

NUJUNKYTŲ PARŠELIŲ MULTISISTEMINIO NYKIMO SINDROMO (NPMNS) PATVIRTINIMAS KIAULIŲ REPRODUKCIJOS IR KVĖPAVIMO SINDROMO VIRUSU (KRKSV) UŽKRĖSTUOSE LIETUVOS IR LATVIJOS ŪKIUOSE

Arūnas Stankevičius¹, Rytis Čepulis¹, Jūratė Buitkuvienė¹, Alius Pockevičius², Ilona Aleksėjūnienė³, Marija Stankevičienė⁴, Henrikas Žilinskas⁵

¹*Imunologijos laboratorija, Anatomijos ir fiziologijos katedra, Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas; tel. (8~37) 36 28 44; el. paštas: sarunas@lva.lt;*

²*Patologijos centras, Užkrečiamųjų ligų katedra, Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas;*

³*Virusologijos skyrius, Lietuvos veterinarijos akademijos Veterinarijos institutas, Instituto g. 2, LT-56115 Kaišiadorys;*

⁴*Užkrečiamųjų ligų katedra, Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas;*

⁵*Gyvulių reprodukcijos laboratorija, Neužkrečiamųjų ligų katedra, Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas;*

Santrauka. NPMNS atvejai, kai nustatomas didelis kiekis kiaulių antro tipo cirkovirusų (KCV2), buvo užregistruoti daugelyje pasaulio vietų, įskaitant ir Vakarų Europos šalis, tačiau jų reikšmė Lietuvos (LT) ir Latvijos (LV) kiaulių populiacijose anksčiau nebuvo tyrinėta ar aprašyta. Taigi šio darbo tikslas, atsižvelgiant į NPMNS kriterijus, laboratoriniais tyrimų metodais įrodyti NPMNS egzistavimą Lietuvos bei Latvijos kiaulių populiacijose ir molekuliniais metodais preliminariai charakterizuoti paplitusias padernes.

Tyrimui iš viso atrinkta 19 kiaulių (8 iš LT ir 11 iš LV), kurioms NPMNS būdingi požymiai pasireiškė limfmazgiuose, plaučiuose. 8 iš LT ir 11 iš LV paršelių limfiniuose mazguose nustatyti NPMNS būdingi histopatologiniai pokyčiai, o ISH metodas parodė didelį KCV2 kiekį. TaqMan realaus laiko PGR serumo ir plaučių mėginiuose leido nustatyti daugiau nei 10^7 KCV2 genomo kopijų ml.

Panaudojus KCV2 *cap* geno fragmento nukleotidų sekas iš LT ir LV kiaulių ūkių ir viešojoje duomenų bazėje „GenBank“ paskelbtas nukleotidų sekas, sukonstruotas filogenetinis medis, kuris parodė, kad LT ir LV nukleotidų sekos tapačios tik 90,5 proc. LV sekos iki 99,3 proc. nukleotidų sekų panašios į 1A KCV2 grupę, o LT nukleotidų sekos buvo atitinkamai iki 99,5 proc. tapačios 2D grupei.

Būdingi klinikiniai simptomai, histopatologiniai pokyčiai, didelis KCV2 kiekis kartu su KRKSV tiriamojoje mėdžiagoje įrodo, kad LT ir LV kiaulių ūkiuose pasireiškia NPMNS, kurio paplitimą ir įtaką kiaulinkystėje reikėtų išsamiu iširti.

Raktažodžiai: cirkovirusai, KCV2, KRKSV, ISH, filogenetinė analizė.

CONFIRMATION OF MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME (PMWS) IN LITHUANIAN AND LATVIAN PIG HERDS INFECTED WITH PORCINE RESPIRATORY AND REPRODUCTIVE SYNDROME VIRUS (PRRSV)

Arūnas Stankevičius¹, Rytis Čepulis¹, Jūratė Buitkuvienė¹, Alius Pockevičius², Ilona Aleksėjūnienė³, Marija Stankevičienė⁴, Henrikas Žilinskas⁵

¹*Laboratory of Immunology, Department of Anatomy and Physiology, Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania; e-mail: sarunas@lva.lt*

²*Centre of Pathology, Department of Infectious Diseases, Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania;*

³*Department of Virology, Veterinary Institute of Lithuanian Veterinary Academy, Instituto g. 2, LT-56115 Kaišiadorys, Lithuania;*

⁴*Department of Infectious Diseases, Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania;*

⁵*Laboratory of Animal Reproduction, Department of Non-Infectious Diseases, Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania;*

Summary. Porcine circovirus type 2 (PCV2) is essential infectious agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). PMWS has been described in many countries over the world including West Europe countries. However, the importance of PMWS in Lithuanian or Latvian pig populations has never been investigated or reported before. Therefore, the objective of the present study was to report the diagnosis of PMWS and to determine the phylogenetic relationship of PCV2 positive samples in Lithuanian (LT) and Latvian (LV) pig herds.

Three LT and 4 LV pig farms with clinical signs (wasting, dyspnoea and pallor of skin) and gross lesions (enlarged inguinal superficial lymph nodes, enlarged kidneys and skin lesions) compatible with PMWS were included in this study. By nested RT-PCR in all selected farms were detected PRRSV. From these farms, 19 animals (8 from LT and 11 from LV) showed characteristic microscopic lesions in lymphoid tissues after histopathological examination. Seventeen

out of the 19 (89.5%) tested samples were positive by ISH, showing moderate to high presence of PCV2 within lymphoid lesions.

Based on obtained *cap* gene sequences from LT and LV farms and selected PCV2 sequences available from GenBank, a phylogenetic tree was constructed. A 90.5% of nucleotide identity between LT and LV PCV2 sequences was found. LV sequences had up to 99.3% identity to selected PCV2 sequences from group 1A, while those values were up to 99.5% for LT and PCV2 sequences from group 2D.

Obtained our results fulfilled requested criteria to diagnose PMWS in LT and LV farms, including presence of clinical signs (mainly wasting), characteristic microscopic lesions in lymphoid tissues and detection of PCV2 by within these lesions. However, at this time it is not know how widespread the disease is and its relative importance in these countries.

Key words: circovirus, PCV2, PRRSV, ISH, phylogenetic analysis.

Įvadas. Pirmą kartą informacija apie naują virusų grupę, pavadintą cirkovirusais, pasirodė 1974 metais, kai kiaulių inkstų persėjamojoje ląstelių linijoje buvo atrastos virusinės dalelės, charakterizuotos kaip kiaulių cirkovirusas (KCV1). KCV1 nebuvo patogeniškas kiaulėms, tačiau serologiniai tyrimai parodė, kad jis buvo labai paplitęs Vokietijos, Kanados, Didžiosios Britanijos, Šiaurės Airijos kiaulių populiacijose (Allan et al., 1998). 1990 metais Kanadoje izoliuotas dar vienas tos pačios grupės virusas, nustatytas nykimo sindromo požymius turėjusioms kiaulėms. Labai greitai toks pats virusas pastebėtas ir tarp Šiaurės Amerikos bei Europos kiaulių. Monokloninių ir polikloninių antikūnų bei nukleotidų sekų analizė parodė, kad KCV1 ir naujai izoliuotas KCV2 skyrėsi antigeniškai ir genetiškai (Allan et al., 1998; 1999).

Kiaulių cirkovirusai (KCV2), priklausantys *Circoviridae* šeimai, šiuo metu pripažįstami kaip pagrindiniai ir svarbiausi nujunkytų paršelių multisisteminio nykimo sindromo sukėlėjai, dideliais kiekiais nustatomi pažeistų plaučių mėginiuose, limfiniuose mazguose, miokarde, kraujo serume ir kitur. NPMNS dažniausiai randamas nujunkytų paršelių ir ankstyvojo periodo penimų kiaulių organizme (Allan et al., 1998; Segales et al., 2005). Visais NPMNS atvejais KCV2 identifikuoti tirtuose mėginiuose. Eksperimentais taip pat įrodyta, kad NPMNS pasireiškia dažniausiai tuose ūkiuose, kur tarp kiaulių cirkuliuoja dar vienas ar keletas infekcinių ligų sukėlėjų. NPMNS pasireikšti ypač padeda su KCV2 bandoje paplitę kiaulių reprodukcijos ir kvėpavimo sindromo virusai (KRKSV) (Allan et al., 2000) ir kiaulių parvovirusai (KPV) (Allan et al., 1999b). Tas rodo, kad NPMNS trikdo paršelių imuninės sistemos funkciją, reiškiasi antriniai bakteriniai bei virusiniai susirgimai, kurie ir padaro didžiulius ekonominius nuostolius. Šiam susirgimui atsirasti būtina sąlyga yra KCV2, tačiau vien tik šio vieno viruso nepakanka NPMNS pasireišti (Segales et al., 2005).

Nujunkytų paršelių multisisteminis nykimo sindromas pastaruoju metu daro milžinišką įtaką kiaulininkystei. Apskaičiuota, kad nuostoliai dėl šios ligos per metus Europos Sąjungoje gali sudaryti 600 milijonų eurų, mat sergamumas užkrėstuose ūkiuose gali siekti iki 30 proc. o gaištamumas – nuo 70 iki 80 proc. (Quintana et al., 2001; Segalles et al., 2005). Nepaisant intensyvių tyrimų kai kuriose Europos Sąjungos šalyse, daugelis naujų jos narių, taip pat ir Lietuva, su KCV2 sukeliama NPMNS yra jau susidūrę, tačiau mokslinių tyrimų, įrodančių šių patogenų egzistavimą kiaulių populiacijoje, atlikta nebuvo. Šis

sindromas aprašytas daugelyje pasaulio šalių, įskaitant Vakarų ir Vidurio Europą (Allan et al., 1999; Segales et al., 2005).

Specifiniai KCV2 antikūnai beveik 100 proc. nustatyti visoms įvairaus amžiaus tirtoms kiaulėms. Jie rasti visose fermose, kurios dalyvavo KCV2 paplitimo tyrimuose (Larochelle et al., 2003; Sibila et al., 2004). Šis faktas įrodė, kad tradiciniai specifinių antikūnų tyrimai NPMNS atveju negali nei patvirtinti, nei paneigti NPMNS diagnozės. Plačiai paplitęs KCV2 tokiose kiaulių fermose taip pat patvirtintas ir polimerazės grandininė reakcija (PGR), leidžiančia identifikuoti KCV2 specifinius DNR regionus (Calsamiglia et al., 2002; Sibila et al., 2004).

Moksliniais tyrimais jau įrodyta, kad NPMNS diagnozę galima patvirtinti tik pagal tris pagrindinius vertinimo kriterijus: klinikinius simptomus, būdingus histopatologinius pokyčius ir tiriamojoje medžiagoje radus daug KCV2 (Segales et al., 2005). Taigi šio **darbo tikslas** – laboratoriniais tyrimų metodais įrodyti NPMNS egzistavimą Lietuvos ir Latvijos kiaulių populiacijose ir molekuliniais metodais preliminariai charakterizuoti paplitusias padermes.

Medžiagos ir metodai. Tyrimams atrinkti ne tik tie Lietuvos ir Latvijos kiaulininkystės ūkiai, kur nujunkytų paršelių grupėse pastebėti NPMNS požymiai, bet ir ūkiai, kur laboratoriniais metodais nustatyta kiaulių reprodukcijos ir kvėpavimo sindromo virusų (KRKSV) cirkuliacija nujunkytų paršelių ir pakaitinių kiaušelių grupėse.

Histopatologinis tyrimas (HE). Šiam tyrimui imami paviršinių kirkšnies, žarnų pasaito limfinių mazgų, tonzilių ir plaučių audinių mėginiai. Audiniai fiksuojami 10 proc. buferiniu formalino tirpalu, 24 val. plaunami tekančio vandens srove, perkeliama į automatinį audinių įmirkymo procesorių „Patchentre“. Pasibaigus standartinei audinių įmirkymo procedūrai, audiniai įliejami į parafiną histologinėse kasetėse ir pjaustomi mikrotomu „Thermo“ 4 mikronų storio, dažomi hematoksilino ir eozino dažais. Tiriant audinių preparatus, dažytus hematoksilinu ir eozinu, vertinama organų ir audinių histologinė struktūra, histopatologiniai pokyčiai.

KRKSV tyrimai. Kiaulių reprodukcijos ir kvėpavimo sindromo virusas buvo identifikuojamas tik nujunkytų paršelių plaučių mėginiuose atvirkštinės transkripcijos lizidine polimerazės grandininė reakcija (AT-PGR), aprašyta A. Stankevičius ir kitų tyrėjų (2003) straipsnyje. KRKSV specifiniai antikūnai buvo identifikuoti komerciniu „Ingesim PRRSV“ rinkiniu, pagal gamintojo instruk-

cijoje aprašytą metodiką.

KCV2 virusų *in situ* hibridizacija (ISH). Tyrimui panaudoti limfinių mazgų mėginiai, kuriems pritaikyta ISH technika, aprašyta C. Rosell ir kitų mokslininkų (1999). Reakcijoje panaudotas molekulinis Roche Applied Science hibridizavimo pradmuo (zondas): RepC PCV2 CCT TCC TCA TTA CCC TCC TCG CCA ACA ATA AAA TAA TCA AA. ISH teigiamai ir neigiamai kontrolei panaudoti CReSA Tyrimų centro (Barselonos universitetas, Ispanija) referentiniai limfinių mazgų pjūviai, kuriems pritaikyta ta pati ISH procedūra.

Polimerazės grandininė reakcija (PGR). PGR buvo naudojamas 50 µl reakcijos mišinys: 2,5 µl tiriamosios DNR, 2,5 µl 10xPGR buferio (100mM Tris-HCl, pH 8,8, 500 mM KCl, 0,8% nonidet P40, Fermentas), 1,5 µl MgCl₂ (50 mM, Fermentas), 1,0 µl dNTPs (5 mM, Fermentas), po 1,25 µl (10 pmol) kiekvieno PCV7 (5'-GCC AGT TCG TCA CCC TTT C-3') arba PCV17 (5'-CTC CCG CAC CTT CGG ATA T-3') pradmens, 0,15 µl (5 U/µl) Taq DNA polimerazės (Fermentas), 14,85 µl DEPC vandens. 5 min. 94°C temperatūroje buvo atliekama pradinė denatūracija ir 35 ciklai amplifikavimo: denatūracija 94°C temperatūroje 30 sek., 64°C temperatūroje 1 min. hibridinimas, 72°C temperatūroje 30 sek. pradmenų išplėtimas. Reakcijos pabaigoje 72°C temperatūroje 7 min. buvo atliekamas pradmenų išplėtimas.

PGR produktai buvo analizuojami 1,5 proc. agarozės gelyje (Top Vision™ GQ Agarose, Fermentas), dažytame etidžio bromidu (koncentracija 1 µg/ml). 10 µl PGR produkto 1xTBE buferyje (90mM Tris, 90mM boro rūgštis, 2 mM EDTA) buvo atliekama elektroforezė, 45 min. leidžiant 120 V srovę. PGR rezultatai buvo matomi UV lempos spinduliuose, esant specifiniam DNR juostelių švytėjimui 656 bp pozicijoje ir naudojant molekulinį žymeklį (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas) atitinkančiose pozicijose.

Realaus laiko PGR. Buvo naudojamas 25 µl reakcijos mišinys: 2,5 µl tiriamosios DNR, po 900 nM (2,25 µl) kiekvieno pradmens (PCV2F ir PCV2R) ir 150 nM (0,38 µl) PCV2-P pradmens, 18 SrDNA 0,4 µl, universalus realaus laiko „Master Mix“ (Applied Biosystem) 12,5 µl, į kurio sudėtį įėjo auksinė DNR polimerazė, dNTP_s su UTP, MgCl₂, ROX, Amperase UNG ir buferiai. Reakcijai įvykdyti ir PCV2 kopijų kiekiui nustatyti buvo naudojami realaus laiko standartai: 20 µg/ml arba 10¹¹ koncentracijos KCV2 plazmidė, kuri 10 kartų skiedžiama, ir KCV2 ląstelių kultūra (10^{4.4} TCID₅₀). Mėginiai buvo amplifikuojami 95°C temperatūroje 10 min; 2 min 50°C temperatūroje ir 40 ciklų 95°C 15 sek., 60°C temperatūroje 1 min.

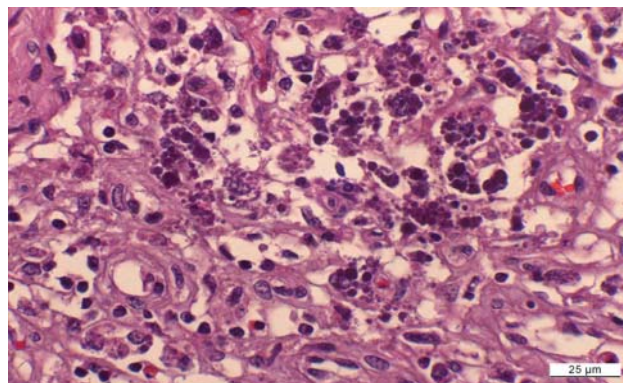
Realaus laiko PGR panaudoti pradmenys: PCV2-F (CCAGGAGGGCGTTGTGACT, pozicija PCV2 genome 1535-1553), PCV2-R (CGCTACCGTTGGAGAAGGAA, pozicija PCV2 genome 1633-1614), PCV2-P (FAM-AATGGCATSTTCAACACCCGCTCT-TAMRA, 1612-1592).

Nukleotidų sekų nustatymas. Prieš nustatant pasirinktų regionų nukleotidų sekas, PGR produktai, atlikus elektroforezę 1,5 proc. agarozės gelyje, buvo išplaunami nuo pašalinių druskų. Specifinės molekulinės masės PGR produktų juostelės išpjaunamos ir juose esanti DNR suren-

kama 0,45 µl „Ultrafree-MC“ specialiais filtriniais mėgintuvėliais (Millipore). Gelyje išvalytų, bet neklonuotų PGR produktų nukleotidų sekos buvo nustatytos „BigDye Terminator Cycle Sequencing“ rinkiniu (v2.0, Applied Biosystems) ir ABI310 genetiniu analizatoriumi (Applied Biosystems), esančiu Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre. Toliau gautos sekos buvo tvarkomos kompiuterine programa „SeqMan“ (Lasergene paketo programa, DNASTAR Inc.).

Statistinė duomenų analizė. CLUSTAL X programa buvo panaudota sekų analizei ir palyginimui. Gautos nukleotidų sekos buvo lyginamos su „GenBank“ pateiktomis sekomis, kurios reprezentavo įvairias PCV2 filogenetines grupes (Olvera et al., 2007). Filogenetinis medis konstruotas „CLC Gene Free Workbench“ kompiuterine programa (v4.0.1, CLC bio A/S, Aarhus, Danija).

Rezultatai. Tyrimams atrinkti mėginiai iš keturių Lietuvos ir keturių Latvijos kiaulininkystės ūkių pirmiausia buvo ištirti histopatologiškai. Tiriamuose 8 LT ir 11 LV limfinių mazgų mėginiuose buvo nustatyti KCV2 infekcijai būdingi pokyčiai: limfinio audinio degeneracija ir koaguliacinė nekrozė, pažeidimo vietoje ryški histiocitų, kai kur gigantiškų makrofaginių ląstelių infiltracija. Be to, šešiuose mėginiuose (3 LT ir 3 LV) buvo aiškiai matomi intracitoplazminiai bazofiliški įterptiniai kūneliai (1 pav.). ISH visuose tirtuose limfiniuose mazguose parodė vidutinį arba didelį kiekį KCV2 nukleino rūgštis (2 pav.). Tyrimo rezultatai KRKSV atžvilgiu buvo teigiami visuose kiaulių ūkiuose, kur pasireiškė NPMNS klinikiniai požymiai (Lentelė). Daugumoje plaučių mėginių, kuriuose nustatyta daug KCV2, AT-PGR lizdine reakcija kartu buvo identifikuotas ir KRKSV.

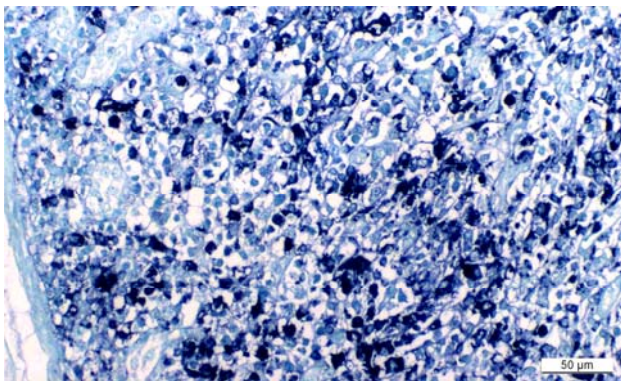


1 pav. Limfinio audinio degeneracija, limfocitų skaičiaus sumažėjimas, įterptinių kūnelių sankaupos. Limfinis mazgas. Dažyta hematoksilinu ir eozinu

Realaus laiko PGR nustatytas KCV2 kiekis plaučiuose ir kraujo serumo mėginiuose parodė ne mažesnę nei 10⁷ KCV2 kopijų kiekį ml (Lentelė). Kokybinė PGR leido pagausinti LT ir LV ūkiuose paplitusių KCV2 virusų *cap* geno fragmentą tik iš tų mėginių, kuriuose KCV2 buvo ne mažiau nei 10⁷ KCV2 kopijų ml.

Plaučių, kraujo serumo ir limfmazgių mėginiai, paimti iš Lietuvos kiaulininkystės kompleksų ir stambių Latvijos kiaulininkystės ūkių, kuriuose pasireiškė NPMNS būdingi požymiai, parodė gana didelį KCV2 kiekį realaus laiko

PGR. Serumo tyrimai parodė, kad KCV2 kraujo serume buvo nuo $3,41 \times 10^6$ iki $5,50 \times 10^6$ KCV2 kopijų/ml, o plaučių mėginiuose – $4,94 \times 10^8$ – $8,45 \times 10^8$ KCV2 kopijų/ml. Atskiruose plaučių mėginiuose, kur ISH metodu buvo nustatyta daug KCV2 DNR, parodė gana didelį $6,6 \times 10^{11}$ – $1,14 \times 10^{12}$ kiekį KCV2 kopijų/ml. Visuose tirtuose limfmazgių mėginiuose, kuriuose ISH nustatyta KCV2 DNR, rasta daugiau kaip 10^7 KCV2 genomo kopijų/ml. ISH neigiamuose mėginiuose arba mėginiuose, gautuose iš ūkių ($n=4$), kur NPMNS būdingi simptomai nebuvo pastebėti ir kur ISH bei HE nerasta KCV2, reakcijos rezultatas buvo neigiamas arba viruso rasta vos 10^2 PCV2 kopijų/ml.



2 pav. LT limfinio mazgo ISH rezultatai. Daugybė KCV2, nusidažiusių juoda spalva, matoma parafinu užlietuose histologiniuose pjūviuose

Tyrimo metu gauta KCV2 *cap* geno fragmento nukleotidų sekas iš LT ir LV kiaulių ūkių, taip pat panaudojus viešojoje duomenų bazėje „GenBank“ paskelbtas nukleotidų sekas, sukonstruotas filogenetinis medis (3 pav.). Tarp LT ($n=2$) ir LV ($n=3$) nukleotidų sekų nustatytas 90,5 proc. identiškas. LV sekos parodė 90,9–99,3 proc. nukleotidų sekų homologiškumą 1A grupei. LT nukleotidų sekos buvo 90,3–99,5 proc. homologiškos 2D grupei. Skirtingų kiaulių ūkių LV padermių sekų palyginimas parodė, kad jos yra 99,8–100 proc. tapačios. LT padermių sekos taip pat buvo nuo 99,8 iki 100 proc. panašios viena į kitą.

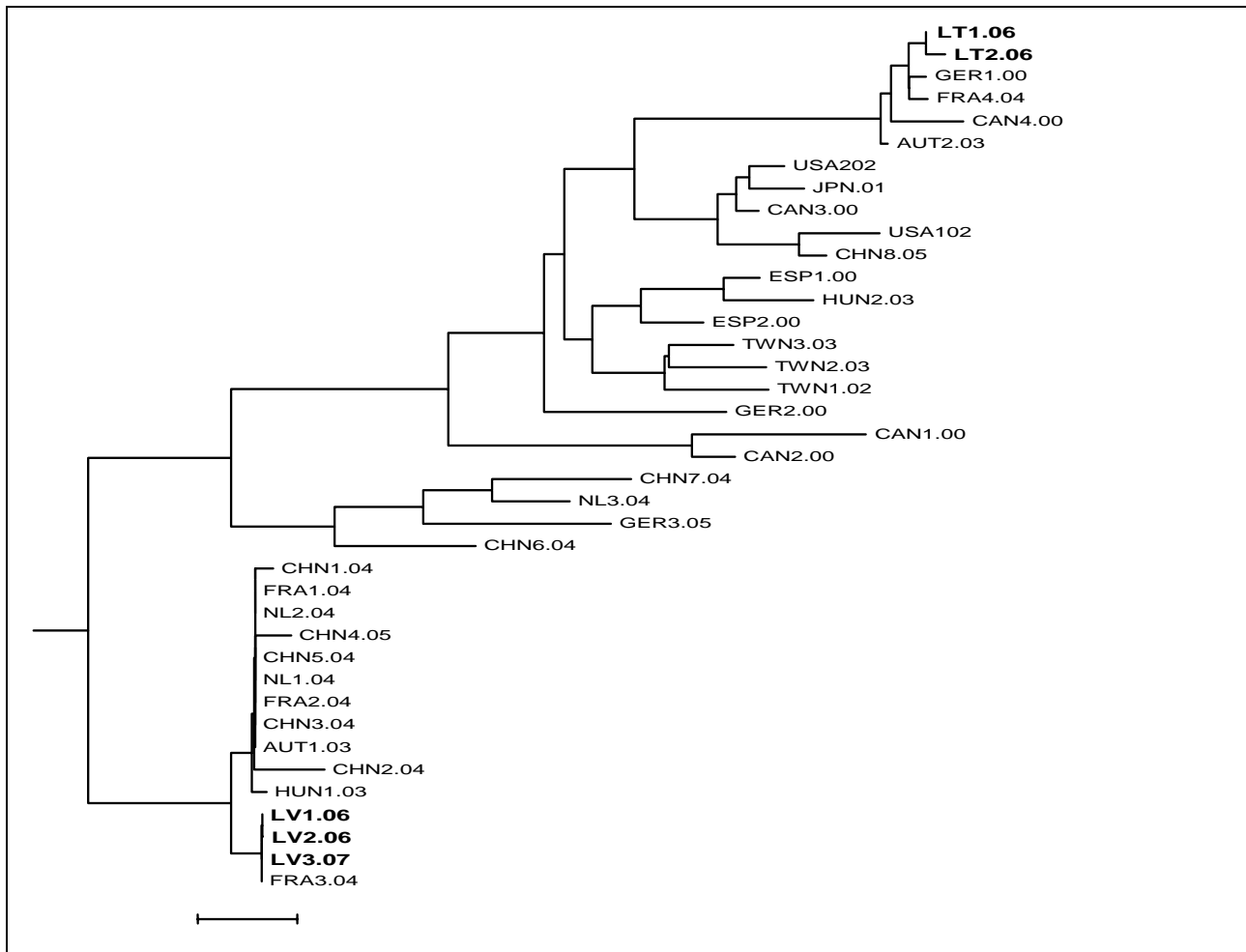
Rezultatų aptarimas. Atlikti tyrimai rodo, kad tiek Lietuvos, tiek ir Latvijos kiaulininkystės ūkiuose galima patvirtinti ir laboratoriniais tyrimų rezultatais pagrįsti NPMNS diagnozę. Mokslinėse publikacijose apibendrinti įvairių tyrimo metodų taikymo rezultatai, patvirtinantys

NPMNS, apibrėžia tris pagrindinius diagnozės patvirtinimo kriterijus: ligai būdingus klinikinius simptomus, histopatologinius pokyčius ir didelį KCV2 kiekį tiriamojame medžiagoje (Segales et al., 2005). NPMNS diagnostiką nagrinėjantys tyrimai parodė, kad diagnozei patvirtinti reikšmingi ISH, histopatologinio ir realaus laiko TaqMan PGR metodai (Rosell et al., 1999; Calsamiglia et al., 2002; Olvera et al., 2004). Mūsų tyrimai parodė, kad Lietuvos ir Latvijos ūkiuose surinkti limfmazgiai, plaučių ir kraujo serumo mėginiai turėjo daug KCV2 ISH metodu, histopatologinis tyrimas parodė NPMNS būdingus požymius. Be to, realaus laiko TaqMan reakcija leido kraujo serume ir plaučių mėginiuose nustatyti didesnę nei 10^7 KCV2 genomo kopijų kiekį/ml. Nors tikslus KCV2 kiekis NPMNS atveju dar galutinai nėra nustatytas, tačiau žinoma, kad KCV2 koncentracija limfmazgiuose, plaučiuose ar kraujo serume yra ne mažesnė už 10^6 kopijų/ml (Olvera et al., 2004; Segales et al., 2005).

Taip pat reikia paminėti, kad NPMNS diagnozę patvirtinti leidžia KCV2 ir papildomo veiksnio, t. y. KRKSV, cirkuliacija tame pačiame ūkyje. Visuose tirtuose LT ar LV ūkiuose AT-PGR reakcija buvo patvirtintas KRKSV cirkuliacija kiaulių populiacijose (Lentelė). Be to, visuose tirtuose LT ir LV ūkiuose imunofermentinė analizė buvo nustatyti specifiniai antikūnai KRKSV. Yra aprašyta potenciali KRKSV reikšmė, sąlygojanti NPMNS (Segales et al., 2002; Segales et al., 2005). KRKSV diagnozuota net 60 proc. sindromu apėmusių didelių kiaulių fermų JAV ir 20 proc. tirtų fermų vakarinėje Kanados dalyje (Larochelle et al., 2003). Mišri KCV2 ir KRKSV infekcija rasta Ispanijoje (Quintana et al., 2001), bet tikslus NPMNS mechanizmas ir KRKSV įtaka jo atsiradimui nėra išaiškinta. Aptiktas KRKSV antigenas paprastai visada lokalizuojasi plaučiuose (Segales et al., 2005). Vadinasi, KRKSV nėra susijęs su būdingais limfoidinių organų pažeidimais, kurie registruojami pasireiškus tarp kiaulių NPMNS (Allan et al., 2000). KRKSV antigeno nepavyko nustatyti NPMNS atveju daugiabranduolėse gigantiškose ląstelėse, kurios pastebimos limfiniuose mazguose (Segales et al., 2002). Daugelis tyrėjų nurodo, kad NPMNS požymiams atsirasti kiaulių populiacijoje būtina sąlyga kartu su KCV2 ūkyje paplitęs ir KRKSV arba kiaulių parvovirusai, arba kiti infekcinių ligų sukėlėjai. Be to, pastebėta, kad imuninės sistemos stimuliavimas kokia nors vakcina gali paskatinti NPMNS atsiradimą KCV2 užkrėstų kiaulių organizme (Calsamiglia et al., 2002; Larochelle et al., 2003; Segales et al., 2005).

Lentelė. Kiaulių, kurioms nustatyti NPMNS požymiai, histopatologinio, ISH, TaqMan PGR tyrimų rezultatai

Šalis (tirtų ūkių skaičius)	Bendras tirtų kiaulių skaičius	Histopatolo- giniai NPMNS po- kyčiai	ISH teigiamų kiaulių skaičius	TaqMan kiekybinė reikšmė (KCV2 kopijų/ml±SD)		KRKSV atžvil- giu teigiami ūkiai/teigiamų mėginių skaičius
				Serume $n=3$	Plaučiuose $n=3$	
LT ($n=4$)	8	8/8	7/8	$3,41 \times 10^6 \pm$ $5,50 \times 10^6$	$4,94 \times 10^8 \pm$ $8,45 \times 10^8$	4/6
LV ($n=4$)	11	11/11	10/11	$2,52 \times 10^6 \pm$ $3,72 \times 10^6$	$6,6 \times 10^{11} \pm$ $1,14 \times 10^{12}$	4/9



3 pav. LT ir LV ūkiuose paplitusių PCV2 padermių filogenetinės analizės rezultatai

90,5 proc. *cap* geno nukleotidų sekų identiškumas tarp LV ir LT KCV2 leidžia padermes suskirstyti į 1A ir 2D grupes, kurios ženkliai skiriasi patogeniškumu. Įvairioms grupėms ir subgrupėms priklausančios KCV2 nukleotidų sekos filogenetinei analizei atrinktos pagal A. Olvera ir kitų mokslininkų (2007) pateiktus duomenis

LT ir LV cirkuliuojančių KCV2 padermių preliminarius tyrimai parodė, kad jos viena nuo kitos yra nutolusios genetiškai. Nukleotidų sekų identiškumas vos 90,5 proc. leidžia jas neabejotinai priskirti dviem skirtingoms KCV2 grupėms, kurios nustatytos išanalizavus daugiau nei 140 *cap* geno sekų (Olvera et al., 2007). Molekulinė *cap* geno sekų analizė parodė, kad LT ir LV cirkuliuoja skirtingų grupių PCV2 padermės. Šiuos duomenis reikėtų laikyti preliminariais, nes kiekvienoje šalyje ištirta tik po keturis kiaulių ūkius. Kitų mokslininkų tyrimai rodo, kad net tame pačiame ūkyje gali būti nustatomos viena ar dvi KCV2 padermių grupės (Grau-Roma et al., 2007). Jau tyrimais įrodyta, kad pirmos KCV2 grupės virusai, identifikuoti tarp LV kiaulių, potencialiai gali būti daugiau patogeniški, nei LT identifikuoti antros grupės KCV2 (Grau-Roma et al., 2007; Olvera et al., 2007). Reikia pažymėti, kad būtent antros grupės KCV2 padermės dažniausiai sutinkamos kiaulininkystės ūkiuose, kur greta antros grupės KCV2 cirkuliuoja ir pirmos grupės virusai. Kadangi mūsų atlikti tyrimai apėmė tik tuos ūkius, kur paplitęs KRKSV ir kur labai aiškiai pasireiškė NPMNS simptomai, remiantis gautais rezultatais būtini papildomi

molekuliniai tyrimai, galėsiantys pateikti išsamesnę informaciją apie KCV2 padermių paplitimą kituose Lietuvos ir Latvijos kiaulininkystės ūkiuose. Jau yra duomenų apie pirmos ir antros grupių KCV2 padermes, kurios tuo pačiu metu gali cirkliuoti ne tik vienoje kiaulių fermoje, bet ir viename gyvūne. Šio reiškinio biologinę reikšmę dar reikės nustatyti.

Išvados.

1. Klinikiniai požymiai, būdingi histopatologiniai pažeidimai ir didelis KCV2 kiekis ISH ir TaqMan PGR įrodo, kad Lietuvos ir Latvijos kiaulių ūkiuose, kur cirkuliuoja KRKSV, pasireiškia nujunkytų paršelių multisistemis nykimo sindromas.

2. Filogenetinė padermių analizė leidžia KCV2 LT virusus priskirti pirmai grupei, o LV – antrai grupei, kurių patogeniškumas skiriasi, tačiau nėra iki galo aiškus.

Padėkos.

Dėkojame NMSACC-PCVDA „Specific Support Action“ (SSA), kuri 6-osios programos lėšomis parėmė Arūno Stankevičiaus vizitą į Barselonos universiteto CReSA tyrimų centrą.

Dėkojame Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui, parėmusiam KRKSV (Nr.T-71/08) tyrimus.

Literatūra

- Allan G., McNeilly F., Daft B., Clarke E., Ellis W., Haines D., Meehan B., Adair B. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1998. 10: 3–10.
- Allan G., Kennedy S., McNeilly F., Foster J., Ellis J., Kakowka S., Meehan B., Adair B. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *Journal of Comp. Pathology*. 1999b. 121:1–11.
- Allan G., McNeilly F., Ellis J., Krakowka S., Meehan B., McNair I., Walker I., Kennedy S. Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Archives of Virology*. 2000. 145: 2421–2429.
- Allan G., McNeilly F., Meehan B., Kennedy S., Mackie D., Ellis J., Clark E., Espuna E., Saubi N., Riera P., Botner A., Charreyre C. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Veterinary Microbiology*. 1999. 66:115–123.
- Calsamiglia M., Segales J., Quintana J., Rosell C., Domingo M. Detection of porcine circovirus type 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiology*. 2002. 40:1848–1850.
- Grau-Roma L., Crisci E., Sibila M., Lopez-Soria S., Nofrarias M., Cortey M., Fraile L., Olvera A., Segales J. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Veterinary Microbiology*. 2007. 128:23–35.
- Larochelle R., Magar R., D'Allaire S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. 2003. *Can. J. Vet. Research*. 67:114–120.
- Olvera A., Cortey M., Segales J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. *Virology*. 2007. 357:175–185.
- Olvera A., Sibila M., Calsamiglia M., Segales J., Domingo M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *Journal of Virological Methods*. 2004. 117:75–80.
- Quintana J., Segales J., Rosell C., Calsamiglia M., Rodriguez-Arrijoja G., Chianini F., Folch J., Maldonado J., Canal M., Plana-Duran J., Domingo M. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Rec.* 2001. 149:357–361.
- Rosell C., Segales J., Plana-Duran J., Balasch M., Rodriguez-Arrijoja G., Kennedy S., Allan G., McNeilly F., Latimer K., Domingo M. Pathological, immunological, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *Journal of Comp. Pathology*. 1999. 120: 59–78.
- Segales J., Allan G., Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Animal Health research Reviews*. 2005. 6: 119–142.
- Segales J., Calsamiglia M., Olvera A., Sibila M., Badiella L., Domingo M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Microbiology*. 2005. 111:223–229.
- Segales J., Calsamiglia M., Rosell C., Soler M., Maldonado J., Martin M., Domingo M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Veterinary Microbiology*. 2002. 85: 23–30.
- Sibila M., Calsamiglia M., Segales J., Blanchard P., Badiella L., Le Dimna M., Jestin A., Domingo M. Use of polymerase chain reaction assay and ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am. J. Vet. Research*. 2004. 65:88–92.
- Stankevičius A., Stankevičienė M., Pieškus J. Kiaulių reprodukcijos ir kvėpavimo sindromo viruso lietuviškų padermių genetiniai skirtumai ir filogenetinė analizė ORF5 ir ORF7 regionuose. *Veterinarija ir zootechnika*. 2003. 23:1–9.

Gauta 2008 11 28

Priimta publikuoti 2009 03 19