispitanih jedinki (*Reiner i sar., 2010*). Treba uzeti u obzir da se, za razliku od naše zemlje, u Nemačkoj velike populacije divljih svinja gaje poluintenzivno, sa većim brojem jedinki po jedinici površine staništa.

Do danas, PCVAD oboljenja se u visokim razmerama javljaju pre svega u zapatima domaćih svinja sa dobrim zdravstvenim statusom, gde su svinje intenzivno uzgajane, uz strogu i dugotrajnu selekciju (*Allan i Ellis, 2000; Ellis i sar., 1998*). Elementi modernog upravljanja svinjarskom proizvodnjom, koji pored stroge selekcije podrazumevaju i programsku vakcinaciju, rano zalučivanje prasadi, mešanje mladih prasadi iz više zapata u perinatalnom periodu, intenzivno držanje velikih aglomeracija svinja na malom prostoru, sigurno utiču kao predisponirajući faktori koji pospešuju patogenezu i širenje PCVAD oboljenja (*Albina i sar., 2001; Krakowka i sar., 2003*). Pojava patoloških promena kod pojedinih ispitivanih divljih svinja inficiranih sa PCV2, uglavnom na limfatičnom tkivu, karakteristična je za PCVAD oboljenja (pre svega za PMWS sindrom) kod domaćih svinja. Ovi nalazi ukazuju na činjenicu da spomenuti elementi moderne, intenzivne svinjarske proizvodnje nisu obavezni činioci u nastajanju oboljenja udruženih sa PCV2, već su oni jedan od mnogobrojnih potencijalnih faktora koji doprinose razvoju PCVAD oboljenja, obzirom na to da su ova oboljenja multifaktorijalne prirode. U literaturi je

opisano da mnogi mikroorganizmi pospešuju patogenezu infekcije sa PCV2. Nalazi patomorfoloških i patohistoloških promena na respiratornim i gastrointestinalnim organima ispitanih domaćih i divljih svinja govore u prilog postojanju infekcije sa bakterijama, drugim virusima, i mikoplazmama, uglavnom kod domaćih svinja (*Allan i sar., 2000; Krakowka i sar., 2001; Kim i sar., 2002; Pallares i sar., 2002; Kim i Chae, 2003*). Slični su nalazi i kod divljih svinja, kod kojih se može istaći dobijeni nalaz intenzivnih parazitarnih infekcija respiratornog (*Metastrongylus spp.*) i gastrointestinalnog (*Hyostromylus rubidus i Oesophagostomum spp.*) sistema. Treba naglasiti da se domaća i divlja svinja, bez obzira na značajnu fenotipsku razliku smatraju pripadnicima iste vrste *Sus scrofa* prema kojoj je PCV2 kroz svoju evoluciju razvio tropizam. Poreklo PCV2 u ispitivanim populacijama domaćih i divljih svinja nije utvrđeno. Da li su se domaće svinje na našem podneblju zarazile od divljih svinja ili obrnuto, nije moguće zaključiti. Očigledno je da domaće svinje razvijaju intenzivnije promene, dok su kod divljih svinja ustanovljene promene blažeg intenziteta. Međutim, ne treba izgubiti iz vida da divlje svinje nisu pod neposrednim nadzorom ljudi, i verovatno da teže obolele jedinke često budu plen predatora. Iz tih razloga bolest u populacijama divljih svinja ne bude uvek primećena, niti ispitana u obimu u kojem je ona realno prisutna. Po nekim autorima hronično inficirane divlje svinje smatraju se dugogodišnjim rezervoarima cirkovirusa, i potencijalnim izvorima zaraze (*Vicente i sar., 2004; Cságola i sar., 2008b*). Obzirom da je u nekim regionima naše zemlje i danas običaj da se domaće svinje puštaju u šume, gde dolaze u kontakt sa divljim svinjama, vrlo lako može doći do zaražavanja. Ovaj običaj u našoj zemlji je veoma bitan epizootiološki faktor ne samo zbog širenja PCV2, već i zbog mogućeg širenja drugih uzročnika fatalnih zaraznih bolesti, kao što su virus Klasične kuge svinja, virus *Aujeszky* bolesti, virus bolesti virusne dijareje, itd. Ne treba zanemariti ni rezultate *Cságola-e* i saradnika koji su u svojim eksperimentima, na modelu miševia, dokazali da PCV2 može da se prenosi peroralnim putem unutar populacije

glodara (*Csághola i sar., 2008a*). Ova saznanja su od važnog epizootiološkog značaja u pogledu mogućeg širenja cirkovirusne infekcije između glodara i svinja, zatim, unutar i između populacija divljih i domaćih svinja.

Klinički simptomi multisistemskog kržljanja zalučene prasadi, i drugih oblika oboljenja svinja vezanih za infekciju sa PCV2, su nespecifični i prate mnoga druga infektivna i neinfektivna oboljenja domaćih svinja. Uprkos mnogobrojnim istraživanjima oskudna su saznanja o bolestima domaćih svinja izazvanih sa cirkovirusima, a još je manje podataka o cirkovirusnim infekcijama kod divljih svinja. Iz tih razloga su se ova ispitivanja bazirala na uporednim analizama prisustva cirkovirusnih infekcija kod domaćih i divljih svinja, na utvrđivanju patoloških promena, distribucije i tropizma PCV2 u raznim tkivima.

Makroskopskim pregledom obdukovanih domaćih svinja obolelih od PMWS sindroma ustanovljeno je da su zapaljenja pluća najučestalije promene i da se javljaju u visokom procentu (90,00%). Na plućima su najčešće zapažene gnojne bronhopneumonije, koje su posledica komplikacije primarnih virusnih intersticijalnih pneumonija sekundarnim bakterijskim uzročnicima. Kod 76,67% ispitanih domaćih svinja promenama su bili zahvaćeni kranioventralni plućni režnjevi, koji su konsolidovani, ljubičaste boje i mesnate konzistencije. Ove promene su karakteristične za mikoplazmatsku pneumoniju koja je raširena u zapatima svinja u našem regionu. Generalno uvećanje limfnih čvorova, što se smatra značajnom morfološkom promenom kod infekcije sa cirkovirusima, ustanovljeno je kod 70,00% ispitanih domaćih svinja. Bubrezi sa belim tačkastim pegama su zabeleženi kod 31,67% ispitanih domaćih svinja. Do sličnih rezultata došli su i drugi autori koji su ispitivali promene kod prasadi obolelih od PMWS sindroma. (*Rosell i sar., 1999; Krakowka i sar., 2001; Segales i sar., 2002, 2003, 2004, 2004; Martinez i sar., 2006; Kixmoller i sar., 2008*) Kod većine divljih svinja (68,33%) se u pneumoničnim plućima moglo uočiti prisustvo većeg ili manjeg broja adultnih oblika plućnih vlašaca iz roda *Metastrongylus*. Slične rezultate

navode i drugi autori koji su ispitivali populaciju divljih svinja u Hrvatskoj (*Lipej i sar., 2007*), gde je kod 50,00% ispitanih jedinki bila prisutna infestaza plućnim vlašcima. Nadalje, generalno povećanje limfnih čvorova je bilo uočeno kod 81,86%, bubrezi sa belim tačkastim pegama kod 65,00%, fibrozne promene na jetri kod 21,67% ispitanih divljih svinja. Ovi nalazi i njihova učestalost su veoma slični nalazima drugih autora koji su se bavili ispitivanjima cirkovirusnih infekcija kod divljih svinja (*Ellis i sar., 2003; Vicente i sar., 2004; Lipej i sar., 2007; Knowles i sar., 2008; Petrini i sar., 2009*).

Najučestalije histopatološke promene na plućima ispitanih domaćih svinja odgovarale su opisu bronhopneumonije (86,67%) i intersticijalne pneumonije (85,00%). Povećanje broja pneumocita tipa 2, što je čest nalaz kod virusnih pneumonija, je bilo zabeleženo kod 80,00% ispitanih domaćih svinja. Lezije u jetri i bubrežima, kod prasadi ispitane u okviru ovog rada manifestovale su se u formi multifokalne infiltracije mononuklearnim ćelijskim elementima. Kod 78,33% ispitane prasadi ustanovljena je infiltracija portne regije jetre mononuklearnim ćelijskim elementima. U nešto manjem procentu opisana je nekroza multifokalnog karaktera (30,00%) i fibroza jetre (6,67%). Multifokalni intersticijalni nefritis je dijagnostikovao kod 46,67% domaćih svinja. U okviru PMWS sindroma slične promene navode i drugi autori (*Rosell i sar., 1999, 2000; Kim i sar 2000, 2001, 2002, 2003a, 2003b, 2003c; Krakowka i sar., 2000 2001, 2003; Ivetić i sar., 2002, 2003, 2004; Segales i sar., 2002; 2003; 2004*). Kod većine ispitanih divljih svinja (75,00%) na histološkim isečcima pluća uočljivi su bili znaci verminozne bronhopneumonije, uz izraženu infiltraciju eozinofilnim granulocitima u BALT-u i peribronhiolarnom vezivu u predelima gde su prisutni paraziti. U jetri je kod 51,67% ispitanih divljih svinja uočena infiltracija portne i periportne zone mononuklearnim ćelijskim elementima. Takođe, multifokalni intersticijalni nefritis u vidu mononuklearnog ćelijskog infiltrata uočen je u bubrežima kod 46,67% ispitanih divljih svinja. Purulentni pielonefritis je bio takođe čest nalaz i zabeležen je kod 35,00% ispitanih divljih

svinja. Slični histopatološke nalaze opisuju i drugih autori (*Ruiz-Fons i sar., 2006, 2008; Lipej i sar., 2007; Sofia i sar., 2008; Petrini i sar., 2009*). Iako ustanovljena priroda histopatoloških lezija u nelimfatičnim organima domaćih i divljih svinja upućuje na to da je monocitno/makrofagna infiltracija u ovim tkivima verovatno ključna tačka u patogenezi i progresiji PCVAD, opisane lezije nemaju veću dijagnostičku vrednost (*Allan i Ellis, 2000; Kim i sar., 2001; Chae, 2004*).

Histopatološke promene od značaja za PCVAD ustanovljene su na limfatičnom tkivu kod 78,33% ispitanih domaćih i kod 13,33% divljih svinja. Kod domaćih svinja na limfatičnom tkivu, po kriterijumima *Chianini-a* (*Chiannini i sar., 2003*), ustanovljena je: blaga tkivna lezija kod 10,00%, tkivna lezija srednjeg intenziteta kod 53,33% i tkivna lezija jakog intenziteta kod 25,00% ispitanih jedinki. Limfni čvorovi (submandibularni, medijastinalni, mezenterijalni i ingvinalni superficijalni) kod najvećeg broja ispitanih domaćih svinja pokazali su folikularnu (81,67%) i interfolikularnu (86,67%) depleciju limfocita. Deplecija limfocita različitog stepena konstatovana je u slezini (50,00%), Pajerovim pločama (80,00%) i tonzilama (81,67%) domaćih svinja. Slične su promene, po istim kriterijumima, zabeležene i kod divljih svinja, ali u značajno manjem procentu. Različita distribucija i intenzitet deplecije limfocita kod ispitanih divljih svinja zabeležena je u limfnim čvorovima (35,00%), u Pajerovim pločama (25,00%) i u tonzilama (21,67%). Blage tkivne lezije na limfatičnom tkivu divljih svinja ustanovljene su kod 21,67%, tkivne lezije srednjeg intenziteta kod 10,00%, i tkivne lezije jakog intenziteta kod 3,33% ispitanih jedinki, što kod tkivnih lezija srednjeg i jakog intenziteta predstavlja statistički vrlo značajnu razliku ($p < 0,01$) u odnosu na iste promene uočene kod domaćih svinja. Pored ustanovljene deplecije limfocita, kod 51,67% ispitanih divljih svinja zapaženi su i limfni čvorovi sa hiperplazijom folikularnog i interfolikularnog tkiva. U tom slučaju su uočeni veliki folikuli sa brojnim, gusto naseljenim limfocitima, koji su bez jasne granice prelazili u interfolikularno limfatično tkivo. Interfolikularna zona u tim limfnim čvorovima bila je prožeta

gusto napakovanim limfocitima. Takođe, u velikom broju limfnih folikula izraženi su bili germinativni centri. Ove promene su zapažene uglavnom na medijastinalnim i mezenterijalnim limfnim čvorovima kod divljih svinja, pre svega kod onih jedinki kod kojih su, pored zapaljenskih procesa na plućima i crevima, bili prisutni i adultni oblici parazita. Kod ovih jedinki se takođe često moglo uočiti prisustvo povećanog broja eozinofilnih granulocita u medijastinalnim i mezenterijalnim limfnim čvorovima, uglavnom difuzno raspoređeno u interfolikularnim zonama, i u subkapsularnim i trabekularnim sinusima. Kod domaćih i divljih svinja sa izraženom deplecijom limfocita uočeno je smanjenje broja limfocita koje je imalo za posledicu otkrivanje retikularne osnove. U retikularnoj mreži nalazile su se pored malog broja limfocita i velike ćelije svetle citoplazme, koje odgovaraju makrofagima. Infiltracija sa makrofagima, epiteloidnim i ređe multijedarnim džinovskim ćelijama praćena je i umnožavanjem vezivnog tkiva. Ustanovljene promene upućuju na mišljenje da ispitane domaće i divlje svinje nisu istovremeno inficirane već da su u različitom stadijumu bolesti. Tipični granulomi infektivnog karaktera ustanovljeni su u limfnim čvorovima kod 11,67%, u slezini kod 8,33%, u Pajеровim pločama kod 10,00%, i u tonzilama kod 5,00% ispitanih domaćih svinja. Granulomi infektivnog karaktera ustanovljeni su i kod divljih svinja, pre svega u limfnim čvorovima i tonzilama, kod 10,00% ispitanih jedinki.

Prisutni makrofagi, zatim epiteloidne i multijedarne džinovske ćelije, imaju ulogu u daljem nagomilavanju mononuklearnih ćelija na mestu granulomatoznog zapaljenja, verovatno preko produkcije MCP-1. Dokazano je da makrofagi pre svega proizvode MCP-1. Ekspresija MCP-1 od strane makrofaga važan je momenat u inicijaciji nagomilavanja monocita. Na mestu PCV2 infekcije, monociti izašli iz krvnih sudova i makrofagi se aktiviraju i luče MCP-1 koji uslovljava dalje nagomilavanje monocita na mestu zapaljenske reakcije. Višejedarne džinovske ćelije prisutne na mestu zapaljenja su

visokostimulisani makrofagi u zadnjem stadijumu diferencijacije, koji stvaraju više produkata, a sposobni su i za sintezu MCP-1 (*Kim i Chae, 2003*).

Smatra se da je deplecija limfocita u limfatičnom tkivu najučestalija histološka lezija kod PMWS sindroma. Deplecija limfocita u limfnim čvorovima kod svinja obolelih od PCVAD oboljenja ogleda se u relativnom povećanju medularnog dela limfnog čvora, zbog progresivnog gubitka limfocita folikularne i interfolikularne zone. Deplecija limfocita uočena u zadnjem stadijumu PMWS sindroma znatno slabi funkciju limfnog čvora jer se gube efektorske ćelije odbrambenog sistema (*Segales i Domingo, 2002*). Podeljena su mišljenja u pogledu nastajanja deplecije limfocita, koja se pre svega odnosi na B limfocite folikula i T limfocite parakorteksa i perifolikularnog (interfolikularnog) limfatičnog tkiva. PCV2 izaziva apoptozu B limfocita dovodeći tako do drastične deplecije B limfocita i sistemske imunosupresije kod svinja (*Shibahara i sar., 2000*). Većina drugih autora smatra da je smanjen obim ćelijske proliferacije pri normalnom broju apoptoze faktor zbog kojeg dolazi do deplecije limfocita u limfatičnom tkivu obolelih svinja (*Mandrioli i sar., 2004*). Izražena imunološka depresija izazvana sa PCV2 može da se objasni značajnim opadanjem proliferacije imunih ćelija nakon smanjene ili izostale sinteze faktora rasta (*Sarli i sar., 2001*). Apoptoza je aktivni fiziološki proces u regulaciji populacije raznih ćelija, koja se karakteriše specifičnim morfološkim i biohemijskim promenama. Razni signali unutar ćelije ili signali poreklom izvan ćelije mogu aktivirati biohemijske reakcije u ćeliji koja rezultira apoptozom. U ovaj složeni proces su uključeni cistein proteinaze, enzimi iz familije kaspaza koji igraju ključnu ulogu u procesu apoptoze (*Salvesen i Dixit, 1997; Roulston i sar., 1999*). Mnogi virusi uključuju apoptozu ćelije domaćina kao deo njihovog životnog ciklusa. S druge strane, apoptoza može da bude značajan mehanizam otpuštanja i diseminacije virusnih čestica nastalih u ćeliji domaćina i na taj način se smanjuje zapaljenska reakcija organizma ili sam imuni odgovor na virus (*Roulston i sar., 1999*). Tražeći odgovor na pitanje kako dolazi do deplecije

limfocita tokom infekcije sa PCV2 utvrđeno je da ORF3 gen ima značajnu ulogu u ovom procesu, što je dokazano u eksperimentalnim uslovima. Klonirani su PCV2 kojima je delecijom izbačen gen za ORF3 protein. Ovi virusi su se i dalje nesmetano replikovali bez citopatogenog efekta i značajno manje su indukovali apoptozu. U ćelijama inficiranim nemodifikovanim virusom javljaju se citopatogeni efekti, i apoptoza je uočena u većem procentu. Nadalje, dokazano je da je u proces apoptoze indukovanog ORF3 proteinom uključen sistem kaspaza. U ćelijama inficiranim mutiranim PCV2, kome je delecijom uklonjen ORF3 gen, nije se povećao nivo kaspaze-8 i kaspaze-3, i apoptotske ćelije su bile mnogo ređe. Ova grupa autora je na osnovu svojih rezultata postavila teoriju da je ORF3 protein ključni faktor u patogenezi infekcije sa PCV2 jer može da indukuje apoptozu u inficiranim ćelijama tako što aktivira enzime apoptoze, tj. kaspazu-8 i kaspazu-3 (*Liu i sar., 2005*). Sa druge strane, eksperimenti za procenu stepena proliferativne aktivnosti i apoptoze, kao mogućih mehanizama u patogenezi ćelijske deplecije u limfnim čvorovima svinja obolelih od PMWS sindroma, pokazali su smanjen stepen proliferativne aktivnosti i nepromenjeni apoptotički indeks, čime je isključena mogućnost nastanka deplecije limfocita apoptozom (*Mandrioli i sar., 2004*).

Odnos između PCV2 i ćelija domaćina, koje su uključene u imuni odgovor, različit je na početku i na kraju bolesti. Nekoliko eksperimentalnih modela PMWS sindroma (*Allan i sar., 2000; Krakowka i sar., 2002, 2003*) ukazuju da je broj aktiviranih makrofaga inicijalni faktor za razvoj PMWS sindroma. U perifernoj krvi prasadi obolelih od PMWS sindroma javlja se povećan broj cirkulišućih monocita, dok je broj T limfocita (pre svega CD8⁺ i CD4⁺/CD8⁺) i B limfocita smanjen u odnosu na zdravu prasadi (*Segales i sar., 2001; Darwich i sar., 2002; Nielsen i sar., 2003*). Hematološkom analizom inficiranih prasadi PCV2, koja pokazuju simptome PMWS sindroma, utvrđena je limfopenija koja se karakteriše smanjenim brojem CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ memorijskih Th ćelija, CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ naivnih Th ćelija, CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺ Tc ćelija i CD3⁺ CD4⁻

CD8- $\gamma\delta$ TCR+ T limfocita (Nielsen i sar., 2003). Uloga PCV2 u nastanku limfopenije je potvrđena u eksperimentima sa modifikovanim PCV2. Veštačka infekcija modifikovanim virusom (mPCV2) nije izazvala uočljivu redukciju CD4+, CD8+ i CD4+/CD8+ T limfocita u perifernoj krvi. Rezultati istih autora govore u prilog tome da je modifikovani virus izazvao mnogo jači imuni odgovor. To se ogleda u većem titru antitela na ORF2 protein u serumu, u odnosu na infekciju sa divljim virusom, koji je pored niže serokonverzije izazvao i signifikantno smanjenje nivoa T limfocita periferne krvi (Liu i sar., 2006). Imunohistohemijskim ispitivanjima utvrđena je redukcija ili potpuni gubitak B limfocita u limfnim tkivima prasadi obolelih od PMWS sindroma (Shibahara i sar., 2000; Sarli i sar., 2001).

U kortikalnom i parakortikalnom predelu limfatičnog tkiva ispitanih domaćih i divljih svinja uočena je redukcija broja T limfocita i povećanje broja mononuklearnih-fagocitnih ćelija. Broj interfolikularnih dendritičnih ćelija takođe je smanjen. Dokazana je peritrabekularna i subkapsularna infiltracija makrofagima. Sve ove promene idu u prilog mišljenju da je više mehanizama uljučeno u imunosupresivno dejstvo PCV2, prvenstveno smanjena sposobnost antigene prezentacije i redukcije broja B i T limfocita, o čemu svedoče i mnoga druga istraživanja (Sarli i sar., 2001; Chianini i sar., 2001; Mandrioli i sar., 2004, 2006).

Rezultati PCR analize potvrđuju da je PCV2 prisutan kod svih ispitanih domaćih svinja i kod četvrtine ispitanih divljih svinja. Na uzorcima je izvršena kvalitativna PCR analiza koja govori samo o prisustvu virusa u uzorcima a ne i o količini virusa po jedinici uzorka. Novije PCR metode daju mogućnost za kvantitativnu analizu prisustva PCV2 po jedinici uzorka što je po nekim autorima dovoljno da se postavi dijagnoza PMWS sindroma, bez obzira što to nije u skladu sa prihvaćenom definicijom PMWS sindroma. Naime, novija saznanja potvrđuju da je kod klinički obolelih svinja, kod kojih su prisutna sva tri neophodna kriterijuma za postavljanje dijagnoze PMWS sindroma, nivo

PCV2 po ml krvnog seruma ili 500ng DNK tkiva uvek je veći od granične vrednosti koji iznosi 10^7 genomskih jedinica (*Brounborg i sar., 2004; Bálint i sar., 2009*). Ova metoda, međutim, ne može da omogući istovremenu vizuelizaciju histopatološke lezije i lokalizaciju antigena i genoma virusa u njoj. Zbog toga je u ovom radu, pored klasične histopatološke metode urađeno i imunohistohemijsko dokazivanje *Cap* antigena PCV2, kao i dokazivanje genoma PCV2 u fazi mirovanja i u fazi replikacije u različitim limfatičnim i nelimfatičnim organima.

Imunohistohemijska analiza i hibridizacija *in situ* su moderne dijagnostičke metode koje se rado koriste u savremenoj dijagnostici jer omogućuju da jedan isečak tkiva bude predmet patohistološke pretrage, a ujedno i da posluži za specifičnu detekciju uzročnika u njoj, pri čemu vremenski i temperaturno nisu mnogo zahtevne metode. Nadalje, daju mogućnost da se u promenjenom tkivu tačno utvrdi lokalizacija, kvantitativno i kvalitativno prisustvo različitih uzročnika. Kod mnogih oboljenja je od bitnog značaja mogućnost vizuelizacije prisustva i distribucije uzročnika u promenjenom tkivu, što je neophodno za postavljanje tačne dijagnoze i utvrđivanje uzroka i patogeneze nastalih promena. Ovo je slučaj kod mnogih oboljenja kod kojih nemamo patognomoničnu već samo sugestivnu patohistološku promenu. Utvrđivanje veze između tkivne lezije i uzročnika u njoj neophodno je da bi se mogla definisati uzročno posledična veza između njih, i da bi se mogao ispitati eventualni uticaji nekih novih patogenih uzročnika u određenim sindromima. Ove imunodijagnostičke metode doprinose boljem razumevanju patogeneze brojnih infektivnih oboljenja, obzirom da pružaju mogućnost za kvantitativnu ocenu uzročnika, omogućuju ćelijsku i tkivnu lokalizaciju i vizuelizaciju patogena u promenjenom tkivu. Dodatna prednost se ogleda i u tome što su pogodne za retrospektivna ispitivanja arhiviranih tkivnih uzoraka, te se uz pomoć njih mogu dobiti dragoceni podaci o kretanju novootkrivenih oboljenja u prošlosti, o tome otkad

oni zapravo datiraju. Na taj način je dokazano da PMWS sindrom, oboljenje koje je prvi put zapaženo 1991. godine a definisano i publikovano kao specifično oboljenje svinja tek 1996. godine, zapravo bilo prisutno već od 1986. godine (Rosell i sar., 2000; Sandvik i sar., 2001; Staebler i sar., 2005; Jacobsen i sar., 2009). Takođe je uz pomoć ovih metoda prvi put dokazan neposredni uticaj PCV2 u razvoju PMWS sindroma (Ellis i sar., 1998b; West i sar., 1999).

Ekspresija *Cap* antigena PCV2 je najčešće uočena u makrofagima raznih tkiva domaćih i divljih svinja. Makrofagi koji su pozitivni na *Cap* antigen PCV2 pokazuju izraženu citoplazmatsku lokalizaciju antigena, koja se ogleda u nalazu obilnih precipitata braon boje u citoplazmi. Ovi precipitati imaju granuliranu strukturu. U jedrima makrofaga nije uočena pozitivna reakcija na prisustvo *Cap* antigena. Imunohistohemijskom metodom je dokazano da PCV2 pokazuje lokalizaciju prvenstveno u ćelijama monocitno/makrofagnog sistema, ali je dokazano njegovo prisustvo i u epitelnim ćelijama, uključujući epitelne ćelije bubrežnih tubula, žučnih kanalića, enterocite i bronhoalveolarni epitel. Kod domaćih svinja ekspresija *Cap* antigena PCV2 ustanovljena je u plućima kod 80,00%, u jetri kod 53,33%, i u bubrezima kod 33,33% ispitanih jedinki. U slučaju divljih svinja prisustvo *Cap* antigena zabeleženo je u plućima kod 13,33%, u jetri kod 10,00%, i u bubrezima kod 8,33% ispitanih jedinki. U srcu nije ustanovljeno prisustvo *Cap* antigena PCV2 ni kod domaćih ni kod ispitanih divljih svinja. Imunoreaktivnost, koju su neki autori (Opriessnig i sar., 2006; Perez-Martin i sar., 2007) ustanovili u hepatocitima, srčanomišićnim i endotelnim ćelijama, nije ustanovljena u našem ispitivanom materijalu.

U limfatičnom tkivu domaćih i divljih svinja lokalizovana je velika količina *Cap* antigena PCV2. Jedan od glavnih parametara za postavljanje dijagnoze PMWS kod domaćih svinja se upravo bazira na intenzitetu hromogenog signala poreklom od *Cap* antigena i genoma PCV2. Ćelije u limfatičnom tkivu, u kojima je distribuiran i obeležen virusni antigen, uglavnom su makrofagi, mada je *Cap* antigen dokazan i u limfocitima. U

makrofagama se *Cap* antigen PCV2 nalazi pretežno u citoplazmi, a u limfocitima u jedru. Opisana imunoreaktivnost je različitog intenziteta i kreće se od slabo pozitivnog, sa retkim, uglavnom pojedinačnim pozitivnim ćelijama, do izrazito pozitivnog sa obilnim precipitatima braon boje u mnogobrojnim ćelijama, što je još jedan dokaz da su obolele domaće i divlje svinje u različitim stadijumima bolesti. Pozitivni signal poreklom od *Cap* antigena PCV2 utvrđen je u limfatičnom tkivu kod ukupno 85,00% ispitanih domaćih svinja, od kojih je signal slabog intenziteta uočen kod 11,67%, signal umerenog intenziteta kod 51,67%, i signal jakog intenziteta kod 21,67% jedinki. Kod divljih svinja je pozitívni signal u limfatičnom tkivu uočen kod značajno manjeg broja ($p < 0,01$) jedinki (18,33%), što je u korelaciji sa rezultatima PCR analize (100,00% pozitivno kod domaćih i 26,67% kod divljih svinja), obzirom da je PCR metoda senzitivnija u odnosu na IHC metodu. Uočeno je da za razliku od domaćih svinja, kod kojih je većina imala signal umerenog i jakog intenziteta, kod divljih svinja dominirao signal slabog intenziteta. Ukupno je kod 18,33% divljih svinja utvrđen pozitívni signal za *Cap* antigen PCV2, pri čemu je kod 13,33% ispitanih jedinki signal bio slabog, kod 3,33% umerenog i kod svega 1,67% jakog intenziteta, što u slučaju signala umerenog i jakog intenziteta predstavlja statistički vrlo značajnu razliku ($p < 0,01$) u odnosu na iste promene kod domaćih svinja.

Jedan od glavnih ciljeva ovih istraživanja bio je da se utvrdi u kojim tkivima i ćelijskim populacijama dolazi do umnožavanja PCV2 kod inficiranih domaćih i divljih svinja, i da se na taj način utvrdi tropizam ovog virusa. Ovaj cilj je zadovoljen uz pomoć specifične metode hibridizacije *in situ*, korišćenjem dve različite genomske probe. Jedna je komplementarna proba (CP), koja je dizajnirana tako da detektuje virione jednolančane i dvolančane DNK PCV2 i ORF1 mRNA PCV2. Druga je označena kao proba replikativne forme (RFP), dizajnirana tako da prepozna isključivo replikativnu formu genoma, tj. samo dvolančanu DNK PCV2. Uporedivši tkivnu distribuciju genoma i *Cap* antigena

PCV2 utvrđeno je da se oni nalaze u istim organima i tkivima. Nadalje, utvrđeno je da ista ćelijska populacija pokazuje imunoreaktivnost na genom i *Cap* antigen PCV2. Ovo su i očekivani nalazi ako se uzme u obzir činjenica da su i genom i *Cap* antigen sastavni delovi viriona PCV2. Uz pomoć komplementarne probe različita količina genoma PCV2 utvrđena je u svim ispitivanim tkivima i organima domaćih i divljih svinja osim u srcu. Distribucija genoma PCV2, korišćenjem komplementarne probe, utvrđena je u raznovrsnim ćelijama i ogledala se u nalazu precipitata plave boje na mestu pozitivne reakcije. Najveći broj imunopozitivnih ćelija pripadaju mononuklearnim ćelijskim elementima, pre svega makrofagima i limfocitima različitih tkiva. U makrofagima je uočen uglavnom intracitoplazmatski lokalizovani signal poreklom od genoma PCV2, veoma retko se moglo uočiti signal lokalizovan u ćelijskom jedru. Mestimično, pre svega u limfatičnom tkivu, zapaženi su sitne okrugle ćelije koje po morfologiji odgovaraju limfocitima, sa intranuklearno lokalizovanim signalom. Pozitivni signal komplementarne probe ustanovljen je i u nizu epitelnih ćelija. Epitelne ćelije bronhija i bronhiola, retke alveolarne ćelije, retki hepatociti, epitelne ćelije bubrežnih tubula i zučnih kanalića, retki enterociti i epitelne ćelije tonzila pokazale su pre svega intranuklearno, ređe i intracitoplazmatski lokalizovan signal. U najvećem procentu genom PCV2 utvrđen je komplementarnom probom u limfatičnom tkivu domaćih svinja (86,67%), dok je u limfatičnom tkivu divljih svinja ustanovljeno kod značajno manjeg broja ispitanih jedinki (20,00%), što predstavlja statistički vrlo značajnu razliku. Intenzitet pozitivnog signala u limfatičnom tkivu je varirao. Kod domaćih svinja slab intenzitet pozitivnog signala uočen je kod 16,67%, signal umerenog intenziteta kod 51,67% i signal jakog intenziteta kod 23,33% ispitanih jedinki. Kod divljih svinja je u limfatičnom tkivu ustanovljen slab signal kod 13,33%, signal umerenog intenziteta kod 5,00% i jak signal kod 1,67% ispitanih jedinki. Ovi rezultati govore o postojanju statistički vrlo značajne razlike kod pojavljivanja signala umerenog i jakog intenziteta između domaćih i divljih

svinja. U ostalim organima je genom PCV2 utvrđen u manjem procentu. Kod domaćih svinja komplementarnom probom je genom PCV2 ustanovljen u plućima kod 80,00%, u jetri kod 53,33% i u bubrezima kod 33,33% ispitanih jedinki. Kod divljih svinja prisustvo genoma PCV2 komplementarnom probom ustanovljeno je u plućima kod 13,33%, u jetri kod 10,00% i u bubrezima kod 8,33% ispitanih jedinki.

Sa ciljem da se utvrdi tropizam PCV2 kod domaćih i divljih svinja korišćena je proba hibridizacije *in situ* za replikativnu formu virusa, pri čemu je ustanovljeno da se replikacija spomenutog virusa u najvećem procentu dešava u limfatičnom tkivu i u plućima. Kod domaćih svinja dvolančana DNK PCV2 (replikativna forma) uočena je u limfatičnom tkivu kod 46,67%, u plućima kod 50,00%, u jetri kod 23,33% i u bubrezima kod 13,33% ispitanih jedinki. Kod divljih svinja dvolančana DNK PCV2 uočena je u limfatičnom tkivu kod 6,67%, u plućima kod 5,00% i u jetri i bubrezima kod 3,33% ispitanih jedinki. Čelijska distribucija dvolančane DNK PCV2 bila je takođe šarolika. Probom za replikativnu formu utvrđen je pozitivan signal, koji se ogledao u nalazu precipitata plave boje, u istoj čelijskoj populaciji kao i komplementarnom probu, samo u značajno manjem broju ćelija. Pozitivne ćelije po morfološkim kriterijumima odgovaraju makrofagima, limfocitima, hepatocitima, epitelnim ćelijama bubrežnog parenhima, epitelnim ćelijama bronhija i bronhiola, epitelnim ćelijama kripte tonzila i epitelnim ćelijama creva. Uz pomoć tehnike RFP ISH je dakle potvrđeno da mnoge čelijske populacije ne samo da sadrže nukleinsku kiselinu PCV2, već da se virus u njima aktivno umnožava. Kada upoređujemo nalaze CP ISH probe, koja detektuje tri vrste nukleinske kiseline PCV2 (jednolančana DNK, dvolančana DNK i ORF1 iRNK PCV2), sa nalazima RFP ISH probe, koja detektuje isključivo replikativnu formu PCV2 (dvolančana DNK), očigledno je da mnogo veći broj ćelija sadrži nukleinsku kiselinu PCV2 nego što je ćelija u kojima se vrši i replikacija virusa. Nadalje, dok je replikacija PCV2 zapažena u nizu vrsta ćelija, najbrojnije ćelije u kojima je dokazana velika

količina virusnog genoma bez replikacije uglavnom su makrofage. Međutim, neki retki makrofagi takođe sadrže pozitivni signal poreklom od replikativne forme PCV2, čime je ukazano na mogućnost da se određeni stepen replikacije virusa čak i u njima odigrava u *in vivo* uslovima.

Poreklo velike količine nukleinske kiseline PCV2 u citoplazmi makrofaga, dokazane uz pomoć CP ISH probe, i dalje je nepoznato. Mali broj makrofaga u čijoj citoplazmi je dokazano prisustvo replikujuće forme PCV2, i masovno prisustvo makrofaga sa obilnim citoplazmatskim signalom ukazuje na mogućnost da je obilna pozitivna reakcija rezultat internalizacije slobodnih virusa ili fagocitoze ćelijskog debrisa inficiranog sa PCV2. Činjenica da kod nekih životinja uopšte nije dokazano prisustvo replikujuće forme PCV2, ukazuje na to da se replikacija virusa kod tih jedinki verovatno odigrala u ranijoj fazi infekcije. Ovu hipotezu potvrđuju raniji radovi Yu-a i saradnika (Yu i sar., 2007a,b), u kojima je izneto da postoji jaka korelacija između nivoa DNK i Cap mRNK PCV2 u inficiranom tkivu. Potvrđeno je naime da je najviši nivo Cap mRNK PCV2 (ova ribonukleinska kiselina se stvara prilikom replikacije PCV2) prisutan u limfnim čvorovima između 7. i 14. dana posle veštačke infekcije prasadi, i da su najverovatnije limfociti primarna ćelijska populacija u kojima se virus replikuje. Treba naglasiti da je ovaj period infekcije uglavnom asimptomatska faza, naime dokazano je da za kliničko ispoljavanje PMWS sindroma neophodan inkubacioni period od oko 15 do 30 dana (Kennedy i sar., 2000; Krakowka i sar., 2000). Ispitivanja Yu-a i saradnika su takođe potvrdila da se nagli pad nivoa Cap mRNK dešava nakon 21. dana posle inokulacije virusa, dok je nivo DNK PCV2 i dalje značajno visok (Yu i sar., 2007a,b). Obzirom da su u okviru ovog rada ispitivanja izvršena na leševima domaćih svinja koja su za životom ispoljavala intenzivne kliničke simptome i uznapredovale patomorfološke promene, očekivan je nalaz virusne replikacije u relativno malom broju jedinki. Najveći stepen virusne replikacije se dešava u početnoj fazi bolesti. Kod divljih svinja nemamo podatak o kliničkoj

manifestaciji eventualne bolesti, ali na osnovu starosne strukture ispitanih jedinki, patomorfoloških i patohistoloških promena, zatim IHC i ISH nalaza opravdano pretpostavljamo da se kod najvećeg broja pozitivnih jedinki radi o hroničnoj infekciji. Drugi mogući razlog za mali broj ćelija u kojima je potvrđena virusna replikacija je ograničen broj uzorkovanih tkiva i možda se glavna virusna replikacija vrši u nekom od tkiva koji nisu bili predmet naših ispitivanja. Istraživanja drugih autora koja su izvršena na mnogo raznovrsnijim uzorcima tkiva takođe svedoče o ograničenom broju ćelija u kojima se virus razmnožava (*Perez-Martin i sar., 2007*). S druge strane, mala ćelijska populacija u kojoj se vrši replikacija PCV2 u različitim organima, vremenom može da rezultuje nalazom obilne količine virusa u citoplazmi mnogobrojnih makrofaga kod svinja sa ispoljenim PMWS sindromom (*Darwich i sar., 2004*).

U uzorcima domaćih i divljih svinja nije se zapazilo prisustvo virusnog genoma i *Cap* antigena u endotelnim ćelijama, za razliku od nekih autora koji to opisuju kod domaćih svinja. Oni kao učestali nalaz navode pozitivne endotelne ćelije krvnih sudova gastrointestinalnog trakta i smatraju da taj nalaz ukazuje na rani stadijum infekcije, kao i na mogući put širenja virusa u organizmu (*Perez-Martin i sar., 2007; Yu i sar. 2007a,b*).

Sa ciljem što detaljnije vizuelizacije uzročnika u histopatološkim isečcima ispitanih tkiva, kao što je spomenuto, paralelno su korišćene dve metode. Oba protokola, hibridizacija *in situ* za detekciju genoma PCV2 i imunohistohemija za detekciju *Cap* antigena PCV2, se baziraju na veoma sličnim principima detekcije. Rezultati pokazuju da su obe metode uspešne za detekciju PCV2 u većini uzoraka. ISH (52/60 i 12/60) se pokazala za nijansu osetljivija metoda od IHC (51/60 i 11/16), sa jačim signalom uglavnom u isečcima limfnih čvorova. Dobijeni rezultati ukazuju na veću osetljivost ISH metode u odnosu na IHC metodu u dijagnostici cirkovirusnih infekcija, slična su zapažanja i drugih autora (*Allan i sar., 1998*) koji su upoređivali osetljivost ove dve metode. Manja osetljivost IHC naspram ISH moglo bi se delom objasniti činjenicom da fiksacija

uzoraka u formalinu dovodi do promena u konformacionoj strukturi proteina i stvaranja unakrsnih veza, samim tim i do slabije ekspresije antigenskih epitopa virusa, koji su po svojoj prirodi takođe proteinske molekule. U ova protokola je korišćen proteolitički pretretman, ali je efekat verovatno bio nedovoljan za potpuno otkrivanje proteinskog *Cap* antigena. Optimizovan ISH protokol je dao veoma osetljivu reakciju sa velikom količinom signala poreklom od genoma PCV2, ukazivši na činjenicu da je virusni genom relativno netaknut za vreme fiksacije uzoraka u formalinu. Ovo svojstvo veće osetljivosti ISH naspram IHC može doprineti učestalijoj primeni ove metode u retrospektivnim analizama arhiviranih uzoraka.

Obzirom na izložene rezultate PCR analize, prisustvo histopatoloških lezija na limfatičnom tkivu koji spadaju u grupu II. i III. stepena, zatim nalaza signala imunohistohemijske probe umerenog i jakog intenziteta, kao i prisustva pozitivnog signala komplementarne probe umerenog i jakog intenziteta, ustanovljeno je da od ukupno 100,00% inficiranih domaćih svinja 75,00% boluje od PMWS, kao najčešćeg oblika PCVAD. Kod divljih svinja nisu bili ispunjeni svi kriterijumi za postavljanje dijagnoze po navedenim kriterijumima, obzirom na nedostatak podataka o eventualnoj kliničkoj simptomatologiji, mada je kod određenih mladih odstreljenih divljih svinja prilikom uzorkovanja materijala ustanovljena loša telesna kondicija. Uzevši u obzir rezultate PCR analize, intenzitet histopatoloških lezija na limfatičnom tkivu (II i III), intenzitet imunohistohemijskog signala (umeren i jak) i signala komplementarne probe hibridizacije *in situ* (umeren i jak), i komparativno upoređivanje istih sa nalazima kod domaćih svinja, možemo postaviti opravdanu sumnju da je sistemska forma PCVAD bila prisutna kod četiri ispitane mlade divlje svinje, što iznosi 6,67% od ukupno ispitanih, odnosno 25% od ukupno inficiranih jedinki. Ova razlika u učestalosti pojavljivanja PCVAD kod domaćih i divljih svinja predstavlja statistički vrlo značajnu razliku ($p < 0,01$) i potvrđuje činjenicu da se oboljenja izazvana sa PCV2 kod divljih svinja javljaju mnogo ređe.

Prilikom tumačenja učestalosti pojedinih nalaza treba uzeti u obzir činjenicu da su u okviru ovog rada ispitane divlje svinje koje su bile plen odstrela a ne odabirane po nekim unapred utvrđenim kriterijumima, za razliku od domaćih svinja gde su jedinke za dalja ispitivanja odabirana na osnovu kliničkih simptoma od značaja za PMWS sindrom. Obzirom da lovci love veliki plen, većina ispitivanih divljih svinja su bile odrasle jedinke, a u manjem broju mlađe jedinke koje su podložnije manifestaciji ove bolesti (*Vicente i sar., 2004; Lipej i sar., 2007; Petrini i sar., 2009; Reiner i sar., 2010, 2011*). Takođe, verovatno se u većini slučajeva radilo o klinički zdravim jedinkama, te procenat od 26,67% inficiranih u ukupnom broju ispitanih treba uzeti sa rezervom. Iz opisanih nalaza ipak možemo zaključiti da su divlje svinje na području Severno-bačkog okruga Republike Srbije u značajnom procentu inficirane. Samim tim divlje svinje predstavljaju rezervoare PCV2, i mogu biti potencijalni izvor infekcije za domaće svinje, obzirom na mestimični tradicionalni način ekstenzivnog uzgoja, u kom slučaju je omogućen kontak između domaćih i divljih svinja. Slična je epizootiološka situacija i u zemljama u okruženju, o čemu svedoče radovi autora iz okruženja (*Lipej i sar., 2007; Petrini i sar., 2009*). Iz razloga što divlje svinje žive uglavnom slobodno u prirodi, dijagnostika ne samo cirkovirusnih već i ostalih oboljenja je kod njih veoma otežana. Borba protiv bolesti i profilaksa kod domaćih svinja zasniva se na principu *sve unutra i sve napolje*, striktnoj primeni higijene, i strogim zootehničkim merama, što je neprimenjivo u prirodnim, otvorenim lovištima gde se najveći broj divljih svinja u našoj zemlji nalazi. Neophodna su dalja ispitivanja za bolje razumevanje epizootiologije i patogeneze cirkovirusnih infekcija divljih svinja. Potrebno je ispitati sve starosne kategorije, sa posebnim osvrtom na podmladak, kao najprijemčiviju kategoriju za PMWS sindrom.

Distribucija histopatoloških lezija i ustanovljena imunoreaktivnost sugerišu da PCV2 u prirodnim uslovima ulazi u organizam svinja preko oronazalne sluznice, da se umnožava u tonzilama i regionalnim limfnim

čvorovima, i da sistemska diseminacija ide u druga limfatična tkiva i nelimfatične organe, pluća, jetru i bubrege. U hroničnim slučajevima, kao posledica izrazite imunosupresije, nastaju intersticijalne i komplikovane pneumonije, enteritisi, poliserozitis, nefritisi, fibroza jetre i dr. Možemo zaključiti da veza između specifičnog signala poreklom od PCV2 i postojanja karakteristične tkivne lezije, pre svega u limfatičnom tkivu, upućuje na direktnu ulogu virusa u patogenezi uočenih promena. Iako je najučestalija tkivna lezija PCVAD oboljenja dokazana u najvećem broju ispitanih uzoraka, interakcija ćelije i virusa i uloga udruženih infekcija u patogenezi ovog specifičnog oboljenja u budućnosti mora biti detaljno ispitana.

Korišćenjem PCR tehnike, histopatološkog pregleda, imunohistohemijske analize i hibridizacije *in situ*, dokazano je prisustvo oboljenja PCVAD u populacijama domaćih svinja. Takođe, po prvi put, utvrđeno je sa se oboljenja PCVAD javljaju i u populaciji divljih svinja na teritoriji Republike Srbije. Dobijeni rezultati svedoče o prisustvu oboljenja domaćih i divljih svinja prouzrokovanih cirkovirusom svinja 2, na podneblju Severno-bačkog okruga, što potvrđuje ranije nalaze, koji su ukazivali na prisustvo cirkovirusnih infekcija svinja u našoj zemlji (*Toplak i sar., 2003; Ivetić i sar., 2002, 2003, 2004; Becskei i sar., 2010*).

Nagoveštaji su takvi da se uz pomoć pristupačnih vakcina u kombinaciji sa dobrim menadžmentom u značajnoj meri može smanjiti negativni uticaj PCVAD oboljenja na proizvodne rezultate svinjarske proizvodnje, mada, i dalje ostaje nepoznato u kom smeru će vakcinacija i promene u proizvodnji potisnuti evoluciju PCV2 u populaciji svinja, samim tim i uspešnost trenutno korišćenih vakcina. Novija saznanja nam ukazuju na tendenciju rasta razlika u virulenciji pojedinih izolata PCV2. Te razlike možda skrivaju odgovore na pitanje zašto ima više oblika kliničke manifestacije PCVAD oboljenja, i možda će uticati na proizvodnju novih vakcina. Pretpostavka da su različiti izolati PCV2 odgovorni za razvoj različitih kliničkih oblika PCVAD oboljenja do danas nije sa

sigurnošću potvrđena. Naime, opravdana je sumnja da bi samo virulencija određenog PCV2 mogla da objasni veliku lepezu kliničkih manifestacija PCVAD oboljenja na nivou zapata, regiona, ili čak po celom svetu (*Opriessnig i sar., 2007*).



7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu izvedeni su sledeći zaključci:

1. Primenom PCR analize infekcija sa PCV2 ustanovljena je kod domaćih svinja poreklom sa svih osam ispitanih farmi i kod divljih svinja poreklom sa oba ispitana lovišta.
2. Infekcija sa PCV2 utvrđena je kod značajno većeg broja ($p < 0.01$) domaćih svinja (100,00%) u odnosu na divlje svinje (26,67%).
3. Uz pomoć makroskopskog pregleda, histopatološke analize, imunohisto-hemijske pretrage i hibridizacije *in situ* ustanovljeno je da 75,00% ispitanih domaćih svinja i 6,67% ispitanih divljih svinja ($p < 0.01$) boluje od sistemskog oblika PCVAD.
4. Nije utvrđeno prisustvo patognomoničnih makroskopskih promena kod domaćih i divljih svinja obolelih od sistemskog oblika PCVAD.
5. Najznačajnija histopatološka promena je folikularna i parafolikularna deplecija limfocita umerenog i jakog intenziteta u limfatičnim organima (limfnim čvorovima, tonzilama, slezini, Pajеровim pločama i ileocekalnoj valvuli) obolelih svinja.
6. Deplecija limfocita je glavni razlog za imunosupresiju kod domaćih i divljih svinja obolelih od sistemskog oblika PCVAD.
7. Osnovnu histopatološku leziju u nelimfatičnim organima (pluća, jetra, bubrezi i srce) domaćih i divljih svinja obolelih od sistemskog oblika

PCVAD predstavlja fokalni i multifokalni infiltrat sastavljen od makrofaga, limfocita i plazma ćelija.

8. U limfatičnim organima domaćih i divljih svinja obolelih od sistemskog oblika PCVAD prisutni su infektivni granulomi.
9. Velika količina DNK i *Cap* antigena PCV2 kod domaćih i divljih svinja prisutna je u ćelijama monocitno/makrofagnog sistema uključujući tkivne makrofage, APC, dendritične ćelije i alveolarne makrofage.
10. Ćelije limfnih čvorova, tonzila, slezine, Pajerovih ploča, ileocekalne valvule, pluća, jetre i bubrega sadrže DNK i *Cap* antigen PCV2; pri čemu limfatično tkivo pokazuje najintenzivniju imunopozitivnost.
11. Utvrđeno je da PCV2 pokazuje tropizam prema limfocitima, makrofagima, alveolarnim epitelnim ćelijama, epitelnim ćelijama bronhija i bronhiola, epitelnim ćelijama bubrežnih tubula, epitelnim ćelijama tonzila, hepatocitima, epitelnim ćelijama žučnih kanalića i enterocitima.



8. POPIS LITERATURE

1. *Albina E., Truong C., Hutet E., Blanchard P., Cariolet R., L'hospitalier R., Mahe D., Allen C., Moroan H., Amenna N., Dimna Le M., Madec F., Jestin A., 2001, An Experimental Model for Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Growing Piglets, J Comp Pathol, 125, 292-303.*
2. *Allan G.M., Ellis J.A., 2000, Porcine circoviruses: A review, J Vet Diagn Invest, 12, 3-14.*
3. *Allan G.M., McNeilly F.J., Cassidy P., Reilly G.A., Adair B., Ellis W.A., McNulty M.S., 1995, Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. Vet Microbiol, 44, 49-64.*
4. *Allan G.M., McNeilly F., Kennedy S., Daft B., Clark E.G., Ellis J.A., 1998, Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe, J Vet Diagn Invest, 10, 3-10.*
5. *Allan G.M., McNeilly F., Kennedy S., Meehan B., Ellis J., Krakowka S., 2000, Immunostimulation, PCV2 and PMWS, Vet Rec, 147, 170-171.*
6. *Allan G.M., McNeilly F., Meehan B.M., Kennedy S., Mackie D.P., Ellis J.A., Clark G.E., Espuna E., Saubi N., Riera P., Botner A., 1999, Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndrome in Spain, Denmark and Northern Ireland, Vet Microbiol, 66, 115-123.*
7. *Balasz M., Segales J., Rosell C., Domingo M., Mankertz A., Urniza A., Duran J., 1999, Experimental Inoculation of Conventional Pigs with Tissue*



Homogenates from Pigs with Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome, *J Comp Pathol*, 121, 139-148.

8. Batista I., 2006, Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Quebec, is an emerging disease? In: *Proceedings of the 37th annual meeting of the American Association of Swine Practicioners*, p 383-385.
9. Bálint Á., Tenk M., Deim Z., Rasmussen B.T., Uttenthal A., Cságola A., Tuboly T., Farsang A., Fossum C., Timmusk S., Berg Mikael, Belák S., 2009, Development of primer probe energy transfet real time PCR for the detection and quantification of porcine circovirus type 2, *Acta Vet Hung*, 57, 441-452.
10. Becskei Zs., Aleksić-Kovačević Sanja, Rusvai M., Balka Gy., Jakab Cs., Petrović T., Knežević Milijana, 2010, Distribution of porcine circovirus type 2 Cap antigen in the lymphoid tissue of pigs affected by postweaning multisystemic wasting syndrome, *Acta Vet Hung*, 58, 483-498.
11. Blanchard P., Mahé D., Cariolet R., Keranflec'h A., Baudouard A.M., Cordioli P., Albina E., Jestin A., 2003, Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting, *Vaccine*, 21, 4565-4575.
12. Brounborg M.I., Moldal T., Jonassen M.C., 2004, Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum\plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using TaqMan based real time PCR, *J Virol Methods*, 122, 171-178.
13. Cadar D., Cságola A., Deim Z., Spinu M., Miclaus V., Köbölkuti L., Czirják G., Tuboly T., 2007, Porcine circovirus type 2 and associated diseases in Romania – Short communication, *Acta Vet Hung*, 55, 151-156.
14. Carrasco L., Segales J., Bautista M.J., Gomez-Willamandos J.C., Rosell C., Ruiz-Villamor E., Sierra M.A., 2000, Intestinal chlamidial infection concurrent with postveaning multisystemic wasting syndrome in pigs, *Vet Rec*, 146, 21-23.



15. *Chae C.*, 2004, Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology, *Vet J*, 168, 41-49.
16. *Chae C.*, 2005, A review of porcine circovirus 2 associated syndromes and diseases, *Vet J*, 169, 326-336.
17. *Chang H.W., Jeng C.R., Liu J.J., Tsang L.L., Chang C.C., Chia Y.M., Tsai Y.C., Pang F.V.*, 2005, Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha, *Vet Microbiol*, 108, 167-177.
18. *Chang H.W., Jeng C.R., Lin T.L., Liu J.J., Tang C.M., Tsai Y.C., Chia Y.M., Jan T.R., Pang F.V.*, 2006, Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation, *Vet Immunol Immunop*, 110, 207-219.
19. *Cheng C.C., Lee Y.F., Lin N.N., Wu C.L., Tung K.C., Chiu Y.T.*, 2011, Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia in Swine associated with porcine circovirus type 2 infection, *J Biomed Biotechnol*, 245728.
20. *Cheon D.S., Chae C.*, 1999, Distribution of a Korean strain of porcine respiratory and reproductive syndrome virus in experimentally infected pigs, as demonstrated immunohistochemically and by in-situ hybridisation, *J Comp Pathol*, 120, 79-88.
21. *Cheung A.K.*, 2003, Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses, *Virology*, 310, 41-49.
22. *Chianini F., Majo N., Segales J., Dominguez J., Domingo M.*, 2001, Immunohistological study of the immune system cells in paraffin-embedded tissues of conventional pigs, *Vet Immunol Immunop*, 82, 245-255.
23. *Chianini F., Majo N., Segales J., Domínguez J., Domingo M.*, 2003, Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in



- lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), *Vet Immunol Immunop*, 94, 63-75.
24. Choi C., Chae C., 1999, In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome, *J Comp Pathol*, 121, 265-270
 25. Choi C., Chae C., Clark E.G., 2000, Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunocitochemistry and polymerase chain reaction, *J Vet Diagn Invest*, 12, 151-153.
 26. Choi C., Kim J., Kang I.J., Chae C., 2002, Concurrent outbreak of PMWS and PDNS in a herd of pig in Korea, *Vet Rec*, 151, 484-485.
 27. Cino-Ozuna A.G., Henry S., Hesse R., Nietfeld J.C., Bai J., Scott H.M., Rowland R.R., 2011, Characterization of a new disease syndrome associated with porcine circovirus type 2 in previously vaccinated herds, *J Clin Microbiol*, 49, 5.
 28. Clark E.G., 1996, Pathology of the post-weaning multisystemic wasting syndrome of pigs, *Porc West Canad Ass Swine Pract*, 22-25.
 29. Clark E.G., 1997, Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, *Porc Am Ass Swine Pract*, 28, 499-501.
 30. Crowther R.A., Berriman J.A., Curran W.L., Allan G.M., Todd D., 2003, Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus, *J Virol*, 77, 13036-13041.
 31. Cságola A., Cadar D., Tuboly T., 2008a, Replication and transmission of porcine circovirus type 2 in mice, *Acta Vet Hung*, 56, 421-427.



32. Cságola A., Kecskemeti S., Kardos G., Kiss I., Tuboly T., 2006, Genetic characterisation of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars, *Arch Virol*, 151, 495-507.
33. Cságola A., Kiss I., Tuboly T., 2008b, Detection and analysis of porcine circovirus type 1 in Hungarian wild boars: Short communication, *Acta Vet Hung*, 56, 139-144.
34. Darwich L., Balasch M., Plana-Duran J., Segales J., Domingo M., Mateu E., 2003a, Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens, *J Gen Virol*, 84, 3453-3457.
35. Darwich L., Pie S., Rovira A., Segales J., Domingo M., Oswald I.P., Mateu E., 2003b, Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome, *J Gen Virol*, 84, 2117-2125.
36. Darwich L., Segales J., Domingo M., Mateu E., 2002, Changes in CD4(+), CD8(+) and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues, *Clin Diagn Lab Immun*, 9, 236-242.
37. Darwich L., Segales J., Mateu E., 2004, Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle, *Arch Virol*, 149, 857-874.
38. Ellis J., Clark E., Haines D., West K., Krakowka S., Kennedy S., Allan M.G., 2004, Porcine circovirus 2 and concurrent coinfections in the field, *Vet Microbiol*, 98, 159-163.
39. Ellis J., Hassard L., Clark E., Harding J., Allan M.G., Willson P., Strokappe J., Martin K., McNeilly F., Meehan B., Todd D., Haines D., 1998, Isolation of



circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome, *Can Vet J*, 39, 44-51.

40. Ellis J., Spinato M., Yong C., West K., McNeilly K., Meehan B., Kennedy S., Clark E., Krakowka S., Allan M.G., 2003, Porcine circovirus 2 associated disease in Eurasian wild boar, *J Vet Diagn Invest*, 15, 364-368.
41. Fan H., Ye Y., Luo Y., Tong T., Yan G., Liao M., 2012, Quantitative proteomics using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) reveals protein and pathway regulation in porcine circovirus type 2 infected PK-15 cells, *J Proteome Res*, 11, 995-1008.
42. Farnham M.W., Halbur P.G., Choy C., Goyal S.M., Joo H.S., 2003, Isolation and characterisation of porcine circovirus type-2 from sera of stillborn fetuses, *Can J Vet Res*, 67, 108-113.
43. Fenaux M., Halbur P.G., Gill M., Toth T.E., Meng X.J., 2000, Genetic characterisation of type 2 porcine circovirus (PCV₂) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2, *J Clin Microbiol*, 38, 2494-2503.
44. Fenaux M., Opriessnig T., Halbur P.G., Xu Y., Potts B., Meng X.J., 2004, Detection and in vitro and in vivo characterisation of porcine circovirus DNA from a porcine derived commercial pepsin product, *J Gen Virol*, 85, 3377-3382.
45. Fenaux M., Opriessnig T., Halbur P.G., Elvinger F., Meng X.J., 2004, Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV₂) enhanced PCV₂ replication in vitro and attenuated the virus in vivo, *J Virol*, 78, 13440-13446.



46. Finsterbusch T., Steinfeldt T., Caliskan R, Mankertz A., 2005, Analysis of the subcelular localisation of the proteins Rep, Rep' and Cap of porcine circovirus type 1, *Virology*, 5, 36-46.
47. Gagnon A.C., del Castillo J.R., Music N., Fontaine G., Tremblay D., 2008, Development and use of a multiplex realtime quantitative polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of Porcine circovirus 2 genotypes 2a and 2b in an epidemiological survey, *J Vet Diagn Invest*, 20, 545-558.
48. Gagnon A.C., Music N., Fontaine G., Tremblay D., Harel J., 2010, Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): A type 1 and type 2 PCV recombinant, *Vet Microbiol*, 114, 18-23.
49. Galindo-Cardiel I., Grau-Roma L., Pérez-Maillo M., Segalés J., 2011, Characterization of necrotizing lymphadenitis associated with porcine circovirus type 2 infection. *J Comp Pathol*, 144, 63-69.
50. Gibbs M.J., Weiller G.F., 1999, Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 8022-8027.
51. Gortazar C., 2004, Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*), *Vet Res*, 35, 243-253.
52. Grau-Roma Lorence and Joaquim Segales, 2007, Detection of porcine respiratory and reproductive virus, porcine circovirus type 2, swine influenza and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotising pneumonia (PNP) in Spain, *Vet Microbiol*, 119, 144-151.
53. Gresham A., Allan M.G., McNeilly F., Kennedy S., 2001, Links between post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis nephropathy syndrome, *The Pig Journal*, 47, 155-159.



54. Grierson S.S., King P.D., Sandvik T., Hicks D., Spencer Y., Drew W.T., Banks M., 2004, Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK, *Arch Virol*, 149, 1171-1183.
55. Guo L., Lu Y., Wei Y., Huang L., Wu H., Liu C., 2011, Porcine circovirus genotype 2a (PCV2a) and genotype 2b (PCV2b) recombinant mutants showed significantly enhanced viral replication and altered antigenicity in vitro, *Virology*, 419, 57-63.
56. Halbur P.G., Paul P.S., Frey M.L., Landgraf J., Eernisse K., Meng X.J., Andrews J.J., Lum M.A., Rathje J.A., 1996, Comparison of the antigen distribution of two USA porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus, *Vet Pathol*, 33, 159-170.
57. Hamel A.L., Lin L.L., Nayar G.P., 1998, Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs, *J Virol*, 72, 5262-5267.
58. Hamel A.L., Lin L.L., Sachive C., Grudeski E., Nayara G.P.S., 2000, PCR detection and characterisation of type-2 porcine circovirus, *Can J Vet Res*, 64, 44-52.
59. Hansen M.S., Pors S.E., Jensen H.E., Bille-Hansen V., Bisgaard M., Flachs E.M., Nielsen O.L., 2010, An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark, *J Comp Pathol*, 143, 120-131.
60. Harding J.C.S., 2004, The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2, *Vet Microbiol*, 98, 131-135.
61. Harding C.S.J., 1997, Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation, *Porc Am Assoc Swine Pract*, 28, 503.



62. *Harding J.C.S.*, 1996, Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation, *Porc West Can Assoc Swine Pract*, 21.
63. *Harding J.C.S. and Clark E.G.*, 1997, Recognising and diagnosing post-weaning multisystemic wasting syndrome, *Swine Health Prod.*, 5, 201-203.
64. *Harding J.C.S., Clark E.G., Strokappe J.H., Willson P.I., Ellis J.A.*, 1998, Post-weaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation, *Swine Health Prod*, 6, 249-254.
65. *Harms P.A.*, 1999, Post weaning multisystemic wasting syndrome-case studies, In: *Proceedings of the Seventh Annual Iowa Swine Disease Conference on Swine Practicioners*, pp. 43-47.
66. *Harms P.A., Halbur P.G., Sorden S.D.*, 2002, Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection, *J Swine Health Prod*, 10, 27-30.
67. *Hoogland M.J., Opriessnig T., Halbur P.G.*, 2006, Effects of adjuvants on porcine circovirus type 2 associated lesions, *J Swine Health Prod*, 14, 133-139.
68. *Ivetić V., Savić B., Valter D.*, 2004, Multisistemiški sindrom kržljanja prasadi posle odlučanja (PMWS)-jedan od oblika cirkovirusne infekcije, *Veterinarski glasnik*, 58, 3-4, 419-431.
69. *Ivetić V., Valter D., Milošević B.*, 2002, Cirkovirusne infekcije svinja, *Veterinarski glasnik*, 56, 1-2, 33-40.
70. *Ivetić V., Valter D., Milošević B.*, 2003, Multisistemiški sindrom kržljanja prasadi posle odlučanja (PMWS) - naša prva klinička i patomorfološka iskustva, *Veterinarski žurnal Republike Srpske*, 3, 1-2, 90-91.
71. *Jacobsen B., Krueger L., Seeliger F., Bruegmann M., Segalés J., Baumgaertner W.*, 2009, Retrospective study on the occurrence of



porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany, *Vet Microbiol*, 138, 27-33.

72. Kennedy S., Mofett D., McNeilly F., Meehan B., Ellis J., Krakowka S., Allan G.M., 2000, Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus, *J Comp Pathol*, 122, 9-24.
73. Kiatipattanasakul Banlunara W., Tantilertcharoen R., Suzuki K., Albarenque S.M., Thanawongnuwec R., Nakayama R., Doi K., 2002, Detection of porcine circovirus 2 (PCV2) DNA by Nested PCR from Formalin Fixed Tissues of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) Pigs in Thailand, *J Vet Med Sci*, 64, 449-452.
74. Kim J. and Chae C., 2001, Differentiation of porcine circovirus 1 and 2 in formalin-fixed, paraffin-wax-embedded tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by in-situ hybridisation, *Res Vet Sci*, 70, 265-269.
75. Kim J. and Chae C., 2003, Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 But Not Interleukin-8 in Granulomatous Lesions in Lymph Nodes from Pigs with Naturally Occurring Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, *Vet Pathol*, 40, 181-186.
76. Kim J., Choi C., Chae C., 2003a, Pathogenesis of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome Reproduced by co-infection with Korean Isolates of Porcine Circovirus 2 and Porcine Parvovirus, *J Comp Path*, 128, 52-59.
77. Kim J., Chung H.K., Chae C., 2003b, Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex, *Vet J*, 166, 251-256.
78. Kim J., Chung H.K., Cho W.S., Choi C., Chae C., 2002, Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: Prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms, *J Vet Med Sci*, 64, 57-62.



79. Kim J., Ha Y., Jung K., Choi C., Chae C., 2004, Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs, *Can J Vet Res*, 68, 218-221.
80. Kim J., Han D.U., Choi C., Chae C., 2001, Differentiation of porcine circovirus type 1 (PCV1) and PCV2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction, *J Virol Methods*, 98, 25-31.
81. Kim J., Han D.U., Choi C., Chae C., 2003c, Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction, *J Vet Med Sci*, 65, 741-744.
82. Kiss I., Kecskeméti S., Tuboly T., Bajmoci E., Tanyi J., 2000, New pig disease in Hungary: postweaning multisystelic wasting syndrome caused by circovirus, *Acta Vet Hung*, 48, 469-475.
83. Kiupel M., Stevenson G. V., Kanitz C.L., Anothayanontha L., Latimer K. S., Mittal S. K., 1999, Cellular localisation of porcine circovirus in post-weaning pigs with chronic wasting disease, *Eur J Vet Pathol*, 5, 77-82.
84. Kiupel M., Stevenson G.W., Mittal S.K., Clark E.G., Haines D.M., 1998, Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana, *Vet Pathol*, 35, 303-307.
85. Kixmoller M., Ritzmann M., Eddicks M., Saalmuller A., Elbers K., Fachinger V., 2008, Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2, *Vaccine*, 26, 3443-3451.
86. Knell S., Willems H., Hertrampf B., Reiner G., 2005a, Comparative, genetic characterization of porcine circovirus type 2 samples from German wild boar populations, *Vet Microbiol*, 109, 169-177.
87. Knell S., Willems H., Hertrampf B., Reiner G., 2005b, Prävalenzen porziner Circoviren in ausgewählten deutschen Wildschwein populationen, *Tieraerztl Prax*, 33, 247-253.
88. Knowles N., Spyrou V., 2008, Detection and genetic characterization of porcine circovirus 2 isolates from the first cases of postweaning



multisystemic and wasting syndrome in wild boars in Greece, *J Wildlife Dis*, 44, 864-870.

89. Krakowka S., Allan M.G., Ellis J., Hamberg A., Charreyre C., Kaufman E., Brooks C., Meehan B., 2012, A nine-base nucleotide sequence in the porcine circovirus type 2 (PCV2) nucleocapsid gene determines viral replication and virulence, *Virus Res*, 164, 90-99.
90. Krakowka S., Ellis A.J., McNeilly F., Gilipin D., Meehan B., Mc Kullough K., Allan M.G., 2002, Immunologic feature of porcine circovirus type 2 infection, *Viral Immunol*, 15, 567-582.
91. Krakowka S., Ellis J.A., McNeilly F., Meehan B., Oglesbee M., Alldinger S., Allan M.G., 2004, Features of Cell Degeneration and Death in Hepatic Failure and Systemic Lymphoid Depletion Characteristic of Porcine Circovirus-2 associated Postweaning Multisystemic Wasting Disease, *Vet Pathol*, 41, 471-481.
92. Krakowka S., Ellis J.A., McNeilly F., Meehan B., Rings D.M., McCullough K., Botner A., Nauwynck H., Charreyere C., Allan M.G., 2003, The pathogenesis of PCV2 associated post-weaning multisystemic wasting syndrome in swine, In: *Proceedings of the 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Rome*, pp. 143-147.
93. Krakowka S., Ellis J.A., McNeilly F., Ringer S., Rings D.M., Allan M.G., 2001, Activation of the immune system in pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV2), *Vet Pathol*, 38, 31-42.
94. Krakowka S., Ellis J.A., Meehan B., Kennedy S., McNeilly F., Allan M.G., 2000, Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus, *Vet Pathol*, 37, 254-263.



95. Kyriakis C.S., Saoulidis K., Lekkas S., Miliotis C., Papoutsis A.P. Kennedy S., 2002, The effect of Immuno modulation on the clinical and Pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome, *J Comp Pathol*, 126, 38-46.
96. Ladekjaer-Mikkelsen A. S., Nielsen J., Storgaard T., Botner A, Allan M.G., Mc Neilly F., 2001a, A filed case of transplacental infection with reproductive failure, *Vet Rec* 148, 759-760.
97. Ladekjaer-Mikkelsen A. S., Stadejek T., Storgaard T., Nielsen J., Allan M.G., Botner A., 2001b, Post-weaning multisystemic wasting sindrome: quantification of porcine circovirus load by real-time PCR, In: *Proceedings of the Symposium on ssDNA Viruses of Plants, Birds, Pigs and Primates, Saint Malo, France, p.101.*
98. Langhor I.M., Stevenson W.G., Nelson A.E., Lenz D.S., HogenEsch H., Wei H., Pogranichniy M.R, 2010, Vascular Lesions in Pigs experimentally Infected With Porcine Circovirus Type 2 Serogroup B, *Vet Pathol*, 47, 140-147.
99. Larochelle R., Bielanski A., Muller P, Magar R., 2000, PCR Detection and Evidence of Shedding of Porcine Circovirus Type 2 in Boar Semen, *J Clin Microbiol*, 38, 4629-4632.
100. Larochelle R, Magar R., Dallaire Sylvie, 2002, Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions, *Virus Res*, 90, 101-112.
101. Li W., Wang X., Ma T., Feng Z., Li Y., Jiang P., 2010, Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains isolated between 2001 and 2009: genotype PCV2b predominate in postweaning multisystemic wasting syndrome occurances in eastern China, *Virus Genes*, 40, 244-251.
102. Lipej Z., Šoštarić B., Toplak I., 2002, Nova bolest u Hrvatskoj: Sindrom kržljanja odbite prasadi (SKOP), *Znanstveno stručno savjetovanje s*



međunarodnim sudjelovanjem, Zbornik, Rovinj, 17.-20. listopada 2002, 19-21.

103. Lipej Z., Segales J., Jemersic L., Olvera A., Roic B., Novosel D., Mihaljevic Ž., Manojlovic L., 2007, First description of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in wild boar (*Sus scrofa*) in Croatia and phylogenetic analysis of partial PCV2 sequences, *Acta Vet Hung*, 55, 389-404.
104. Liu J., Chen I., Du Q., Chua H., Keang J., 2006, The ORF3 Protein of Porcine Circovirus Type 2 Is Involved in Viral Pathogenesis In Vivo, *J Virol*, 80, 5065-5073.
105. Liu J., Chen I., Kwang J., 2005, Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis, *J Virol*, 79, 8262-8274.
106. Liu Q., Tikoo S.K., Babiuk L.A., 2001, Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2, *Virology*, 285, 91-99.
107. Lohse Lousie, Botner Anette, Ladekjaer S.A., Frederiksen Tina, Dupont Kitt, Christensen S. Charlotte, Baekbo P., Nielsen J., 2008, Examination for viral cofactor in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), *Vet Microbiol*, 129, 97-107.
108. Lukert P.D., de Boer G.F., Dale J.L., Keese P., McNulty M.S., Randles J.W., Tisher I., 1995, The circoviridae., In: Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, Wien, New York, pp. 166-168.*
109. Madec F., Eveno E., Morvan P., Hamon L., Blanchard P., Cariolet R., Amenna N., Morvan H., Truong C., Mahe D., Albina E., Jestin A., 2000, Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France:



clinical observations from follow-up studies on affected farms, *Livest Prod Sci*, 63, 223-233.

110. Madson D.M., Patterson A.R., Ramamoorthy S., Pal N., Meng X.J., Opriessnig T., 2009, Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2, *Vet Pathol*, 46, 707-716.
111. Magar R., Larochelle R., Thibault S., Lamontagne L., 2000, Experimental Transmission of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) in Weaned Pigs: a Sequential Study, *J Comp Pathol*, 123, 258-269.
112. Mahe D., Blanchard P., Troung C., Arnauld C., Lee Cann P., Cariolet R. Madec F., Albina E., Jestin A., 2000, Differentia sl Recognition of ORF2 proteiin from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes, *J Gen Virol*, 81, 1815-1824.
113. Mandrioli L., Sarli G., Panarese S., Baldoni S., Marcato S.P., 2004, Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), *Vet Immun Immunop*, 97, 25-37.
114. Mandrioli L., Sarli M., Zengarini M., Panarese S., Marcato S.P., 2006, Immunohistochemical MHC-II and Interleukin 2-R (CD25) Expression in Lymph Nodes of Pigs with Spontaneous Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS), *Vet Pathol*, 43, 993-997.
115. Mankertz A., Domingo M., Folch J.M., LeCann P., Jestin A., Segales J., Chmielewicz B., Plana-Duran J., Soike D., 2000, Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France, *Virus Res*, 66, 65-77.
116. Mankertz A., Persson F., Mankertz J., Blaess G., Buhk H.J., 1997, Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus, *J Virol*, 71, 2562-2566.



117. Martinez J., Segales J., Aduriz G., Atxarendio R., Jaro P., Ortega J., Peris B., Corpa M.J., 2006, Pathological and aetiological studies of multifocal interstitial nephritis in wasted pigs at slaughter, *Res Vet Sci*, 81, 92-98.
118. Mateusen B., Sanchez E.R., Van Soom A., Meerts P., Maes D.G.D., Nauwynck J.H., 2004, Susceptibility of pig embryos to porcine circovirus type 2 infection, *Theriogenology*, 61, 91-101.
119. McIntosh K.A., Harding J.S.C., Parker S., Ellis A.J., Appleyard G.D., 2006, Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars, *J Vet Diagn Invest*, 18, 380-384.
120. McNeilly F., Allan G.M., Foster J.C., Adair B.M., McNulty M.S., Pollock J., 1996, Effect of porcine circovirus infection on porcine alveolar macrophage function, *Vet Immunol Immunop*, 49, 295-306.
121. Meehan B.M., Creelan J.L., McNulty M.S., Todd D., 1997, Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses, *J Genl Virol*, 78, 221-227.
122. Meehan B.M., McNeilly F., McNair I., Walker I., Ellis J.A., Krakowka S., Allan M.G., 2001, Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome, *Arch Virol*, 146, 835-842.
123. Meehan B.M., McNeilly F., Todd D., Kennedy S., Jewhurst V.A., Ellis J.A., Hassard L.E., Clark E.G., Haines D.M., Allan G.M., 1998, Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs, *J Gen Virol*, 79, 2171-2179.
124. Molnár T., Glávits R., Szeredi L., Dán Á., 2007, Occurrence of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Hungary, *Acta Vet Hung*, 50, 5-16.



125. Mori M., Sato K., Akachi S., Asahi S., Taniguchi S., Narita M., 2002, Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection in Japan: seven cases in 1989, *Vet Pathol*, 37, 667-669.
126. Nawagitgul P., Morozov I., Bolin S.R., Harms P.A., Sorden S.D., Paul P.S., 2000, Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein, *J Gen Virol*, 2000, 81, 2281-2287.
127. Niagro F.D., Forsthoefel A.N., Lawther R.P., Kamalanathan L., Ritchie B.W., Latimer K.S., Lukert P.D., 1998, Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses, *Arch Virol*, 143, 1723-1744.
128. Nielsen J., Vincent I.E., Botner A., Ladekaer-Mikkelsen A.S., Allan M.G., Summerfield A., McCullough K.C., 2003, Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), *Vet Immunol Immunop*, 92, 97-111.
129. O'Connor B., Gauvreau H., West K., Bogdan J., Ayroud M., Clark E.G., Konoby C., Allan M.G., Ellis J.A., 2001, Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit, *Can Vet J*, 42, 551-553.
130. Olvera A., Cortey M., Segales J., 2007, Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality, *Virology*, 357, 175-185.
131. Opriessnig T., Janke H.B., Halbur G.P., 2006, Cardiovascular Lesions in Pigs Naturally or Experimentally Infected with Porcine Circovirus Type 2, *J Comp Pathol*, 134, 105-110.
132. Opriessnig T., Patterson A.R., Elsener J., Meng J.X., Halbur G.P., 2008, Influence of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on efficacy of PCV2 vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2, *Clin Vaccine Immunol*, 15, 397-401.



133. *Opriessnig T., Meng J.X., Halbur G.P., 2007, Porcine circovirus type 2 associated disease: Update on current terminology, clinical manifestation, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies, J Vet Diagn Invest, 19, 591-615.*
134. *Pallers F.J., Halbur P.G., Opriessnig T., Sorden S.D., Villar D., Janke B.H., Jaeger M.J., Larson D.J., Schwartz K.J., Yoon K.J., Hoffman L.J., 2002, Porcine circovirus type 2 (PCV2) coinfections in US filed cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), J Vet Diagn Invest, 14, 515-519.*
135. *Park J.S., Kim J., Ha Y., Jung K., Choi C., Lim,S., Kim H., Chae C., 2005, Birth Abnormalities in Pregnant Sows Infected Intranasally with Porcine Circovirus 2, J Comp Path, 132, 139-144.*
136. *Pensaert B.M., Sanchez E. R., Ladekjær-Mikkelsen A.S., Allan M.G., Nauwynck J.H., 2004, Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection, Vet Microbiol, 98, 175-183.*
137. *Perez-Martin E., Rovira A., Calsamiglia M., Mankertz A., Rodriguez F., Segales J., 2007, A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed, paraffin embedded swine tissues, J Virol Methods, 146, 86-95.*
138. *Petrini S., Barocci S., Gavaudan S., Villa R., Briscolini S., Sabbatini M., Mattozzi C., Barchiesi S., Salamida S., Ferrari M., Paniccià M., Pezzotti G., 2009, Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) from wild boars in central Italy, E J Wildlife Res, 55, 465.*
139. *Podgórska Katarzyna and Stadejek Thomas, 2011, Profiles of seroconversion to porcine circovirus type 2 in herds affected and not affected by Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, Acta Vet Hung, 59, 511-520.*



140. Quintana, J., Segalés, J., Calsamiglia, M., Domingo, M., 2006, Detection of porcine circovirus type 1 in commercial pig vaccines using polymerase chain reaction, *Vet J*, 171, 570-573.
141. Ramirez A., Wang C., Prickett R.J., Pogradichny R., Yoon J.K., Main R., Johnson K.J., Hoogladn M., Hoffmann P., Kurtz A., Kurtz E., Zimmerman J., 2012, Efficient surveillance of pig populations using oral fluids, *Preventive Veterinary Medicine*, 104, 292-300.
142. Reiner G., Bronnert B., Hohloch C., Fresen C., Haack I., Willems H., Reinacher M., 2010, Qualitative and quantitative distribution of PCV2 in wild boars and domestic pigs in Germany, *Vet Microbiol*, 145, 1-8.
143. Reiner G., Bronnert B., Hohloch C., Reinacher M., Willems H., 2011, Distribution of ORF2 and ORF3 genotype of porcine circovirus type 2 (PCV2) in wild boars and domestic pigs in Germany, *Vet Microbiol*, 148, 372-376.
144. Rodriguez-Arioja G.M., Segales J., Rosell C., Rovira A., Pujols J., Plana D.J., Domingo M., 2003, Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain, *J Vet Med B*, 50, 99-101.
145. Rodriguez-Arioja G.M., Segales J., Rossel C., Quintana J., Aylon S., Camprodon A., Domingo M., 1999, Aujeszky's disease virus infection concurrent with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs, *Vet Rec*, 144, 152-153.
146. Rose N., Opriessnig T., Grasland B., Jestin A., 2012, Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2), *Virus Res*, 164, 78-89.
147. Rosell C., Segales J., Domingo M., 2000, Hepatitis and Staging of Hepatic Damage in Pigs Naturally Infected with Porcine Circovirus Type 2, *Vet Pathol*, 37, 687-692.
148. Rosell C., Segales J., Plana-Duran J., Balasch M., Rodriguez-Arrioja G.M., Kennedy S., Allan G.M., McNeilly F., Latimer K.S., Domingo M., 1999, Pathological, immunocitochemical, and in-situ hybridization studies of



- natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs, *J Comp Pathol*, 120, 59-78.
149. Roulston A., Marcellus R.C., Branton P.E., 1999, Virus and apoptosis, *Annu Rev Microbiol*, 53, 577-628.
150. Rovira A., Balasch M., Segalés J., Garcí L., Durán P. J., Rosell C., Ellerbrok H., Mankertz A., Domingo M., 2002, Experimental Inoculation of Conventional Pigs with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus 2, *J Virol*, 76, 3232-3239.
151. Royer R., Porntippa N., Paul P., Halbur P., 2000, Susceptibility of porcine circovirus to several commercial and laboratory disinfectants, *Porc Am Assoc Swine Pract*, 31, 45.
152. Ruiz-Fons F., Segales J., Gortazar C., 2008, A review of viral diseases of the European wild boar: effects of population dynamics and reservoir role, *Vet J*, 176, 158-169.
153. Ruiz-Fons F., Vicente J., Vidal D., Hofle U., Villanua D., Gauss C., Segales J., Almeria S., Montoro V., Gortazar C., 2006, Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance, *Theriogenology*, 65, 731-743.
154. Saha D., Huang L., Bussalleu E., Lefebvre L.J., Fort M., VanDoorsseelaere J., Nauwynck J.H., 2011, Antigenic subtyping and epitopes competition analysis of porcine circovirus type 2 using monoclonal antibodies, *Vet Microbiol*, 157, 13-22.
155. Salvesen G.S. and Dixit M.V., 1997, Caspase: intracellular signaling by proteolysis, *Cell*, 91, 443-446.
156. Sandvik T., Grierson S., King D., Spencer Y., Banks M., Drew T., 2001, Detection and genetic typing of porcine circovirus DNA isolated from archived paraffin embedded pig tissues, *ssDNA Viruses of Plants, Birds, Pigs and Primates (Saint-Malo, France, 24-27 September 2001)*.



157. Sarli G., Mandrioli L., Laurenti M., Sidoli L., Cerati C., Rolla G., Marcatto S.P., 2001, Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), *Vet Immunol Immunop*, 83, 53-67.
158. Schulze C., Neumann G., Grutze I., Engelhardt A., Mirle C., Ehlert F., Hlinak A., 2003, Case report: porcine circovirus type 2 infection in an European wild boar (*Sus scrofa*) in the state of Brandenburg, Germany, *Deut Tierarztl Woch.*, 110, 426-428.
159. Sedlak K., Bartova E., Machova J., 2008, Antibodies to selected viral disease agents in wild boars from the Czech Republic, *J Wildl Dis*, 44, 777-780.
160. Seeliger A.F., Brüggmann L.M., Krüger L., Greiser I., Verspohl J., Segales J., Baumgartner W., 2007, Porcine circovirus type 2 associated cerebellar vasculitis in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs, *Vet Pathol*, 44, 621-634.
161. Segales Joaquim, 2012, Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis, *Virus Research* 164, 10- 19.
162. Segales J. and Domingo M., 2002, Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review., *Vet Quart*, 24, 109-124.
163. Segales J., Allan M.G., Domingo M., 2005, Porcine circovirus disease, *Animal Health Research Reviews*, 6, 119-142.
164. Segales J., Alonso F., Rosell C., Pastor J., Chiannini F., Campos E., Lopez F.L., Quintana J., Rodriguez A.G., Calsamiglia M., Pujos J., Dominguez J., Domingo M., 2001, Changes in peripheral blood leucocyte population in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), *Vet Immunol Immunop*, 81, 37-44.
165. Segales J. and Domingo M., 2002, Postweaning multisystemic wasting syndrome. A review (PMWS) in pigs, *Vet Quart*, 24, 109-124.
166. Segales J., Calsamiglia M. Olvera A., Sibila M., Badiella L., Domingo M., 2005, Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and



tonsillar, nasal, tracheobronchial, urinary and fecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), *Vet Microbiol*, 111, 223-229.

167. Segales J., Collell M., Jensen H.E., Blanco J.L., Domingo M., 2003, Pulmonary aspergillosis in a postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs, *The Pig Journal*, 52, 41-47.
168. Segales J., Domingo M., Chianini F., Majo N., Dominguez J., Darwich L., Mateu E., 2004, Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs, *Vet Microbiol*, 98, 151-158.
169. Segales J., Pastor J., Cuenca J., Domingo M., 2000b, Haematological parameters in post weaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs, *Vet Rec*, 146, 675-676.
170. Segales J., Rodriguez-Arioja G., Domingo M., 2000a, Patologia de la circovirosis porcina, *Porci*, 56, 41-54.
171. Segales J., Sitjar M., Domingo M., Dee S., Del Pozo M., Noval R., Sacritran S., DeLas Heras A., Ferro A., Latimer K.S., 1997, First report of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain, *Vet Rec*, 141, 600-601.
172. Shibahara T., Sato K., Ishikawa Y., Kadota K., 2000, Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome, *J Vet Med Sci*, 62, 1125-1131.
173. Shibata I., Okuda Y., Yazawa S., Ono M., Sasaki T., Itagaki M., Nakajima N., Okabe Y., Hidejima I., 2003, PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs in field cases, *J Vet Med Sci*, 65, 405-408.
174. Sinha I., Schalk S., Lager M.K., Wang C., Opriessnig T., 2012, Singular PCV2a or PCV2b infection results in apoptosis of hepatocytes in clinically affected gnotobiotic pigs, *Research in Veterinary Science*, 92, 151-156.



175. Sofia M., Billinis C., Psychas V., Birtsas P., Sofianidis G., Leontides L., Knowles N., Spyrou V., 2008, Detection and genetic characterization of porcine circovirus 2 isolates from the first cases of postweaning multisystemic and wasting syndrome in wild boars in Greece, *J Wildl Dis*, 44, 864-870.
176. Sorden S.D., 2000, Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome, *J Swine Health Prod*, 8, 133-136.
177. Staebler S., Sydler T., Buergi E., McCullough K., McNeilly F., Allan M.G., Pospischil A., 2005, PMWS: an emerging disease identified in archived porcine tissues, *Vet J*, 170, 132-134.
178. Studdert M.J., 1993, Circoviridae: new viruses of pigs, parrots and chickens, *Aust Vet J*, 70, 121-122.
179. Szeredi L. and Szentirmai Cs., 2008a, Proliferative and necrotising pneumonia and severe vascular lesions in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2, *Acta Vet Hung*, 56, 101-109.
180. Szeredi L. and Szentirmai Cs., 2008b, Gastric zygomycosis in a pig affected with postweaning multisystemic wasting syndrome - Case report, *Acta Vet Hung*, 56, 207-213.
181. Thomson J., Smith B., Allan G., McNeilly F., McVicar C., 2000, PDNS, PMWS and porcine circovirus type 2 in Scotland. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Post-weaning multisystemic wasting syndrome, *Vet Rec*, 146, 651-652.
182. Tischer I., 1995, Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine population of different breeding farms, *Arch Virol*, 140, 737-743.
183. Tischer I., Miels W., Wolff D., Vagt M., Griem W., 1986, Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus, *Arch Virol*, 91, 271-276.
184. Tischer I., Rasch R., Tochtermann G., 1974, Characterisation of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines, In: *Zentralblatt fur Bacteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und*



Hygiene-Erste Abteilung Originale-Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie, 226, 153-167.

185. Tischer I., Gelderblom H., Vettermann W., Koch M.A., 1982, A very small porcine virus with circular single-strained DNA, *Nature*, 295, 64-66.
186. Tizzard I.R., 1996, *Veterinary Immunology, An Introduction, Fifth Edition*, Saunders, Pennsylvania, pp. 237-250.
187. Todd D., Bendinelli M., Biagini P., Hino S., Mankertz A., Mishiro S., Niel C., Okamoto H., Raidal S., Ritchie B.W., Teo G.C., 2005, *Circoviridae*. U: Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (Eds.): *Virus taxonomy: Eighth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, San Diego: 327-334.
188. Toplak I., Grom J., Hostnik P., Barlic-Maganja D., 2002, Detection and differentiation of porcine circovirus type 1 and 2 in Slovenia using „multiplex PCR“, *3rd Slovenian Veterinary Congress Portorož*, 6-7 December, p43.
189. Toplak I., Grom J., Hostnik P., Barlic-Maganja D., 2004, Phylogenetic analysis of type 2 porcine circoviruses identified in wild boar in Slovenia, *Vet Rec*, 155, 178-180.
190. Toplak I., Lipej Z., Petrovic T., Hostnik J., Grom J., Barlic-Maganja D., 2003, Detection and phylogenetic analysis of type 2 porcine circovirus (PCV2) from pigs with PMWS in Slovenia, Croatia and Yugoslavia. U: *Proceedings of the 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Rome, Italy, 29 June-2 July 2003*. pp. 172-173.
191. Truong C., Mahe D., Blanchard P., Le Dimna M., Madec F., Jestin A., Albina E., 2001, Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection, *Arch Virol*, 146, 1197-1211.
192. Tsai Y.C., Jeng C.R., Hsiao S.H., Chang H.W., Liu J.J., Chang C.C., Lin C.M., Chia M.Y., Pang V.F., 2010, Porcine circovirus type 2 (PCV2) induces

cell proliferation, fusion, and chemokine expression in swine monocytic cells in vitro, *Vet Res*, 41, 60.

193. Vincent I.E., Carrasco C.P., Hermann B., Meehan B.M., Allan G.M., Summerfiled A., McCullough K.C., 2003, Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus, *J Virol*, 77, 13288-13300.
194. Vicente J., Segaaes J., Hofle U., Balasch M., Duran J., Domingo M., Gortazar C., 2004, Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*), *Vet Res*, 35, 243-253.
195. Wellenberg G.J., Bouwkamp F.T., Wolf P.J., Swart W.A., Mombarg M.J., de Gee A.L., 2010, A study on the severity and relevance of porcine circovirus type 2 infections in Dutch fattening pigs with respiratory diseases. *Vet Microbiol*, 142, 217-224.
196. West K.H., Bystrom J.M., Wojnarowicz C., Shanty N., Jacobson M., Allan G.M., Hainnes D.M., Clark E.G., Krakowka S., McNeilly, Martin K., Ellis J.A., 1999, Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2, *J Vet Diagn Invest*, 11, 530-532.
197. Yang J.S., Song D.S., Kim Y.S., Lyoo K.S., Park B.K., 2003, Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with and without enteric disease by polymerase chain reaction, *J Vet Diagn Invest*, 15, 369-373.
198. Young M.G., Cunningham G.L., Sanford S.E., 2011, Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis, *J Swine Health Prod*, 19, 6.
199. Yu S., Opriessnig T., Kitikoon P., Nilubol D., Halbur G.P., Thacker E., 2007a, Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs, *Vet Immunol Immunop*, 115, 261-272.



200. Yu S., Vincent A., Opriessnig T., Carpenter S., Kitikoon P., Halbur P.G., 2007b, Quantification of PCV2 capsid transcript in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro, *Vet Microbiol*, 123, 34-42.



.....

BIOGRAFIJA

Bečkei L. Žolt (Becskei L. Zsolt) rođen je 14. januara 1979. godine u Bačkoj Topoli, gde je završio osnovnu i srednju školu. Studije veterinarske medicine u Beogradu upisao je 1998. godine, a diplomirao u decembru 2003. godine, prvi u svojoj generaciji, sa prosečnom ocenom 9,76 (devet i 76/100). Sledeće godine je upisao postdiplomske studije na Veterinarskom fakultetu u Beogradu, smer Patologija i terapija životinja iz uže oblasti Patologija. Magistarsku tezu pod naslovom „Dokazivanje Cap antigena cirkovirusa-2 u organima obolele prasadi“ odbranio je decembra 2008. godine pred komisijom u sastavu: prof. dr Milijana Knežević, mentor, prof. dr Sanja Aleksić Kovačević i dr Vojin Ivetić. Oktobra 2010. godine prijavio je temu za doktorsku disertaciju „Detekcija i tkivna distribucija nukleinske kiseline i Cap antigena cirkovirusa svinja-2 kod domaćih i divljih svinja“. Specijalističke akademske studije upisao je u oktobru 2011. godine, a specijalistički rad pod nazivom „Primena *in situ* konzervacije animalnih genetičkih resursa u stočarstvu“ odbranio je u novembru 2012. godine.

Pre izbora za asistenta za predmet Stočarstvo na Katedri za stočarstvo i genetiku u septembru 2011. godine, radio je kraće vreme (mart-septembar 20004. godine) kao referent za farmski uzgoj puževa u „Alimenti Naturali“ u Beogradu. Nakon upisivanja postdiplomskih studija 2004. godine, tokom zimskog semestra, bio je nangažovan na Katedri za bolesti papkara na poslovima izvođenja praktične nastave. U decembru 2004. godine zaposlio se u Veterinarskom specijalističkom institutu „Subotica“ u Subotici, gde je do 2008. godine obavljao poslove šefa veleprometa dijagnostičkih sredstava i veterinarskih lekova. U istoj instituciji, od 2008 do 2011. godine, radio je kao saradnik za patologiju.

Zahvaljujući odličom uspehu na studijama, bio je dobitnik brojnih priznanja, nagrada i stipendija (Fondacija Kraljevske porodice Karađorđević, Kraljevine Norveške, Stipendije ministarstva prosvete i nauke, Opštinska stipendija, jednokratne novčane nagrade za postignuti uspeh, itd.). Više puta je boravio u inostranstvu na stručnim usavršavanjima iz oblasti veterinarske patologije i dijagnostike bolesti (u Budimpešti 2008. i 2009. godine na katedri za patologiju i veterinarsku forenziku veterinarskog fakulteta; u Belfastu 2009. godine na odeljenju za veterinarsku virusologiju, Queens University Belfast, Agri-food biosciences Institute, u okviru međunarodnog projekta: Eu Project NMSACC-PCVD 518432; U Zagrebu 2010. godine na odeljenju za patologiju hrvatskog veterinarskog instituta).

Član je stručnih udruženja: Charles Louise Davis Veterinary Foundation, Srpskog veterinarskog društva, Srpskog lekarskog društva-Udruženje patologa Srbije; Udruženja veterinarara „Magyar Állatorvosok Világszervezete“. Bio je rukovodilac jednog projekta Ministarstva Poljoprivrede Šumarstva i Vodoprivrede, Uprave za veterinu, koji je 2008. godine realizovan i nosi naslov „Raširenosti cirkovirusnih infekcija u zapaatima svinja“. Učestvovao je na velikom broju naučno-stručnih simpozijuma i konferencija u zemlji i inostranstvu. Držao je predavanja za veterinare na naučno-stručnim skupovima u zemlji i u inostranstvu. Kao sertifikovani interni proveravač, više puta je bio član komisije internih nadzornih provera sistema menadžmenta kvaliteta u Veterinarskom institutu „Subotica“. Učestvovao je na velikom broju simpozijuma i konferencija u zemlji i inostranstvu. Stručnih članaka, ukupno 15, publikovao je u domaćim i stranim časopisima.



PUBLIKACIJE:

Savić M., Dimitrijević B., Jovanović S., Katić-Radivojević S., Borozan S., Bečkei Ž., Teodorović R., Janković Lj., 2012, Characteristics of zackel sheep and exotic sheep breeds under sustainable management at the sjenica-pester plateau, In: Book II of Proceedings of the 1st International Symposium on Animal Science, Zemun, s. 1131-1137.

Radisavljević K., Vučinić M., Elezović M., Bečkei Ž., 2012, Stakeholders attitudes toward pig castration methods in relation to the animal welfare, In: Book I of Proceedings of the 1st International Symposium on Animal Science, Zemun, s. 391-398.

Cadar D., Dán Á., Tombácz K., Lőrincz M., Becskei Zs., Spinu M., Tuboly T., Cságola A., 2012, Phylogeny and evolutionary genetics of porcine parvovirus in wild boars, *Infection Genetics and Evolution* 12, 1163-1171.

Toplak I., Lazić S., Lupulović D., Prodanov-Radulović J., Becskei Zs., Došen R., Petrović T., 2012, Study of the genetic variability of porcine circovirus type 2 detected in Serbia and Slovenia, *Acta Vet Hung* 60, 409-420.

Grdović S., Savić M., Bečkei Ž., Dimitrijević B., 2012, Biodiversity and traditional sheep grazing in the South Banat region, *Acta Veterinaria*, prihvaćen za štampu.

Bečkei Ž., Molnar T., Pavlović I., Nataša Pavličević, Rudinski P., Kiškarolj F., 2011, Parazitska fauna divljih svinja sa područja Severnobačkog okruga, Zbornik referata i kratkih sadržaja, 22. savetovanje veterinara Srbije sa međunarodnim učešćem, Zlatibor 14-19.09.2012., s. 226-227.

Radisavljević K., Aleksić J., Elezović M., Samokovlija A., Bečkei Ž., 2011, Mogućnost procene bola kod domaćih životinja, Zbornik referata i kratkih sadržaja, 22. savetovanje veterinara Srbije sa međunarodnim učešćem, Zlatibor, s. 51-52.

Becskei Zs., Aleksić-Kovačević S., Rusvai M., Balka GY., Jakab Cs., Petrović T. and Knežević M., 2010, Distribution of porcine circovirus 2 Cap antigen in the lymphoid tissue of pigs affected by Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, *Acta Vet Hung* 58 (4), 483-498.

Aleksić-Kovačević S., Polaček V., Bečkei Ž., Knežević M., 2009, Dokazivanje E2 proteina virusa klasične kuge svinja i antigena cirkovirusa-2 u limfatičnim tkivima prasadi, Zbornik kratkih sadržaja, 14. godišnje savetovanje veterinara Republike Srpske sa međunarodnim učešćem, Jahorina, s. 64-65.

Bečkei Ž., Aleksić-Kovačević S., Hotvat J., Knežević M., 2008, Promene u limfatičnom tkivu kod prasadi obolelih od multisistemskog sindroma kržljanja zalučene prasadi (PMWS), Zbornik radova i kratkih sadržaja, 20. savetovanje veterinara Srbije sa međunarodnim učešćem, Zlatibor, s. 318-319.

Kilibarda N., Bečkei Ž., Kiškarolj F., Horvat J., 2007, Higijenska ispravnost sirovog mleka iz bazena proizvođača sa epizootiološkog područja VSI "Subotica", Zbornik kratkih sadržaja, 2. Kongres veterinara Republike Srpske (Bosna i Hercegovina) sa međunarodnim učešćem.

Sabo Z., Bečkei Ž., Kilibarda N., Horvat J., 2007, Ispitivanje higijenske ispravnosti sirovog mleka u bazenima na mini farmama i sirovog mleka poreklom sa individualnih gazdinstava na području Opštine Subotica, Zbornik kratkih sadržaja, 2. Kongres Veterinara Republike Srpske (Bosna i Hercegovina) sa međunarodnim učešćem.

Salaši I., Horvat J., Bečkei Ž., Kucor Č., 2005, Učestalost pojavljivaja bolesti papaka u stadima mlečnih krava, IV. Simpozijum "Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda", Zbornik radova - Etiopatogeneza i dijagnostika poremećaja metabolizma i reprodukcije goveda, Subotica, s. 315 - 318.

Dimitrijević S., Ilić T., Nikolić A., Bečkei Ž., 2005, Zastupljenost parazitskih infekcija mesojeda na teritoriji grada Beograda, Zbornik radova VII. Simpozijuma iz kliničke patologije i terapije-, *CLINICA VETERINARIA*, Ohrid, s. 326.

Dimitrijević S., Ilić T., Bečkei Ž., 2005, Epizootiološki značaj parazitskih infekcija mesojeda, Zbornik referata i kratkih sadržaja VII. Epizootiološki dani, Jagodina, s. 127-128.

ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ



ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I. ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
1. Датум и назив органа који је именовao комисију 23.05.2012. Наставно-научно веће Факултета ветеринарске медицине, Београд.
2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен: 1. др Милијана Кнежевић, редовни професор у пензији, Патолошка морфологија, 1994, Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду 2. др Сања Алексић-Ковачевић, редовни професор, Патолошка морфологија, 2005, Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду 3. др Војин Иветић, виши научни сарадник, Патолошка морфологија, 2005, Научни институт за ветеринарство Србије, Београд 4. др Тамаш Петровић, виши научни сарадник, Микробиологија и заразне болести, 2011, Научни институт за ветеринарство Нови Сад, Нови Сад
II. ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
1. Име, име једног родитеља, презиме: Жолт, Лајош, Бечкеи
2. Датум рођења, општина, Република: 14.01.1979., Бачка Топола, Србија
3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе* 29.12.2008., Београд, „Доказивање антигена цирковируса-2 и органима оболеле прасаци“.
4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука* Патолошка морфологија

III. НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

„Детекција и ткивна дистрибуција нуклеинске киселине и *Sap* антигена цирковируса-2 код домаћих и дивљих свиња“

IV. ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Навести кратак садржај са назнаком броја страна поглавља, слика, шема, графикана и сл.

Докторска дисертација магистра Жолта Бечкеи „Детекција и ткивна дистрибуција нуклеинске киселине и *Sap* антигена цирковируса-2 код домаћих и дивљих свиња“ написана је на 182 странице А4 формата и садржи 11 табела, 22 слике и 3 дијаграма. Дисертација садржи следећа поглавља: Увод (4 странице), Преглед литературе (36 странице), Циљ и задаци (2 странице), Материјал и методе (9 страница), Резултати (63 странице), Дискусија (22 странице), Закључци (2 странице) и Списак литературе (26 странице). Дисертација на почетку садржи захвалност (1 страница), резиме на српском и енглеском језику (8 страница), садржај (2 странице) и скраћенице (2 странице).

V. ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У **Уводу** кандидат износи да се PCV2 (porcine circovirus type 2, енг.) налази у свим подручјима света у којима постоји интензивна производња свиња. Такође, новија сазнања говоре у прилог присуству инфекције цирковирусом и код дивљих свиња. Од прве појаве PMWS синдрома листа обољења за које се сматра да су у узрочној вези са PCV2 значајно се проширила. Сходно томе, у новије време се углавном говори о "обољењима повезаним са PCV2" (Porcine circovirus associated diseases, PCVAD, PCVDs, енг.). Већина аутора у ову групу обољења сврставају, осим PMWS синдрома, и дерматитис-нефропатија синдром (Porcine dermatitis nephropatia syndrome, PDNS, енг.), комплекс респираторних поремећаја свиња (Porcine respiratory disease complex, PRDC, енг.), репродуктивне сметње крмача и назимади (Sow abortion mortality syndrome, SAMS, енг.), пролиферативна некротизирајућа пнеумонија свиња (Porcine proliferative necrotizing pneumonia, PNP, енг.), грануломатозни ентеритис, некротични лимфаденитис, ексудативни епидермитис и конгенитални тремор прасади. Улога PCV2 у развоју наведених синдрома код домаћих свиња, осим у случају PMWS синдрома, а по некима и PRDC, још није довољно испитана, нити са сигурношћу доказана. У популацијама дивљих свиња PCV2 је такође раширен. Из литературе су познати ретки случајеви PMWS синдрома дивљих прасади.

Мултисистемски синдром кржљања залучене прасади (PMWS) је обољење у чијој етиологији учествује више етиолошких фактора, где је присуство PCV2 неопходан али не и довољан фактор за развој клиничке манифестације обољења. Код залучене прасади PMWS синдром се најчешће карактерише прогресивним кржљањем, заостајањем у развоју, углавном са респираторним сметњама, дијарејом, бледилом коже и повремено иктерусом. Није сасвим јасно како је ово, до недавно ретко обољење, брзо попримило епидемијске размере и раширило се по целом свету.

Сматра се да је деплеција лимфоцита у лимфатичном ткиву најчесталија лезија код PMWS синдрома. Описано је смањење броја циркулишућих Б лимфоцита и губитак лимфоцита у Б ћелијским регионима лимфатичног ткива, као и смањење броја ЦД4 и/или ЦД8 субпопулација Т лимфоцита. Имајући у виду скромна сазнања о патогенези и механизму настанка имунодефицијентног стања код свиња инфицираних PCV2, испитивања у овој дисертацији су била усмерена у том правцу. С обзиром да сама детекција PCV2 не подразумева и постојање обољења, а да лезије карактеристичне за PMWS синдром недовољно дефинишу ову болест, у овом раду су уз помоћ хибридизације *in situ* и имунохистохемијске методе истовремено испитани карактер ткивног оштећења, присуство нуклеинске киселине вируса у фази мировања и фази репликације, као и ткивна дистрибуција вирусног антигена код домаћих и дивљих свиња.

Преглед литературе представља синтезу великог броја радова који се односе на етиологију, епизоотиологију, патогенезу, патоморфолошке промене и механизам оштећења имунолошког система свиња са PCV2. Поред тога, литературни подаци се односе и на имунолошке и молекуларне технике које се данас користе у изучавању овог вируса. С обзиром

на нова сазнања, везана за инфекцију дивљих свиња, један део литературе се односи и на цирковирусна обољења дивљих свиња.

Циљ ове дисертације је био усмерен на испитивање присуства цирковирусних инфекција домаћих и дивљих свиња у Србији и разјашњење карактера и степена оштећења имунолошког система код јединки природно инфицираних цирковирусом и оболелих од PCVAD. Постављени циљ је реализован кроз следеће **задатке**: а) утврђивање преваленције инфекције домаћих и дивљих свиња цирковирусом-2; б) утврђивање макроскопских промена код оболелих свиња; в) утврђивање карактера и интензитета хистопатолошких промена на лимфатичним органима (лимфни чворови, слезина, тонзиле, илеоцекална валвула и Пајерове плоче), плућима, јетри, бубрезима и срцу оболелих свиња; г) евалуацију установљених хистолошких лезија; д) доказивање дистрибуције вирусног антигена у лимфатичним органима, плућима, јетри, бубрезима и срцу оболелих свиња; е) доказивање дистрибуције ДНК цирковируса-2 у фази мировања и у фази репликације у лимфатичним органима, плућима, јетри, бубрезима и срцу оболелих домаћих и дивљих свиња; ж) дистрибуцију ћелија које експримирају ДНК и Сар-антиген цирковируса-2 уз квантификацију имунопозитивног сигнала.

У поглављу **Материјал и методе** кандидат наводи да су испитивања извршена на укупно 140 свиња од чега 60 домаћих свиња пореклом са 8 фарми из различитих региона Србије, као и 60 дивљих свиња пореклом из два ловишта. Десет домаћих и десет дивљих свиња чиниле су контролну групу.

Код домаћих свиња, након угинућа природном смрћу са знацима јаке измршавелости, извршена је обдукција и после детаљног макроскопског прегледа узоркован је материјал за хистопатолошку, имунохистохемијску, PCR анализу и хибридизацију *in situ*. Дивље свиње су након одстрела транспортоване у регионалне ловачке санитарне пунктове где је урађен детаљан макроскопски преглед и узоркован материјал за исте анализе као код домаћих свиња.

Контролну групу сачињавале су младе домаће и дивље свиње (10+10), добре телесне кондиције и без знакова обољења и код којих PCR анализом није установљено присуство PCV2. Да би се установила преваленција инфекције са PCV2 у популацији домаћих и дивљих свиња, урађено је узорковање ингвиналних суперфицијалних лимфних чворова, слезине и плућа од свих 140 свиња.

За хистопатолошка и имунохистохемијска испитивања, као и за хибридизацију *in situ* од узорковани су субмандибуларни, медијастинални, мезентеријални и ингвинални суперфицијални лимфни чворови; тонзиле; слезина и црева домаћих и дивљих свиња, као и плућа, јетра, бубрези и срце. Узорковани материјал пореклом од домаћих и дивљих свиња фиксиран је у 10% неутралном формалину у трајању од 24-48 сати. После фиксације ткиво је обрађено у аутоматском ткивном процесору и укалупљено у парафинске блокове. Парафински исечци дебљине око 5µм бојени су хематоксилин-еозин (HE) методом.

У циљу молекуларне детекције PCV2 у узорцима органа домаћих и дивљих свиња, вршено је испитивање присуства дела ORF2 фрагмента генома овог вируса у плућима, ингвиналним суперфицијалним лимфним чворовима и слезини, методом ланчане реакције полимеразе (Polimerase Chain Reaction - PCR). Поступак екстракције ДНК из плућа, ингвиналних суперфицијалних лимфних чворова и слезине вршен је у микротубама, употребом комерцијалног кита "QIAamp® DNA Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Немачка) по упутству произвођача. За амплификацију ORF2 дела генома PCV2 величине 501 базних парова (бп) коришћени су специфични олигонуклеотидни прајмери *forward* PCV2-2A: 5'-CACCTTCGGATATACTGTCAA-3' (нуклеотидна позиција 1582-1562) и *reverse* PCV2-2B: 5'-TACATGGTTACACGGATATTGTA-3' (нуклеотидна позиција 1082-1104) (Sandvik и сар., 2001). PCR метода је спроведена уз помоћ комерцијалног кита "HotStar Taq Master Mix Kit" (Qiagen, Hilden, Немачка) са малим модификацијама упутства произвођача. Доказивање PCR продукта вршено је електрофорезом (Hoefler HE 33 Mini Submarine, „Amersham Biosciences“) на 1,5% агарозном гелу („Invitrogen Life Technologies“, Велика Британија) и визуелизацијом на трансилуминатору („TFX-35.M“, Vilber Lourmat, Француска).

Од имунохистохемијских метода коришћена је тростепена стрептавидин-биотин метода (LSAB2). У ткивним исечцима је најпре извршено блокирање ендogene пероксидазе у 3% H₂O₂ у метанолу на собној температури у трајању од 15 минута. Затим је извршено демаскирање антигена применом протеиназе К (Dako Proteinase K, Ready-to-use, REF S3020, Dako) у трајању од четири минута. Сва испирања и разблажења током реакције рађена су у TRIS-HCl пуферу pH 7,6. Затим су исечци инкубирани са примарним моноклонским антителом за PCV2 (Porcine

Circovirus Type 2 Monoclonal Antibody, Lot No:RB0608, Rural Technologies, Inc. Brookings, SD) у разређењу 1:500, у трајању од 60 минута на собној температури. За детекцију је коришћен кит Daco Cytomation LSAB2 system-HRP (K0675, Dako). Визуелизација реакције постигнута је применом диаминобензидина (DAB+, K3468, Dako) у трајању од 10 до 15 минута. Контрастирање исечака извршено је у хематоксилину (Mayerov hematoksilin) у трајању од две секунде. Након бојења исечци су монтирани помоћу воденог медијума за монтирање *Glycergel* (C563, Dako).

Као негативна контрола током имунохистохемијског испитивања узорака коришћени су истоветни ткивни исечци који нису третирани примарним антителима.

Као позитивна контрола током имунохистохемијског испитивања коришћени су ткивни исечци код којих је претходно, методом PCR и имунохистохемијски, потврђено присуство *Cap* антигена PCV2.

Са циљем да се у испитаним ткивима утврди присуство и локализација генома PCV2, урађена је хромогена *in situ* хибридизација на ткивним исечцима лимфних чворова (субмандибуларни, медијастинални, мезентеријални и ингвинални суперфицијални), тонзила, слезине, Пајерових плоча, илеоцекалне валвуле, плућа, јетре, бубрега и срца домаћих и дивљих свиња. На ткивним исечцима је извршена хибридизација генома дивљег вируса са комерцијалном, PCV2 специфичном, комплементарном и репликативном олигонуклеотидном геномском пробом (CP и RFP геномска проба). У оба случаја коришћена је дигоксигенином обележена, комерцијална олигонуклеотидна геномска проба састављена од 41 нуклеотидне базе, која је синтетисана на основу референтног соја PCV2. Нуклеотидни низ CP геномске пробе PCV2 био је следећи: DIG-5'-CCTTCCTCATTACCCTCCTCGCCAACAATAAAATAATCAAAA-3' (PCV2 CP, 1017255, TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Немачка). Нуклеотидна секвенца за RFP геномску пробу PCV2 била је:

DIG-5'-TTTGATTATTTTATTGTTGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGG-3' (PCV2 RPF, 1017256, TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Немачка). Прво су ткивни исечци дебљине око 4 μ m постављени на специјалне, позитивно наелектрисане, силинизиране микроскопске плочице (Chem Mate Capillary Gap Microscope Slides, Ref S2025, Dako). Затим је извршена депарафинизација ткивних исечака у ксилолу и рехидрација кроз серију различито постотног етанола. Исечци су испирани трократно у Аутобуферу (Ref 372182, Biomed) и подвргнути протеолитичком третману применом Пепсина (Ref P7012, Sigma) у трајању од 10 минута на температури од 37 $^{\circ}$ C ради лакше пенетрације геномске пробе. Активност пепсина је прекинута подизањем температуре на 105 $^{\circ}$ C у трајању од осам минута. Након трократног испирања у Аутобуферу извршена је денатурација ДНК применом 100% Формамида (Ref 22, 119-8, Sigma) у трајању од пет минута, на температури од 105 $^{\circ}$ C. Након припреме раствора за хибридизацију (11.25 мл 100% Формамид, 3,75 гр Хондроитин сулфат (Ref 320699, Calbiochem), 12,5 мл 20XSSC, 2,5 мл 0,50 mM Phosphat buffer, 0,125 гр Blocking Reagent (Rosche Diagnostics) и 20 мл редестиловане воде) у њега је додата геномска проба (CP или RFP) у количини од 10 μ l. Тако припремљени раствор са Диг обележеном геномском пробом нанесен је на ткивне исечке, и у фази пре-хибридизације инкубиран на 105 $^{\circ}$ C у трајању од пет минута. Хибридизација коришћене геномске пробе и дивљег вируса у ткивима постигнута је инкубацијом исечака у трајању од 60 минута на 37 $^{\circ}$ C. Након инкубације извршено је трократно испирање у 0,5 X SSC и у 0,25 X SSC пуферима. Исечци су затим инкубирани у раствору за блокирање - пуфер 1 (пуфер pH 7.5 са садржајем 3% Тритон 100x (Ref 23,472-9, Aldrich), 1% нормалног козјег серума, 100 mM Tris, 150 mM NaCl у дестилованој води) у трајању од пет минута на собној температури. Исечци су затим инкубирани анти-Дигоксигенин антителима обележеним алкалном фосфатазом (Anti Digoxigenin AP Fab fragments, Cat.No. 11093274910, Rosche Diagnostics) у разређењу 1:500 у пуферу 1, на температури од 37 $^{\circ}$ C, у трајању од 60 минута. Исечци су затим трократно испирани у пуферу 1 и пуферу 2 (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl $_2$ *6H $_2$ O, 0.004% Tween 20 (Cat.No.23,472-9, Aldrich), 0.0025% Brij 35 (Ref 84184, Sigma)). Визуелизација места хибридизације постигнута је применом веома осетљиве цитохемијске реакције између алкалне фосфатазе, везане за анти-Диг антителима, и хромогена NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Cat.No. 11681451001, Rosche Diagnostics) као супстрата. Након истека третмана исечака са анти-Диг антителима урађено је трократно испирање у серији пуфера 1 и 2, нанет је хромогени раствор NBT/BCIP (3% раствор у пуферу 2) и извршена његова инкубација у трајању од 20 минута на температури од 37 $^{\circ}$ C. Након што је обојена реакција прекинута испирањем у пуферу 3 (1M базични Tris pH 8 са 0.5M EDTA у 1Л дестиловане воде) исечци су обојени Fast Green-ом у трајању шест до седам минута, испрани под текућом водом и покривени воденим медијумом за покривање. На месту позитивне реакције уочава се преципитат зрнасте структуре, тамноплаве боје.

Као негативна контрола у методи хибридизација *in situ* коришћени су истоветни ткивни исечци који нису третирани геномском пробом.

Као позитивна контрола у методи хибридизација *in situ* коришћени су ткивни исечци код којих је претходно методом PCR и хибридизацијом *in situ* потврђено присуство PCV2.

Евалуација хистолошких критеријума за класификацију степена оштећења лимфатичног ткива код PCVAD дефинисана је на основу критеријума које су описали Chianini и сарадници (Chianini *u cap.*, 2003). На основу интензитета утврђених хистопатолошких промена у лимфатичном ткиву, дефинисана су три степена оштећења од значаја за PCVAD. По наведеној категоризацији, интензитет хистопатолошких оштећења приказан је као: блага ткивна лезија (I); ткивна лезија средњег интензитета (II); и ткивна лезија јаког интензитета (III). Ознаком БЛ означено је одсуство промена који су од значаја за PCVAD.

Резултати имунохистохемијске (IHC) анализе и комплементарне пробе хибридизације *in situ* (CP ISH) на лимфатичном ткиву су уз помоћ семиквантитативне методе груписани у четири групе, од стране два независна прегледача. Групе су дефинисане на основу броја имунопозитивних ћелија на исечцима лимфатичног ткива. Као критеријум за дефинисање група, узет је број позитивних ћелија на укупно 100 избројених ћелија по видном пољу. Укупно је 10 видних поља прегледано по исечку лимфатичног ткива под увећањем објектива 20X. Лезије лимфатичног ткива су на основу споменутог критеријума груписани на следећи начин: негативно (-), нема присутних имунопозитивних ћелија; слабо позитивно (+), < 20% позитивних ћелија; умерено позитивно (++) , 20-50% позитивних ћелија; и изразито позитивно (+++) , > 50% позитивних ћелија. Код осталих испитаних органа (плућа, јетра, бубрези и срце), позитивна реакција IHC и CP ISH није груписана на основу интензитета у више група, већ је означена као негативна (-), нема присутних имунопозитивних ћелија; или као позитивна (+), присутни су позитивне ћелије у различитом броју.

Резултати испитивања репликативне форме хибридизације *in situ* (RFP ISH) на лимфатичном ткиву и осталим испитаним органима (плућа, јетра, бубрзи и срце) означени су као: негативни (-), нема присутних имунопозитивних ћелија; или као позитивни (+), присутне су позитивне ћелије у различитом броју.

Код домаћих свиња, јединка која је показивала клиничке знаке кржљавости и код које је PCR анализом доказано присуство PCV2 у ткивима, окарактерисана је да болује од PMWS синдрома (системски облик PCVAD) у случају када је интензитет патохистолошких промена у лимфатичном ткиву у категорији промена средњег или јаког интензитета (I, III), уз обавезно присуство умерено позитивног или изразито позитивног (++) , (+++) IHC и CP ISH сигнала.

Код дивљих свиња, оправдана сумња о присуству системског облика PCVAD постављена је у случају када су код инфициране младе јединке присутне патохистолошке промене у лимфатичном ткиву у категорији промена средњег или јаког интензитета (II или III), уз обавезно присуство умерено позитивног (++) или изразито позитивног (+++) IHC и CP ISH сигнала.

У статистичкој обради података кандидат је користио дескриптивне статистичке параметре, уз помоћ којих су се описивале испитиване промене код домаћих и дивљих свиња. Статистичка сигнификантност разлика испитиваних група промена између домаћих и дивљих свиња установљавала се уз помоћ т-теста пропорције. Сигнификантност разлика је одређена на нивоу значајности од 5% и 1%. Добијени резултати статистичке анализе приказани су табеларно и графички. Статистичка анализа је извршена у статистичком пакету GraphPad PRISM 4.0 и Microsoft Office Excel-у.

Оригинални подаци који су добијени у овој дисертацији изнети су у поглављу **Резултати**, који су систематизовани у више подпоглавља и приказани текстуално, сликама, табеларно и графиконима. Кандидат наводи да је макроскопским прегледом органа домаћих свиња са манифестним знацима кржљања, утврдио увећање свих лимфних чворова, пнеумоније различитог карактера и интензитета, запаљења желуца и црева, и полисерозитис. Најучесталије патоморфолошке промене, у вези са цирковирусном инфекцијом, уочене код дивљих свиња су пнеумоније различитог карактера и интензитета, углавном са присутним паразитима у бронхијама, запаљења гастроинтестиналног тракта и повремено лимфаденопатија.

Микроскопским испитивањем лимфних чворова и других лимфатичних ткива домаћих и појединих дивљих свиња уочена је деплеција лимфоцита различитог интензитета. Такође, запажена је инфилтрација макрофага на месту исчезлих лимфоцита у лимфним фоликулима, пери и парафоликуларним зонама. Запажено је присуство инфективних гранулома са мултиједарним циновским ћелијама. У промењеном лимфатичном ткиву домаћих и дивљих

свиња, пре свега у цитоплазми нагомиланих макрофага, имунохистохемијском методом, утврђена је велика количина *Cap* антигена PCV2 у виду преципитата смеђе боје. Хибридизацијом *in situ*, у промењеном ткиву, потврђено је присуство генома PCV2 који је углавном у фази мировања, ређе у фази репликације. Геном PCV2 у фази мировања (једноланчана ДНК PCV2) запажен је пре свега интрацитоплазматски локализован, углавном у макрофагама и епителним ћелијама, који се уочавао у виду преципитата плаве боје. Репликативна форма PCV2 (дволанчана ДНК PCV2) утврђена је у много мањем броју ћелија лимфатичног ткива, углавном у лимфоцитима, ређе и макрофагима, интрануклеарно локализована у виду преципитата плаве боје. У макрофагама, понекад је уочена осим једарне и интрацитоплазматска позитивна реакција на присуство репликативне форме PCV2.

Деплеција лимфоцита и присуство великог броја макрофага који садрже вирусне партикуле, осим у лимфним чворовима, запажени су и у тонзилама, слезини и лимфатичном ткиву црева домаћих и неких дивљих свиња.

Главна хистопатолошка промена у нелимфатичним органима домаћих и дивљих свиња је налаз мононуклеарног ћелијског инфилтрата. Вирусни антиген и геном PCV2 присутни су углавном у цитоплазми макрофага, а спорадично и у једру присутних лимфоцита. Имунохистохемијском методом и техником хибридизације *in situ* доказано је да PCV2 показује тропизам првенствено према ћелијама моноцитно-макрофагног система и епителним ћелијама, укључујући епителне ћелије бубрежних тубула, жучних каналића, хепатоците, ентероците и бронхоалвеоларни епител.

У поглављу **Дискусија** се истиче да је применом PCR технике, хистопатолошког прегледа, имунохистохемијске анализе и хибридизације *in situ*, доказано присуство обољења PCVAD у популацијама домаћих свиња. Такође, по први пут, утврђено је да се обољења PCVAD јављају и у популацији дивљих свиња на територији Републике Србије. Порекло PCV2 у испитиваним популацијама домаћих и дивљих свиња није утврђено. Да ли су се домаће свиње на нашем поднебљу заразиле од дивљих свиња или обрнуто, није могуће закључити. Добијени резултати указују да домаће свиње развијају интензивније промене, док су код дивљих свиња истоветне промене блажег интензитета. Приликом тумачења учесталости појединих налаза треба узети у обзир чињеницу да су у оквиру овог рада испитане дивље свиње које су биле плен одстрела а не одабирани по неким унапред утврђеним критеријумима, за разлику од домаћих свиња где су јединке за испитивања одабране на основу клиничких симптома од значаја за PMWS синдром. Обзиром да ловци лове велики плен, већина испитиваних дивљих свиња су биле одрасле јединке, а у мањем броју млађе јединке које су подложније манифестацији ове болести. Међутим, не треба изгубити из вида да дивље свиње нису под непосредним надзором људи, и вероватно да теже оболеле јединке често буду плен предатора. Из тих разлога болест у популацијама дивљих свиња не буде увек примећена, нити испитана у обиму у којем је она реално присутна. По неким ауторима хронично инфициране дивље свиње сматрају се дугогодишњим резервоарима цирковируса и потенцијалним изворима заразе за друге свиње.

Поглавље **Списак литературе** садржи 200 библиографских јединица из стране и домаће литературе.

VI. ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу спроведених истраживања кандидат је извео следеће закључке:

1. Применом PCR анализе инфекција са PCV2 установљена је код домаћих свиња пореклом са свих осам испитаних фарми и код дивљих свиња пореклом из оба испитана ловишта.
2. Инфекција са PCV2 утврђена је код значајно већег броја ($p < 0.01$) домаћих свиња (100,00%) у односу на дивље свиње (26,67%).
3. Уз помоћ макроскопског прегледа, хистопатолошке анализе, имунохистохемијске претраге и хибридизације *in situ* установљено је да 75,00% испитаних домаћих свиња и 6,67% испитаних дивљих свиња ($p < 0.01$) болује од системског облика PCVAD.
4. Није утврђено присуство патогномичних макроскопских промена код домаћих и дивљих свиња оболелих од системског облика PCVAD.
5. Најзначајнија хистопатолошка промена је фоликуларна и парафоликуларна деплеција лимфоцита умереног и јаког интензитета у лимфатичним органима (лимфним чворовима, тонзилама, слезини, Пајеровим плочама и илеоцекалној валвули) оболелих свиња.
6. Деплеција лимфоцита је главни разлог за имуносупресију код свиња оболелих од системског облика PCVAD.
7. Основну хистопатолошку лезију у нелимфатичним органима (плућа, јетра, бубрези и срце) домаћих и дивљих свиња оболелих од системског облика PCVAD представљају фокални и мултифокални инфилтрати састављени од макрофага, лимфоцита и плазма ћелија.
8. У лимфатичним органима домаћих и дивљих свиња оболелих од системског облика PCVAD присутни су инфективни грануломи.
9. Велика количина ДНК и *Sap* антигена PCV2 код домаћих и дивљих свиња присутна је у ћелијама моноцитно/макрофагног система укључујући ткивне макрофаге, APC, дендритичне ћелије и алвеоларне макрофаге.
10. Ћелије лимфних чворова, тонзила, слезине, Пајерових плоча, илеоцекалне валвуле, плућа, јетре и бубрега садрже ДНК и *Sap* антиген PCV2; при чему лимфатично ткиво показује највише интензивну имунопозитивност.
11. Утврђено је да PCV2 показује тропизам према лимфоцитима, макрофагима, алвеоларним епителним ћелијама, епителним ћелијама бронхија и бронхиола, епителним ћелијама бубрежних тубула, епителним ћелијама тонзила, хепатоцитима, епителним ћелијама жучних каналића и ентероцитима.

VII. ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Резултати истраживања су приказани текстуално и документовани са 22 фотографије, 11 табела и 3 дијаграма. Текст је написан концизно, јасним и разумљивим стилем. Резултати су правилно и критички тумачени.

VIII. КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме

Дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави. Примењене методе испитивања су стандардизоване и прилагођене циљу и задацима дисертације, наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Дисертација садржи све битне елементе који се захтевају за завршену докторску дисертацију.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Оригиналан допринос науци ове дисертације огледа се у дефинисању реакције ћелија лимфатичног и нелимфатичног ткива свиња инфицираних PCV2 као и имунопатогенезе установљених структурних промена које чине основу имунодефицијенције домаћих и дивљих свиња која прати PCVAD.

IX. ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

- да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана.

ДАТУМ
06.07..2012.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

1. др Милијана Кнежевић, редовни професор у пензији,
Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду
2. др Сања Алексић-Ковачевић, редовни професор,
Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду
3. др Војин Иветић, виши научни сарадник,
Научни институт за ветеринарство Србије, Београд
4. др Тамаш Петровић, виши научни сарадник,
Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“, Нови Сад

IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisani Bečkei Žolt

Broj upisa:

Izjavljujem

Da je doktorska disertacije pod naslovom „Detekcija i tkivna distribucija nukleinske kiseline i *Cap* antigena cirkovirusa-2 kod domaćih i divljih svinja“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati konkretno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,
2012. godine

Potpis doktoranda:

Bečkei Žolt

**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE
DOKTORSKOG RADA**

Ime i Prezime autora: Žolt Bečkei

Broj upisa:

Studijski program: doktorske akademske studije

Naslov rada: Detekcija i tkivna distribucija nukleinske kiseline i *Cap* antigena cirkovirusa-2 kod domaćih i divljih svinja.

Mentor: Prof. dr Milijana Knežević

Potpisani Bečkei Žolt

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,
2012. godine

Potpis doktoranda:

Bečkei Žolt

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom „Detekcija i tkivna distribucija nukleinske kiseline i *Cap* antigena cirkovirusa-2 kod domaćih i divljih svinja“, koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. . Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno -deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

U Beogradu,
2012. godine

Potpis doktoranda:

Bičević / [signature]