

ZNANSTVENO IZVJEŠĆE

o rezultatima provedbe pilot projekta

„Epidemijski proljev svinja: proširenost bolesti i genomika izolata“

Donositelj znanstvenog izvješća (sukladno članku 14. st. 3. Pravilnika o sadržaju, obrazloženju i objavi znanstvenih mišljenja HAH-a)

Usvojeno 19. 12. 2018.

NA IZRADI ZNANSTVENOG IZVJEŠĆA SUDJELOVALI SU:

dr. sc. Dražen Knežević, dr. med. vet., Hrvatska agencija za hranu

dr. sc. Brigita Hengl, dr. med. vet., Hrvatska agencija za hranu

dr. sc. Dragan Brnić, dr. med. vet., Hrvatski veterinarski institut

Sadržaj

| | |
|---|----|
| Uvod..... | 3 |
| Procjena rizika | 4 |
| 1. Identifikacija opasnosti..... | 4 |
| 2. Karakterizacija opasnosti | 5 |
| 3. Procjena izloženosti | 8 |
| 3.1. Provedba istraživanja o epidemijskom proljevu svinja | 8 |
| 3.1.1. Materijali i metodologija istraživanja | 8 |
| 3.2. Rezultati | 10 |
| 3.2.1. Rezultati serološkog pretraživanja uzoraka seruma | 10 |
| 3.2.2. Rezultati sekvenciranja nove generacije i analize viroma | 12 |
| 3.2.3. Rezultati umnožavanja S dijela genoma, Sanger sekvenciranja i filogenetske analize | 13 |
| 3.3. Rasprava | 15 |
| Zaključci..... | 17 |
| Preporuke | 18 |
| Literatura | 19 |

Uvod

Epidemijski proljev svinja (engl. *Porcine Epidemic Diarrhoea*, PED) iznimno je kontagiozna zarazna bolest svinja uzrokovana virusom iz porodice *Coronaviridae* (rod *Alphacoronavirus*). Bolest se klinički očituje akutnim proljevom, povraćanjem, dehidracijom i visokim mortalitetom u sisajuće prasadi (Jung i Saif, 2015).

Iako postoje značajne razlike u patogenosti pojedinih izolata virusa epidemijskog proljeva svinja, osim genotipske varijante uzročnika, čimbenici važni za pojavu, tijek bolesti i u konačnici gubitke u proizvodnji su i dob životinje, imunost status stada, način upravljanja stadom te biosigurnosti i sanitarni uvjeti na farmi (EFSA, 2014). U nekim slučajevima morbiditet i mortalitet mogu dosegnuti i 100 %, iako se najviši mortalitet obično javlja kod sisajuće prasadi do 10 dana starosti (Song i Park, 2012).

Epidemijski proljev svinja bolest je za koju ne postoji obveza prijavljivanja njene pojave na razini Europske unije te nije na listi bolesti Svjetske organizacije za zdravlje životinja (OIE). Obvezu prijave su na nacionalnoj razini uvele Francuska, Finska, Irska i Švedska (EFSA, 2016), a krajem 2015. godine i Engleska i Škotska (DEFRA, 2016). Iako je po prvi puta dokazana još davne 1971. godine u Velikoj Britaniji (Oldham, 1972), ova bolest privukla je pozornost široke stručne javnosti tek 2013. godine kada se pojavila u SAD-u i uzrokovala velike gubitke u svinjogojstvu s posljedičnim rastom tržišnih cijena svinjetine (gotovo 10 % populacije svinja izgubljeno je u jednoj godini epidemije epidemijskog proljeva svinja, odnosno približno sedam milijuna svinja) (Jung i Saif, 2015). Epidemije sličnih razmjera prethodno su zabilježene u Aziji (Jung i Saif, 2015), a nama najbliže u Ukrajini 2014. godine, kada je na jednoj farmi od 5.000 krmača izgubljeno ukupno 30.000 sisajuće prasadi (Dastjerdi i sur., 2015). U zemljama Europske unije, u zadnje dvije godine virus epidemijskog proljeva svinja dokazan je u Austriji, Njemačkoj, Belgiji, Nizozemskoj, Španjolskoj, Portugalu, Francuskoj, Italiji i Sloveniji, dok je u Republici Hrvatskoj virus je po prvi puta dokazan u travnju 2016. godine u Osječko-baranjskoj županiji (Brnić i sur., 2016). Po prijavi sumnje nakon pojave vodenastog proljeva virusne etiologije, na Odjelu za virologiju Hrvatskog veterinarskog instituta obavljeno je molekularno dokazivanje virusa epidemijskog proljeva svinja, transmisivnog gastroenteritisa svinja i rotavirusa A, kao najznačajnijih uzročnika proljeva svinja identične kliničke manifestacije. Polučen je pozitivan rezultat na prisutnost genoma virusa epidemijskog proljeva svinja, odnosno dokazana je prisutnost nukleokapsidnog (N) i „spike“ (S) dijela genoma virusa (Brnić i sur., 2016). Obzirom da je genotip virusa epidemijskog proljeva svinja jedan od najbitnijih čimbenika kod procjene tijeka bolesti i konačne štete u proizvodnji, iznimno je važno pristupiti utvrđivanju slijeda nukleotida postupkom sekvenciranja S dijela genoma ili cijelog genoma virusa.

Opći cilj istraživanja pilot projekta bio je doprinijeti manjoj pojavnosti virusnih proljeva svinja i posljedičnih šteta u uzgojima svinja Republike Hrvatske.

Provedbom sljedećih specifičnih ciljeva pilot projekta proširene su spoznaje o pojavnosti epidemijskog proljeva svinja u RH, istaknuti su glavni rizici te su donesene preporuke, što svakako pridonosi ostvarenju općeg cilja pilot projekta:

1. Utvrditi proširenost epidemijskog proljeva svinja, odnosno utvrditi stupanj izloženosti populacije svinja na području Osječko-baranjske i Vukovarsko-srijemske županije;
2. Definirati značajke genoma prvog referentnog autohtonog izolata virusa epidemijskog proljeva svinja, dokazanog u Republici Hrvatskoj.

Nakon provođenja projektnih aktivnosti i analize rezultata, utvrđena je prethodna izloženost populacije svinja virusu epidemijskog proljeva svinja u Osječko-baranjskoj i Vukovarsko-srijemskoj županiji, na temelju dokazivanja prisutnosti specifičnih protutijela te su određene značajke dijela genoma prvog referentnog autohtonog izolata virusa epidemijskog proljeva svinja u Republici Hrvatskoj.

Utvrdjeni rezultati značajni su za hrvatsko svinjogojstvo jer daju važno polazište za procjenu rizika od moguće pojave i širenja epidemijskog proljeva svinja u ostatku zemlje.

Procjena rizika

1. Identifikacija opasnosti

Virus epidemijskog proljeva svinja pripada rodu *Alphacoronavirus*, porodica *Coronaviridae*. Virus posjeduje jednolančani pozitivni RNA genom, veličine 28 kb u sklopu virusne čestice s lipidnom ovojnicom (Lee, 2015). Postoje različite podjele na razini genotipa, pa se tako virus epidemijskog proljeva svinja može svrstati u dva genotipa (G1 i G2), s po dvije podgrupe (Lee, 2015) ili se jednostavno može podijeliti u četiri skupine: povijesni/klasični izolati (dokazani 70-tih godina prošlog stoljeća u Europi i Aziji), non-INDEL izolati (bez insercija i delecija u S1 regiji genoma, visoko patogeni, prvi puta dokazani u Kini i potom prošireni po Aziji, Sjevernoj i Južnoj Americi te nama najbliže u Ukrajini), INDEL izolati (insercije i delecije u S1 regiji genoma, nisko patogeni izolati, prvi puta dokazani u SAD-u te potom u Europi i Aziji) i ostale genotipske varijante (Lin i sur., 2016).

Posljednjih nekoliko godina u različitim zemljama utvrđena je pojava epidemijskog proljeva svinja, uzrokovanog različitim sojevima virusa epidemijskog proljeva svinja, s različitim stupnjevima utjecaja na proizvodnju svinja. Svi dokazani izolati virusa u zemljama Europske unije međusobno su visoko podudarni te pripadaju genotipskoj skupini INDEL izolata (EFSA, 2016). Premda se ovi izolati smatraju slabije patogenima, u Europi su uzrokovali različite posljedice na razini uzgoja u rasponu mortaliteta 0-84 % (prosječno 19 %) (EFSA, 2016). U Republici Hrvatskoj virus je po prvi puta dokazan u travnju 2016. godine u Osječko-baranjskoj županiji (Brnić i sur., 2016).

Virus epidemijskog proljeva svinja osjetljiv je na formalin (1 %), bezvodni natrijev karbonat (4 %), lipidna otapala, jodofore u fosfornoj kiselini (1 %) te natrijev hidroksid (2 %). Izvan domaćina virus

može preživjeti tijekom različitih vremenskih razdoblja, ovisno o temperaturi i relativnoj vlažnosti (na primjer, može preživjeti najmanje 28 dana u gnojnici na 4 °C, 7 dana u suhoj krmnoj smjesi kontaminiranoj fecesom na 25 °C, do 14 dana pri 25 °C u vlažnoj hrani za životinje i najmanje 28 dana u vlažnoj smjesi za hranjenje na 25 °C). Virus gubi infektivnost iznad 60 °C, a stabilan je pri pH 6,5 - 7,5 na 37 °C i pH 5 - 9 na 4 °C (Goyal, 2014; OIE, 2014; Dee i sur., 2015; Lee, 2015; Tun i sur., 2016).

Domaće svinje jedini su poznati domaćin virusa epidemijskog proljeva svinja. Pojava epidemijskog proljeva svinja u divljih svinja nije zabilježena. Virus epidemijskog proljeva svinja nema zoonotski potencijal i ne predstavlja rizik za zdravlje ljudi ili sigurnost hrane (OIE, 2014).

Do izravnog prijenosa uzročnika dolazi oralno fekalnim putem. Do neizravnog prijenosa dolazi preko transportnih sredstava, koja mogu biti kontaminirana, uključujući kamione za prijevoz, kao i preko osoblja koje je u kontaktu s inficiranim svinjama, opreme ili druge vrste kontaminiranih stvari, uključujući i hranu za životinje (Dee i sur., 2014; Lowe i sur., 2014; OIE, 2014; Dee i sur., 2015; Zentkovich i sur., 2016). Utvrđeno je da su onečišćena vozila koja se koriste za prijevoz svinja važan čimbenik rizika za širenje bolesti. Procjenjuje se da razdoblje inkubacije može varirati između 1 - 4 dana (OIE, 2014), odnosno 1 - 7 dana (non-INDEL izolati) ili 5 - 8 dana (povijesni/klasični izolati iz 70tih soj) (Jung, i Saif, 2015). Infekcijsko razdoblje može trajati između 6 i 35 dana nakon prvog pojavljivanja kliničkih znakova (OIE, 2014).

Postmortalni nalaz u svinja s akutnim tijekom bolesti sličan je nalazu kod transmisivnog gastroenteritisa svinja, a može uključivati stanjenu stijenku tankog crijeva zbog atrofije crijevnih resica (uglavnom ograničeno na tanko crijevo), prisutnost neprobavljenog mlijeka u želucu i vodenasti crijevni sadržaj (OIE, 2014).

Epidemijski proljev svinja klinički se ne razlikuje od ostalih gastroenteroloških bolesti svinja, uzrokovanih virusom transmisivnog gastroenteritisa svinja, rotavirusima, bakterijama (*Clostridium* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., *Brachyspira* spp., *Lawsonia intracellularis*, itd.) ili parazitima (*Isospora suis*, *Cryptosporidium* spp, nematode itd.). Radi konačne dijagnoze potrebno je provesti laboratorijska ispitivanja.

2. Karakterizacija opasnosti

Klinički znakovi bolesti prvenstveno ovise o patogenosti virusa, ali i drugim parametrima kao što su proizvodni sustav, biosigurnosne mjere, vrijeme otkrivanja izbijanja bolesti, način upravljanja gospodarstvom te veličina stada (Chae i sur., 2000; Jung i sur., 2006, b; Song i sur., 2007; Ayudhya i sur., 2012; Stevenson i sur., 2013; Wang i sur., 2013; Williamson i sur., 2013; Dufresne i Robbins, 2014; McOrist, 2014).

Oralni unos virusa rezultira virusnom replikacijom u epitelnim stanicama tankog i debelog crijeva, što uzrokuje degeneraciju enterocita i posljedično skraćivanje crijevnih resica. Takav patološki razvoj uzrokuje kliničku manifestaciju bolesti, uključujući vodenasti proljev. Razina jačine kliničkih znakova

bolesti u stadu je promjenjiva i značajno je ovisna o dobi zaraženih svinja i razini imuniteta u populaciji. Wang i sur. (2014) navode kako je moguće da određene delecije, insercije i mutacije unutar genoma virusa pridonose smanjenju ili povećanju razine kliničkih znakova u prasadi.

Sisajuća prasad

Pojam „sisajuća prasad“ odnosi se na životinje od trenutka prašenja do trenutka odbića. Na vrhuncu epidemije, morbiditet u populaciji sisajuće prasadi obično iznosi do 100 % (EFSA, 2014; Jung i Saif, 2015). Bolest karakterizira vodenasti proljev, koji nije mukozan i hemoragičan, ali koji sadrži neprobavljeno mlijeko te povraćanje (ne u svih zaraženih životinja) (Duy i sur., 2011; Sun i sur., 2012; Stevenson i sur., 2013; Wang i sur., 2013; Yang i sur., 2013; Dufresne i Robbins, 2014; Lin i sur., 2014). Proljev uzrokuje tešku dehidraciju i opću slabost koja može dovesti do uginuća. Mortalitet može doseći i do 100 % ovisno o genotipu u prva 2 - 3 dana nakon prašenja (Martelli i sur., 2008; Stevenson i sur., 2013; EFSA, 2016). Do pojave letargije i teškog vodenastog proljeva može doći unutar 12 - 24 sata nakon infekcije, s povremenim povraćanjem kod nekih prašćića od 24 do 48 sata nakon infekcije. Gubitak tjelesne kondicije i dehidracija očigledni su od 48 do 72 sata nakon infekcije.

Odbijena prasad

Pojam „odbijena prasad“ odnosi se na životinje od vremena odbića do dobi 60 - 80 dana. Zabilježene su stope morbiditeta do 90 % kod životinja od 28 do 75 dana starosti (EFSA, 2014). Od kliničkih znakova prisutni su vodenasti proljev, koji nije mukozan i hemoragičan, i povraćanje kod nekih životinja, koji su popraćeni anoreksijom i letargijom. Većina zahvaćene prasadi se oporavlja otprilike tjedan dana nakon infekcije (Hesse i sur., 2014), tako da smrtnost u odbijene prasadi iznosi 1 - 3 % (Pospischil i sur., 2002; Martelli i sur., 2008; Stevenson i sur., 2013). Tri tjedna stara odbijena prasad može dobiti proljev nakon 48 sati od infekcije, kojeg može pratiti povraćanje 2 - 3 dana nakon infekcije. Morbiditet, koji uključuje letargiju, anoreksiju i vodenasti proljev, doseže maksimum 6 dana nakon prve infekcije u stadu, te opada 10 dana nakon infekcije. Oboljele životinje pokazuju značajno smanjenje prosječnog dnevnog prirasta tijekom prvog tjedna nakon infekcije u usporedbi s neoboljelim životinjama (Madson i sur., 2014).

Tovljenici i odrasle svinje

Pojam „tovljenici i odrasle svinje“ odnosi se na svinje od 60 do 80 dana starosti do doba klanja i podrazumijeva i krmače i nerastove. Morbiditet može biti varijabilan, ali u osjetljivoj populaciji može doseći stopu do 90 %, pokazujući tipične kliničke znakove epidemijskog proljeva svinja (povišena temperatura, anoreksija, letargija, vodenasti proljev i u manjoj mjeri povraćanje) nekoliko dana nakon infekcije (Martelli i sur., 2008; Stevenson i sur., 2013). Učinak virusa epidemijskog proljeva svinja na epitelne stanice crijevnih resica isti je kod mlade prasadi i kod odraslih svinja, ali težina bolesti ovisi o sposobnosti stanica u bazi crijevnih resica da se diferenciraju u zrele stanice i migriraju na vrh crijevne resice, vraćajući anatomiju i fiziološku funkciju crijevnih resica. Upravo je zbog brže regeneracije crijevnih resica kod starijih životinja (3 - 4 dana) u odnosu na mlade (6 - 7 dana i više), težina bolesti

manja (Kelly i sur., 1972). Kod tovljenika i odraslih životinja smrtnost iznosi do 4 % (Martelli i sur., 2008; Lin i sur., 2014).

Širenje virusa epidemijskog proljeva svinja

Širenje virusa epidemijskog proljeva svinja odvija se uglavnom putem zaraženih životinja i njihovog fecesa. Infektivni virus može preživjeti i u gnojnici, ali trenutno nema podataka o ulozi ovog matriksa u širenju virusa epidemijskog proljeva svinja. Visoke razine infektivnog virusa epidemijskog proljeva svinja utvrđene su u fecesu, što može pridonijeti kontaminaciji raznih objekata, transportnih vozila, opreme, ljudi i hrane za životinje. RNA virusa epidemijskog proljeva svinja otkrivena je u niskim razinama u serumskoj frakciji pune krvi, ali do sada nije bilo podataka koji su zabilježili infektivni virus u ovom matriksu (EFSA, 2014).

Infektivni virus epidemijskog proljeva svinja utvrđen je i u zraku, uzorkovanom u eksperimentalnim uvjetima, pa se stoga smatra da se virus epidemijskog proljeva svinja može prenijeti zrakom na kratke udaljenosti. Niske razine RNA virusa epidemijskog proljeva svinja utvrđene su u ejakulatu, ali nema dostupnih podataka o prisutnosti infektivnog virusa epidemijskog proljeva u ovom matriksu (EFSA, 2014).

Trenutačno ne postoje dostupni podaci o prisutnosti virusa epidemijskog proljeva svinja u embrijima, svinjskom mesu ili drugim vrstama matriksa koji bi mogli biti korišteni u proizvodnji hrane za životinje, poput hidroliziranih proteina, masti, želatine i kolagena (EFSA, 2014).

Iako je u Republici Hrvatskoj Pravilnikom o mjerama za otkrivanje, suzbijanje i iskorjenjivanje KSK (Narodne novine br. 187/04 i 123/08) zabranjeno korištenje napoja u hranidbi svinja EFSA (2014) navodi kako se može pretpostaviti da napoj koji sadrži netretirana svinjska crijeva može sadržavati infektivni virus epidemijskog proljeva svinja. Iako trenutačno nema podataka o ulozi ovog matriksa u širenju epidemijskog proljeva svinja potrebno se pridržavati odredbe o zabrani korištenja napoja u hranidbi svinja.

Nakon uvođenja zaraženih svinja u nezaraženo stado, klinički znakovi obično se javljaju u roku od četiri do šest dana (Martelli i sur., 2008; Geiger i Connor, 2013). U većini slučajeva klinički znakovi pojavljuju se prvenstveno kod prasadi, nakon čega dolazi do pojave kliničkih znakova oboljenja i kod drugih kategorija. U nekim se slučajevima proljev može prvo primijetiti kod suprasnih krmača, a potom i u prasilištima (Martelli i sur., 2008; Dufresne i Robbins, 2014). Cijelo se stado može brzo zaraziti. Očekuje se da će se prosječna početna smrtnost prije odbića kretati u rasponu od 30 do 80 %, što se smanjuje nakon razvijanja zaštitnog imuniteta (Pospischil i sur., 2002; Martelli i sur., 2008; Gao i sur., 2013; Stevenson i sur., 2013). Infekcije virusom epidemijskog proljeva svinja postupno će nestati kad se dostigne dostatna razina imuniteta stada (EFSA, 2014).

Endemična infekcija može se pojaviti u stadima s kontinuiranim proizvodnim sustavom, a klinički se znakovi mogu pojaviti kod nedavno odbijene prasadi kada opadne zaštitni laktogeni imunitet.

Zaražene svinje koje pokazuju umjerene kliničke znakove oboljenja (proljev) s malom ili nikakvom smrtnošću obično razvijaju prirodni aktivni imunitet u roku od dva tjedna (Martelli i sur., 2008). S druge strane, uvođenje novih osjetljivih životinja može dovesti do ponovnog pojavljivanja epidemijskog proljeva svinja u stadu (Pijpers i sur., 1993; Martelli i sur., 2008).

Dodatno, rezultati istraživanja kojeg su proveli Crawford i sur., (2015) slažu se s nedavnim opažanjima drugih znanstvenika, koji ukazuju na to da asimptomatsko širenje virusa dodatno otežava postupak upravljanja bolesti u cjelokupnoj svinjogojskoj proizvodnji. Istraživanje Crawford i sur. (2015) također pokazuje da svinje vrlo lako mogu postati zaražene virusom epidemijskog proljeva svinja, što objašnjava brzi prijenos unutar farme i među farmama.

3. Procjena izloženosti

3.1. Provedba istraživanja o epidemijskom proljevu svinja

Opći cilj istraživanja pilot projekta

Opći cilj istraživanja pilot projekta bio je doprinijeti manjoj pojavnosti virusnih proljeva svinja i posljedičnih šteta u uzgojima svinja Republike Hrvatske.

Specifični ciljevi pilot projekta

Provedbom sljedećih specifičnih ciljeva pilot projekta proširene su spoznaje o pojavnosti epidemijskog proljeva svinja u RH, istaknuti su glavni rizici te su donesene preporuke, što svakako predstavlja značajan doprinos ostvarenju općeg cilja pilot projekta:

1. Utvrditi proširenost epidemijskog proljeva svinja, odnosno utvrditi stupanj izloženosti populacije svinja na području Osječko-baranjske i Vukovarsko-srijemske županije;
2. Definirati značajke genoma prvog referentnog autohtonog izolata virusa epidemijskog proljeva svinja, dokazanog u Republici Hrvatskoj.

Utvrdjivanjem prvog hrvatskog referentnog genoma ili S dijela genoma virusa epidemijskog proljeva svinja stvorila bi se baza, odnosno polazna točka za daljnje filogenetske usporedbe novo-dokazanih izolata te bi se omogućilo praćenje pojave mutacija i rekombinacija.

3.1.1. Materijali i metodologija istraživanja

Materijal

• Uzorci krvi domaćih svinja

Kako bi se utvrdila prisutnost protutijela u domaćih svinja s područja Osječko-baranjske i Vukovarsko-srijemske županije, prikupljeno je ukupno 266 uzoraka krvi domaćih svinja podrijetlom iz 39 različitih uzgoja (osam velikih farmskih uzgoja i 31 malih dvorišnih uzgoja). Uzorci krvi domaćih svinja bili su uzorkovani od krmača (N=185) i tovljenika (N=81). Krmače su bile podrijetlom iz 35 uzgoja (pet

farmskih i 30 dvorišnih uzgoja), tovljenici iz tri uzgoja (dva farmska i jedan dvorišni uzgoj), a jedan farmški uzgoj imao je zastupljene obje kategorije svinja.

Uzorkovanje je u većem dijelu provedeno sa svrhom utvrđivanja seroprevalencije od 10 % uz razinu povjerenja od 95 %, uz iznimku dva farmska uzgoja gdje je broj uzoraka odgovarao kriteriju utvrđivanja seroprevalencije od 20 % (razina povjerenja 95 %). Jedan farmški uzgoj u Osječko-baranjskoj županiji s više od 1200 krmača nije zadovoljio gore navedene statističke kriterije jer je prikupljeno svega tri uzorka podrijetlom od krmača. Prosječan broj uzoraka po velikom farmškom uzgoju bio je 18,8 (od 3 do 32), a po dvorišnom uzgoju 3,7 (od 1 do 12). Uzorci su uzimani od nasumično odabranih zdravih svinja (bez znakova općeg infekcijskog sindroma i proljeva).

Vađenje krvi provedeno je iz jugularne vene u sterilne plastične epruvete bez antikoagulansa, a uzorci seruma su po zaprimanju odvojeni od staničnih dijelova krvi te su pohranjeni pri temperaturi -20 °C do pretrage imunoenzimnim testom.

- **Uzorci fecesa**

U svrhu utvrđivanja genomike prvog izolata virusa epidemijskog proljeva svinja u Republici Hrvatskoj, korišten je arhivski uzorak fecesa domaće svinje (dobna kategorija sisajuće prasadi), koji je molekularnim metodama (RT-PCR u stvarnom vremenu) polučio pozitivan rezultat na prisutnost genoma virusa epidemijskog proljeva svinja u travnju 2016. godine (Brnić i sur., 2016). Do trenutka korištenja u svrhu provedbe ovog projekta, uzorak je bio pohranjen na -80 °C u laboratoriju Odjela za virologiju, Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu.

Metode

- ***Dokazivanje protutijela za virus epidemijskog proljeva svinja***

U postupku dokazivanja IgG protutijela za virus epidemijskog proljeva svinja korišten je komercijalno dostupni imunoenzimni komplet *ID Screen® PEDV Indirect ELISA test* (IDVet, Francuska). Uzorci su pripremljeni i pretraženi sukladno preporukama proizvođača navedenog ELISA kompleta. Rezultati su očitani na spektrofotometru Tecan Sunrise (Tecan, Njemačka).

- ***Genomika prvog izolata virusa epidemijskog proljeva svinja u Republici Hrvatskoj***

- ***Next Generation Sequencing (NGS) i bioinformatička obrada***

Cijeli postupak pripreme uzorka fecesa za sekvenciranje nove generacije (Next Generation Sequencing) detaljno je prikazan u radu autora (Lojkić i sur., 2016). Sekvenciranje je provedeno na MiSeq uređaju (Illumina, SAD). Bioinformatička obrada utvrđenih rezultata i analiza viroma provedena je pomoću Geneious programske podrške (Kearse i sur., 2012).

- ***PCR umnožavanje S dijela genoma, Sanger sekvenciranje i filogenetska analiza***

Umnožavanje cijelog S dijela genoma virusa epidemijskog proljeva svinja (arhivski uzorak fecesa domaće svinje 04/2016) provedeno je u tri dijela koristeći dva seta prethodno publiciranih početnica

(Chen i sur., 2014) i jedan set koji je dizajniran za potrebe ovog istraživanja (Tablica 1). Pri tome su korišteni reagensi Qiagen One-Step RT-PCR kit (Qiagen, Njemačka).

Tablica 1: Početnice korištene u svrhu umnožavanja S dijela genoma virusa epidemijskog proljeva svinja

| Naziv početnice | 5'-3' nukleotidni slijed početnice | Referenca |
|-----------------|------------------------------------|-------------------|
| PEDV-S1F | GTGGCTTTTCTAATCATTTGGTC | Chen i sur., 2014 |
| PEDV-S1R | CTGGGTGAGTAATTGTTTACAACG | Chen i sur., 2014 |
| PEDV-S1/2F | AACCATGTACAGCTAATTGC | Ovo istraživanje |
| PEDV-S1/2R | ACCCATTGATAGTAGTGTCAG | Ovo istraživanje |
| PEDV-S2F | GGCCAAGTCAAGATTGCACC | Chen i sur., 2014 |
| PEDV-S2R | AGCTCCAACCTCTTGGACAGC | Chen i sur., 2014 |

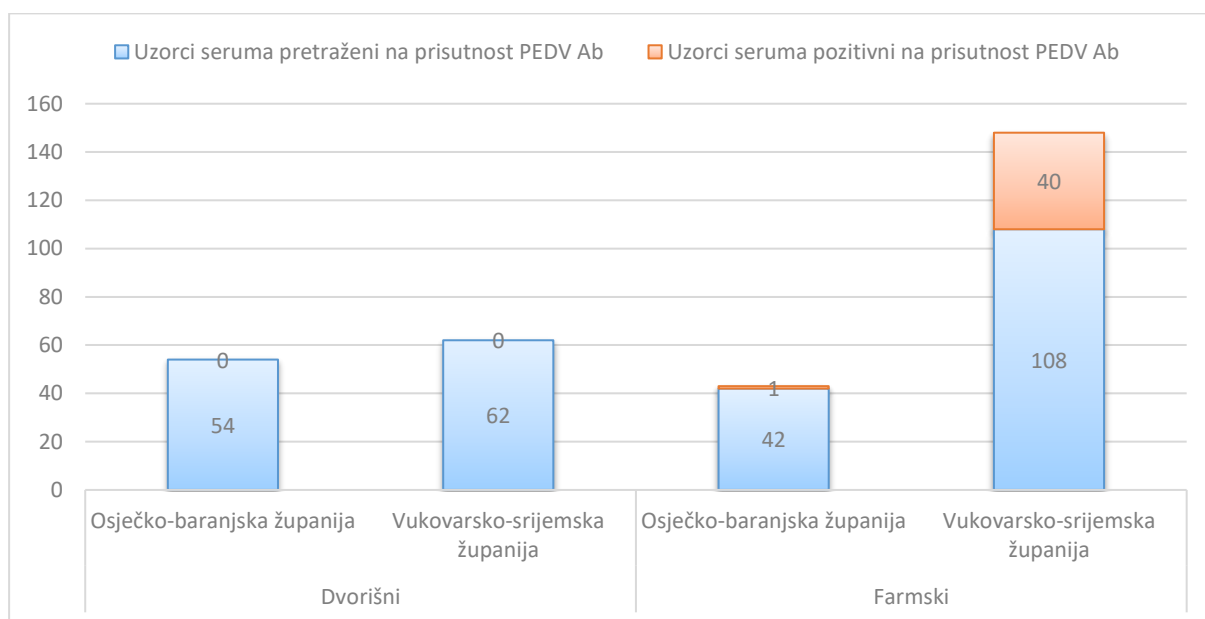
Umnožavanje je provedeno na PCR uređaju GeneAmp 9007 (Applied Biosystems, SAD), koristeći prethodno opisani temperaturni režim (Chen i sur., 2014) za setove početnica opisane u istom radu. Za početnice koje su dizajnirane za potrebe ovog istraživanja (PEDV-S1/2F i PEDV-S1/2R) korišten je sljedeći temperaturni protokol: 50°C/30 min; 95°C/15 min; 40 ciklusa 94°C/30 s, 50°C/30 s, 72°C/1 min; 72°C/10 min.

PCR produkti pročišćeni su pomoću reagenasa QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Njemačka) i ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (Affimetrix, SAD) te su poslani na klasično Sanger sekvenciranje u oba smjera u tvrtku Macrogen (Amsterdam, Nizozemska). Po primitku, rezultati su početno provjereni pomoću BLASTn algoritma (*engl. Basic Local Alignment Search Tool*; dostupno na poveznici: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch). Dobivene sekvence su zajedno s referentnim sekvencama iz GenBank banke gena (NCBI) višestruko sravnjene (ClustalW 1.6) te je provedena filogenetska analiza koristeći MEGA7 programsku podršku (Kumar i sur., 2016). Postotci podudarnosti nukleotidnih slijedova su izračunati pomoću BioEdit programske podrške (verzija 7.0.5.3.) (Hall, 1999).

3.2. Rezultati

3.2.1. Rezultati serološkog pretraživanja uzoraka seruma

Nakon serološkog pretraživanja uzoraka seruma domaćih svinja na prisutnost protutijela za virus epidemijskog proljeva svinja, koje je obavljeno metodom imunoenzimnog testa za dokazivanje IgG protutijela za virus epidemijskog proljeva svinja, utvrđen je sveukupno 41 pozitivan uzorak krvi svinja [Osječko-baranjska županija 1 (uzorak podrijetlom od krmače); Vukovarsko-srijemska županija 40 (uzorci podrijetlom od tovljenika)] (Slika 1). Sveukupna seroprevalencija kod domaćih svinja u Osječko-baranjskoj županiji i Vukovarsko-srijemskoj županiji iznosila je 15,4 % (Tablica 2).



Slika 1: Rezultati serološkog pretraživanja uzoraka seruma

Svi pozitivni uzorci bili su podrijetlom iz tri velika farmska uzgoja (dva u Vukovarsko-srijemskoj i jedan u Osječko-baranjskoj županiji), kojima upravlja jedna tvrtka. Seroprevalencija na dva pozitivna farmska uzgoja u Vukovarsko-srijemskoj županiji iznosila je 55,2 % i 82,8 %. Seroprevalenciju za treći pozitivni farmski uzgoj (Osječko-baranjska županija) nije bilo moguće odrediti zbog malog broja pretraženih uzoraka krvi krmača (N=3).

Svi uzorci seruma podrijetlom iz malih dvorišnih uzgoja domaćih svinja polučili su negativan rezultat na prisutnost protutijela za virus epidemijskog proljeva svinja.

Tablica 2: Rezultati pretraživanja seruma domaćih svinja na prisutnost protutijela za virus epidemijskog proljeva svinja u dvije županije

| Županija | Broj pretraženih uzoraka seruma | Broj pretraženih uzgoja (farmski/dvorišni) | Broj pozitivnih uzoraka (%) | Broj pozitivnih uzgoja (%) |
|----------------------|---------------------------------|--|-----------------------------|----------------------------|
| Osječko-baranjska | 96 | 22 (4/18) | 1 (1,04) | 1 (4,5) |
| Vukovarsko-srijemska | 170 | 17 (4/13) | 40 (23,5) | 2 (11,8) |
| UKUPNO | 266 | 39 (8/31) | 41 (15,4) | 3 (7,7) |

3.2.2. Rezultati sekvenciranja nove generacije i analize viroma

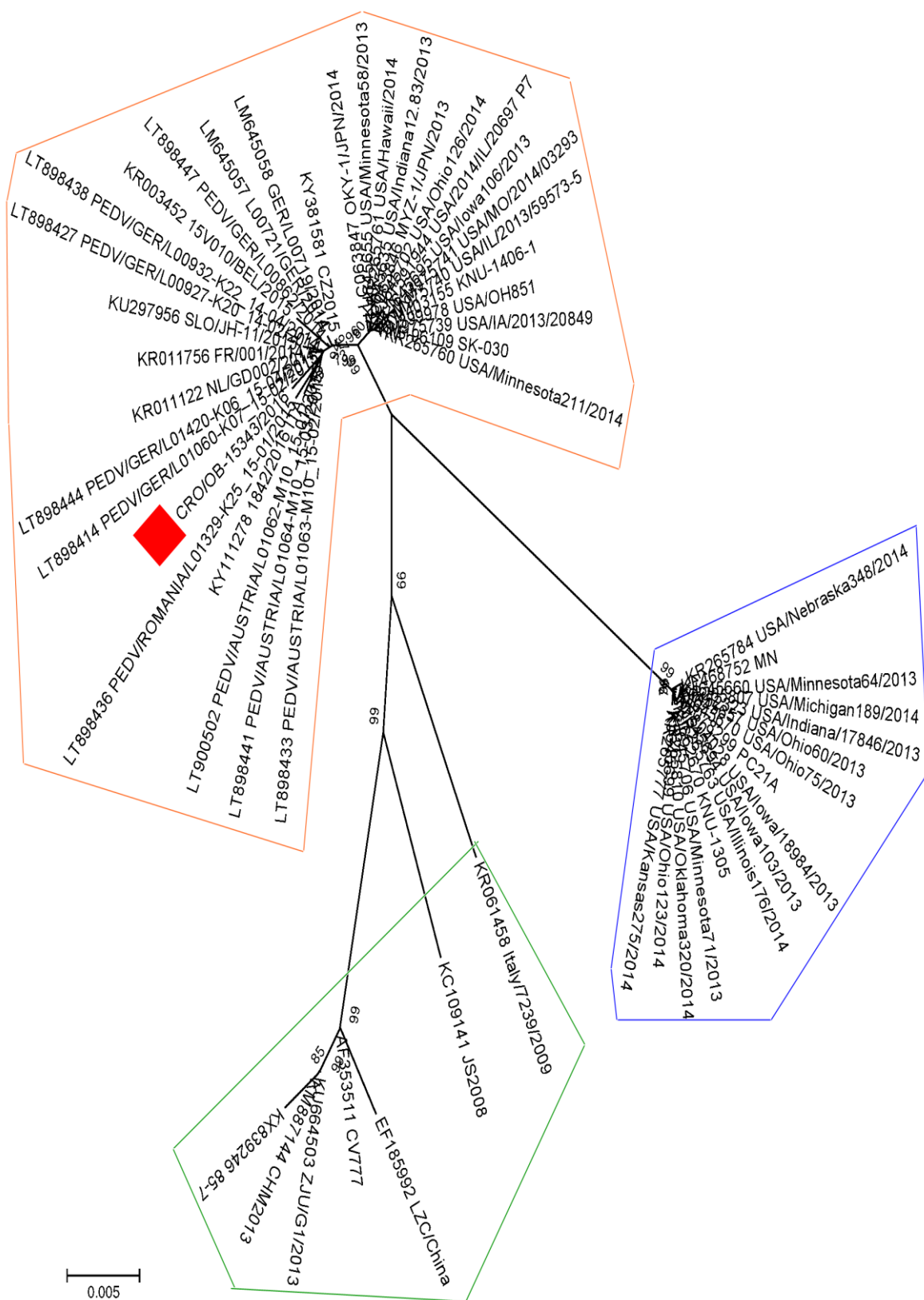
Testiranje arhivskog uzorka fecesa korištenjem NGS metode rezultiralo je relativno manjim brojem sekvenci (tzv. read-ova), koje odgovaraju virusnim porodicama (N=53.489). Bioinformatičkom analizom utvrđeno je da većina (N=25.004) tih sekvenci pripada bakteriofagima *Escherichia coli* 172-1, a svega četiri sekvence odgovaraju genomu virusa epidemijskog proljeva svinja unutar skupine virusa s jednolančanim pozitivnim RNA genomom (N=34) (Slika 2).



Slika 2: Rezultat analize viroma odnosno filogenetskog svrstavanja virusnih sekvenci dobivenih sekvenciranjem nove generacije (NGS) podrijetlom iz arhivskog uzorka fecesa domaće svinje (dobna kategorija: sisajuća prasada). Sekvence koje odgovaraju virusima s jednolančanim pozitivnim RNA genomom su označene žutom bojom.

3.2.3. Rezultati umnožavanja S dijela genoma, Sanger sekvenciranja i filogenetske analize

Primjenom tri RT-PCR reakcije uspjeli smo umnožiti tri fragmenta S dijela genoma virusa epidemijskog proljeva svinja podrijetlom iz arhivskog uzorka fecesa domaće svinje (04/2016). Sanger sekvenciranje rezultiralo je odgovarajućim sekvencama, koje su potom međusobno posložene s ciljem dobivanja konsenzus sekvence. Konsenzus sekvenca (4173 nt) sastoji se od gotovo cijelog S dijela genoma (4137/4152 nt, 99,6 %) i malog fragmenta ORF 3 (mp gen) dijela genoma virusa epidemijskog proljeva svinja (36/675 nt, 5,3 %). Dobivena sekvenca potom je višestruko sravnjena s ukupno 55 referentnih sekvenci genoma virusa epidemijskog proljeva svinja, koje su preuzete iz GenBank banke gena te je provedena filogenetska analiza čiji rezultat je filogenetsko stablo prikazano u Slici 3.



Slika 3. Filogenetska povezanost prvog izolata virusa epidemijskog proljeva svinja, dokazanog u Republici Hrvatskoj s referentnim izolatima.

Prikazano filogenetsko stablo formirano je na osnovi nukleotidnih slijedova gotovo cijelog S dijela genoma i fragmenta mp gena (4173 nt), koristeći metodu susjednog sparivanja (engl. Neighbour-joining) uz model p-distance. Kvaliteta svrstavanja pojedinih taksona dobivena je metodom samoučitavanja (engl. bootstrap) s 1.000 ponavljanja, a vrijednosti veće od 70 % naznačene su uz čvorišta. Prvi izolat virusa epidemijskog proljeva svinja u Republici Hrvatskoj označen je crvenim četverokutom.

NCBI pristupni broj je naznačen u imenu svakog taksona reprezentativnih virusa epidemijskog proljeva svinja. INDEL skupina označena je narančastom bojom, non-INDEL skupina plavom, a skupina klasičnih/povijesnih izolata virusa epidemijskog proljeva svinja zelenom bojom. Skala označava evolucijsku udaljenost.

Slika 3 prikazuje svrstavanje našeg izolata virusa epidemijskog proljeva svinja zajedno s drugim europskim izolatima u skupini INDEL, koji su dokazani proteklih godina. Rezultati izračuna postotaka podudarnosti nukleotidnog slijeda našeg izolata s nukleotidnim slijedovima referentnih izolata virusa epidemijskog proljeva svinja ukazuju na najveću filogenetsku povezanost s njemačkim izolatima LT898414 PEDV/GER/L01060 i LT898444 PEDV/GER (99,7 %), austrijskim izolatima LT898441 PEDV/AUSTRIA, LT898433 PEDV/AUSTRIA i LT900502 PEDV/AUSTRIA (99,6 %), te sa slovenskim izolatima KU297956 SLO/JH-11/2015 (99,5 %) i izolatima iz Rumunjske (LT898436 PEDV/ROMANIA; 99,4 %) i Italije (KY111278 1842/2016 ITA; 99,4 %).

3.3. Rasprava

Cilj projekta bio je utvrditi izloženost populacije svinja u Osječko-baranjskoj i Vukovarsko-srijemskoj županiji virusu epidemijskog proljeva svinja i njegovoj proširenosti. Važnost utvrđivanja takvih saznanja proizlazi iz činjenice da je virus epidemijskog proljeva svinja po prvi puta dokazan upravo u Osječko-baranjskoj županiji u travnju 2016. godine (Brnić i sur., 2016).

Međutim, iako su najvažniji projektni zadaci provedeni u cijelosti, potrebno je naglasiti kako molekularno dokazivanje virusa epidemijskog proljeva svinja nije provedeno jer nije niti postavljena sumnja na bolest tijekom trajanja projekta. Mogući razlog tome je sezonski karakter provedbe projekta i okolnost da projekt nije obuhvaćao veći dio zimskih mjeseci, kada je pojavnost bolesti najčešća. Drugi razlog odnosi se na nedovoljnu educiranost uzgajivača svinja i doktora veterinarske medicine, koji nemaju obvezu dostavljanja uzoraka u slučaju sumnje na ovu bolest.

Rezultati serološkog pretraživanja ukazuju na proširenost epidemijskog proljeva svinja ne samo u Osječko-baranjskoj, nego i u Vukovarsko-srijemskoj županiji. Obzirom na kontagioznost ove bolesti i postojanost virusnih čestica u okolišu, takav nalaz ne iznenađuje.

Podatak da su serološki pozitivne svinje dokazane samo u velikim farmskim uzgojima može se obrazložiti intenzivnijim prometom (veći broj posjeta, odvoz lešina, transport hrane i sl.), ali i uvozom novih jedinki koji ujedno predstavljaju i najznačajnije rizike za unos bolesti. Tome u prilog ide i

činjenica da svim trima uzgojima u kojima je dokazana prisutnost protutijela za virus epidemijskog proljeva svinja upravlja ista tvrtka.

Iako se u farmskim uzgojima visokih proizvodnih kapaciteta očekuje izrazito visoka razina biosigurnosnih mjera, slučaj pojave virusa epidemijskog proljeva svinja u takvim uzgojima ukazuje na manjkavosti u pravilnoj i redovitoj primjeni istih.

Podatak o ukupno 15,4 % serološki pozitivnih domaćih svinja treba analizirati s oprezom obzirom da je s velikih farmskih uzgoja testiran i veći broj uzoraka temeljen na većem broju naseljenih jedinki (prosječno 18,8 naspram 3,7 kod dvorišnih uzgoja), a seroprevalencija na razini tih farmi je izrazito visoka (čak do 82,8 %).

Razliku u seroprevalenciji između testiranih županija, koja je utvrđena ovim pilot projektom, također treba analizirati s oprezom, obzirom da je na velikom farmskom uzgoju u Osječko-baranjskoj županiji, gdje je dokazan jedan pozitivan uzorak, uzorkovano svega tri uzorka. U kontekstu takvih rezultata svrsishodnije je pratiti postotak pozitivnih uzgoja, a rezultat od 7,7 % pozitivnih vjerodostojnije predstavlja stvarno epidemiološko stanje.

Dosadašnja istraživanja prisutnosti protutijela na virus epidemijskog proljeva svinja u Europi rijetko su provedena, ponajviše zbog donedavne nedostupnosti pouzdanih komercijalno dostupnih ELISA kompleta. Seroprevalencija od 9 % u Velikoj Britaniji i 3,6 % u Francuskoj (EFSA, 2016) usporediva je s prevalencijom pozitivnih uzgoja domaćih svinja kod nas, iako je važno istaknuti da rezultati tih istraživanja nisu dobiveni korištenjem istog ELISA kompleta.

Postupak genomike prvog izolata virusa epidemijskog proljeva svinja dokazanog u Republici Hrvatskoj 2016. godine, započet je sekvenciranjem nove generacije (NGS) i bioinformatičkom analizom viroma, odnosno virusnih sekvenci u testiranom uzorku. Uspješnost same metode bila je vrlo slaba s obzirom na to da su utvrđene svega četiri sekvence koje odgovaraju genomu virusa epidemijskog proljeva svinja (većina sekvenci pripada različitim bakteriofagima). Iako pravi uzrok niske uspješnosti metode nije utvrđen, postoji realna mogućnost da je na kvalitetu utvrđenih rezultata utjecala starost uzorka (arhivski uzorak). S ciljem dobivanja kvalitetnijih rezultata primijenjen je klasični pristup Sanger sekvenciranja cijelog S dijela (engl. Spike) genoma virusa epidemijskog proljeva svinja, koji je najznačajniji dio genoma s aspekta mutacija i rekombinacija, ali i određivanja genotipa virusa epidemijskog proljeva svinja.

Utvrđeni rezultati potvrdili su da prvi dokazani izolat u Republici Hrvatskoj pripada skupini INDEL virusa epidemijskog proljeva svinja (Slika 3). Takav rezultat nije neočekivan jer je prethodnim istraživanjima utvrđeno kako upravo ta skupina cirkulira u Europi zadnjih godina (EFSA, 2016). Dodatno treba istaknuti kako je najveći broj uvezenih svinja u Republiku Hrvatsku podrijetlom iz zapadne Europe. U 2015. godini taj broj iznosio je 508.000 grla, što je za tu godinu predstavljalo 29,1 % ukupne svinjogojске proizvodnje u Republici Hrvatskoj (DZS, 2016).

Analiza postotaka podudarnosti i filogenetske povezanosti potvrđuje ove navode, uzimajući u obzir da je najveća srodnost dokazana s izolatima u našem okruženju (Austrija, Njemačka, Slovenija, Italija i Rumunjska). Iako način unosa bolesti nikada neće moći biti utvrđen sa sigurnošću, transport živih svinja i propusti u biosigurnosnim mjerama u uzgoju svakako predstavljaju najznačajnije čimbenike.

Iako trenutno ne postoji spoznaja o tipu virusa koji je cirkulirao u uzgojima koji su dokazano bili zaraženi temeljem pozitivnih nalaza na prisutnost protutijela za virus epidemijskog proljeva svinja (N=3), sveukupni gubitci tvrtke koja upravlja tim uzgojima su nedvojbeno bili visoki jer nedavno publicirani podatci ukazuju na mortalitet kod sisajuće prasadi od 55 – 75 % (Hižman, 2018). Uzimajući u obzir činjenicu da je unutar te tvrtke značajan mortalitet sisajuće prasadi bio utvrđen na ukupno sedam farmi (Hižman, 2018), ali i značaj te tvrtke za opskrbu hrvatskih potrošača svinjetinom, postoji mogućnost da je došlo do određenog poremećaja na tržištu svinja i svinjetine te će biti zanimljivo pratiti naredna izvješća Državnog zavoda za statistiku o broju uvezenih domaćih svinja.

Zaključci

Rezultati ovog projekta iznimno su značajni jer proširuju spoznaje o pojavnosti epidemijskog proljeva svinja u najistočnijim županijama Republike Hrvatske. Rezultati serološkog pretraživanja ukazuju na proširenost epidemijskog proljeva svinja ne samo u Osječko-baranjskoj, nego i u Vukovarsko-srijemskoj županiji.

Serološki pozitivne svinje dokazane su samo u velikim farmskim uzgojima, što se može obrazložiti intenzivnijim prometom, ali i uvozom novih jedinki, koje ujedno predstavljaju i značajan rizik od unosa bolesti. Tome u prilog ide i činjenica da svim trima uzgojima u kojima je dokazana prisutnost protutijela za virus epidemijskog proljeva svinja upravlja ista tvrtka.

Prvi dokazani izolat virusa epidemijskog proljeva svinja u Republici Hrvatskoj pripada skupini INDEL virusa epidemijskog proljeva svinja. Utvrđeni rezultati genomike prvog dokazanog izolata virusa epidemijskog proljeva svinja u Republici Hrvatskoj predstavljaju važnu polazišnu točku za nastavak istraživanja novodokazanih izolata.

Sekvenca S dijela genoma, kao prva nacionalna referentna sekvenca dijela genoma virusa epidemijskog proljeva svinja, omogućit će daljnje praćenje pojavnosti mutacija/rekombinacija. Time će se omogućiti praćenje pojavnosti novih emergentnih izolata.

Ovaj pilot projekt otvara područje istraživanja problematike i značaja različitih vrsti virusa pripadnika porodice *Coronaviridae*, važnih u svinjogojstvu na području cijele Republike Hrvatske. Takva će istraživanja biti od velike važnosti jer virusi porodice *Coronaviridae*, a naročito virus epidemijskog proljeva svinja, mogu imati izuzetno veliki utjecaj na hrvatsko gospodarstvo i lanac prehrane zbog relativno visokog mortaliteta kojeg mogu uzrokovati u određenoj fazi svinjogojске proizvodnje.

Ulaz virusa epidemijskog proljeva svinja na farmu uglavnom se odvija putem zaražene životinje ili različitih materijala kontaminiranih fecesom te zbog toga velike farme, uslijed većeg kretanja životinja, transportnih sredstava, opreme i osoba imaju veći rizik od pojave i širenja epidemijskog proljeva svinja. Rezultati ovog pilot projekta idu tome u prilog, jer je utvrđena viša prevalencija seropozitivnih stada na velikim farmama u usporedbi s manjim gospodarstvima.

Utvrđeni rezultati značajni su i za hrvatsko gospodarstvo, posebice za svinjogojstvo, jer daju važno polazište za procjenu rizika od moguće pojave i širenja epidemijskog proljeva svinja u ostatku zemlje.

Preporuke

Potrebno je povećati svijest kod doktora veterinarske medicine i uzgajivača svinja o kliničkim znakovima oboljenja svinja. Visoka pojavnost vodenasto-žućkastog proljeva kod svinja bilo koje dobi dobar je pokazatelj potrebe za testiranjem na virus epidemijskog proljeva svinja.

S obzirom na utvrđene rezultate potrebno je proširiti spoznaje i naglasiti važnost adekvatne primjene biosigurnosnih mjera u svinjogojским objektima visokog proizvodnog kapaciteta. Pri tome treba uzeti u obzir čimbenike poput prijevoznih sredstava za transport životinja, hrane za životinje, te križnog onečišćenja objekata, opreme ili hrane za životinje s fecesom.

Stroge biosigurnosne mjere, poput kontrole kretanja svinja, različitih materijala (oprema, alati) i ljudi na farmi, dezinfekcije vozila i opreme te odgovarajuće odlaganje mrtvih svinja i gnojnice najučinkovitije su mjere za sprječavanje unošenja i širenja virusa epidemijskog proljeva svinja. Praksa „sve unutra sve van“ učinkovita je u prekidanju ciklusa prijenosa unutar farme.

Podatke o rezultatima sekvenciranja genoma virusa epidemijskog proljeva svinja potrebno je povezivati s informacijama o epidemiološkim istraživanjima, kako bi se predvidio utjecaj insercija i delecija na virulenciju virusa epidemijskog proljeva svinja. Potrebno je odrediti genomske sekvence budućih izolata kako bi se bolje razumjela evolucija virusa epidemijskog proljeva svinja i razlike u virulenciji sojeva, ne samo u Republici Hrvatskoj nego i u drugim europskim zemljama i drugim kontinentima.

Promoviranje transparentne komunikacije o pojavi izbijanja epidemijskog proljeva svinja bitno je ne samo između pojedinih svinjogojških objekata unutar jedne države, nego i između država. Takva vrsta komunikacije predstavlja osnovu za sprječavanje širenja virusa.

Budućim serološkim istraživanjima trebalo bi obuhvatiti što veći broj uzgoja, ali i veći broj pojedinačnih uzoraka krvi svinja, a istraživanja bi trebalo nastaviti sustavno na teritoriju cijele Republike Hrvatske. Utvrđenim rezultatima bilo bi moguće procijeniti utjecaj infekcije virusom epidemijskog proljeva svinja u Republici Hrvatskoj na proizvodne gubitke i posljedične ekonomske štete.

EFSA-a (2016) navodi kako analiziranje utjecaja pojave i širenja epidemijskog proljeva svinja zahtijeva usporedbu s podacima vezanim za tehnološke značajke uzgoja u svinjogojskim objektima u kojima nije potvrđena bolest te bi stoga trebalo provesti više specijaliziranih studija kako bi se pojasnio utjecaj bolesti na farmi. U tom kontekstu rezultati ovog pilot projekta pružaju referentne pokazatelje, koji mogu biti polazišna točka za buduće specijalizirane studije.

Uzimajući u obzir da osjetljivost i specifičnost dijagnostičkih testova koji se trenutno koriste u Europskoj uniji nisu dobro poznati, potrebno je promovirati strategiju uporabe usklađenih dijagnostičkih alata za virus epidemijskog proljeva svinja.

Literatura

- Ayudhya N, Nuntawan S, Assavacheep P, Thanawongnuwech R (2012): One World–One Health: The Threat of Emerging Swine Diseases. An Asian Perspective. *Transboundary and Emerging Diseases* 59, 9-17.
- Brnić D, Roić B, Jungić A, Bedeković T (2016): Epidemijski proljev svinja: nova prijetnja hrvatskom svinjogojstvu?. *Zbornik radova 6. Hrvatskog veterinarskog kongresa*, 243-248.
- Chae C, Kim O, Choi C, Min K, Cho W, Kim J and Tai J (2000): Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs. *Veterinary Record* 147, 606-608.
- Chen Q, Li G, Stasko J, Thomas JT, Stensland WR, Pillatzki AE, Gauger PC, Schwartz KJ, Madson D, Yoon KJ, Stevenson GW, Burrough ER, Harmon KM, Main RG, Zhang J (2014): Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 234-243.
- Crawford K, Lager K, Miller L, Opriessnig T, Gerber P and Hesse R (2015): Evaluation of porcine epidemic diarrhea virus transmission and the immune response in growing pigs. *Veterinary Research* 46 (1), 49.
- Dastjerdi A, Carr J, Ellis RJ, Steinbach F, Williamson S (2015): Porcine Epidemic Diarrhea Virus among Farmed Pigs, Ukraine. *Emerging Infectious Diseases* 21, 2235-2237.
- Dee S, Neill C, Clement T, Christopher-Hennings J, Nelson E (2014): An evaluation of a liquid antimicrobial (Sal CURB(R)) for reducing the risk of porcine epidemic diarrhea virus infection of naive pigs during consumption of contaminated feed. *BMC Veterinary Research* 10, 220.
- Dee S, Neill C, Clement T, Singrey A, Christopher-Hennings J, Nelson E (2015): An evaluation of porcine epidemic diarrhea virus survival in individual feed ingredients in the presence or absence of a liquid antimicrobial. *Porcine Health Management*, 1:9.
- Dufresne L, Robbins R (2014): Field experience with porcine epidemic diarrhea. *Proceedings of the AASV Annual Meeting 2014*.

- Duy D, Toan N, Puranaveja S, Thanawongnuwech R (2011): Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates from southern Vietnam during 2009-2010 outbreaks. *Thai Journal of Veterinary Medicine* 41, 55-64.
- DZS, Državni zavod za statistiku (2016): Stočna proizvodnja u RH – Konačni rezultati. Priopćenje Državnog zavoda za statistiku, godina I_III., broj 1.1.23.
- EFSA, European Food Safety Authority (2014): Scientific Opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging porcine deltacoronavirus. *EFSA Journal* 12, 3877-3868.
- EFSA, European Food Safety Authority (2016): Scientific Report on the collection and review of updated epidemiological data on porcine epidemic diarrhoea. *EFSA Journal* 14, 4375-4352.
- Gao Y, Kou Q, Ge X, Zhou L, Guo X, Yang H (2013): Phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus field strains prevailing recently in China. *Archives of Virology* 158, 711-715.
- Geiger J, Connor J (2013): Porcine epidemic diarrhea, diagnosis and elimination. Dostupno na:
http://www.cvm.umn.edu/sdec/prod/groups/cvm/@pub/@cvm/@sdec/documents/content/cvm_content_446533.pdf
- Goyal S (2014): Interventions to control PEDV in feed and feed ingredients. Dostupno na <http://www.pork.org/pedv-2014-research/pedv-feed>.
- Hall TA (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Hesse D, Suddith A, Breazeale B, Fuller A, Concannon C, Anderson J, Nietfeld J, Bai J, An B, Peddireddi L, Oberst R, Kerrigan M, Niederwerder M, Chand R, Rowland B, Fang Y, Ransburgh R, Zhu L (2014): Oral/nasal inoculation of four-week-old pigs with PEDV: Tissue tropism, shedding, carriage, antibody response, and aerosol transmission. *Proceedings of the 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, Cancun, Quintana Roo, Mexico.*
- Hižman, D (2018): Eradication of PEDV infection from 7 farrow to wean farms in Croatia. 10th European Symposium of Porcine Health Management, Barcelona, Spain, VVD-024.
- Jung K, Ahn K, Chae C (2006): Decreased activity of brush border membrane-bound digestive enzymes in small intestines from pigs experimentally infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Research in Veterinary Science* 81, 310-315.
- Jung K, Saif LJ (2015): Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Veterinary journal* 204, 134-143.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A (2012): Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28 (12), 1647-1649.
- Kelly M, Butler D, Hamilton J (1972): Transmissible gastroenteritis in piglets: a model of infantile viral diarrhea. *The Journal of Pediatrics* 80, 925-931.

- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution* 33, 1870-1874.
- Lee C (2015): Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology journal* 12, 193.
- Lin C, Chung W, Chang S, Wen C, Liu H, Chien C, Chiou M (2014): US-Like Strain of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Outbreaks in Taiwan, 2013-2014. *The Journal of Veterinary Medical Science* 76 (9), 1297–1299.
- Lin CM, Saif LJ, Marthaler D, Wang Q (2016): Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains. *Virus research* 226, 20-39.
- Lojkić I, Biđin M, Prpić J, Šimić I, Krešić N, Bedeković T (2016): Faecal virome of red foxes from peri-urban areas. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 45, 10-15.
- Lowe J, Gauger P, Harmon K, Zhang K, Connor J, Yeske P, Loula T, Levis I, Dufresne L, Main R (2014): Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerging Infectious Diseases* 20 (5), 872-874.
- Madson DM, Magstadt DR, Arruda PHE, Hoang H, Sun D, Bower LP, Bhandari M, Burrough ER, Gauger PC, Pillatzki AE, Stevenson GW, Wilberts BL, Brodie J, Harmon KM, Wang C, Main RG, Zhang J, Yoon KJ (2014): Pathogenesis of porcine epidemic diarrhea virus isolate (US/Iowa/18984/2013) in 3-week-old weaned pigs. *Veterinary Microbiology* 174 (1-2), 60-68.
- McOrist S (2014): PED - Epidemiology and risk factors for transmission in east Asia. Presentation at the International conference on Swine Enteric Coronavirus Diseases, Chicago, USA.
- OIE (World organization for animal health) (2014): OIE Technical Factsheet: Infection with porcine epidemic diarrhoea virus.
- Oldham J (1972): Letter to the editor. *Pig Farming* 10, 72-73.
- Pijpers A, Van Nieuwstadt A, Terpstra C, Verheijden J (1993): Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. *Veterinary Record* 132, 129-131.
- Pospischil A, Stuedli A, Kiupel M (2002): Diagnostic Notes Update on porcine epidemic diarrhea. *Journal of Swine Health and Production* 10, 81-85.
- Song D, Oh J, Kang B, Yang JS, Moon H, Yoo HS, Jang Y, Park B (2007): Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain. *Research in Veterinary Science* 82, 134-140.
- Song D, Park B (2012): Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis and vaccines. *Virus Genes* 44 (2), 167-175.
- Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough EB, Sun D, Madson D, Cooper VL, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt BJ (2013): Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25, 649-654.

- Sun R, Cai R, Chen Y, Liang P, Chen D, Song C (2012): Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerging Infectious Diseases* 18, 161-163.
- Tun HM, Cai Z, Khafipour E (2016): Monitoring Survivability and Infectivity of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDv) in the Infected On-Farm Earthen Manure Storages (EMS). *Frontiers in Microbiology* 9, 7:265. doi: 10.3389/fmicb.2016.00265.
- Wang H, Xia X, Liu Z, Liu Y, Wang S, Qi Z, Liu S, Wang H, Niu X, Liu S (2013): Outbreak of porcine epidemic diarrhea in piglets in Gansu province, China. *Acta Scientiae Veterinariae*, 41 (1), 1-4.
- Wang L, Byrum B, Zhang Y (2014): New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 20 (5), 917-919.
- Williamson S, Strugnell B, Thomson J, Webster G, McOrist S, Clarke H (2013): Emergence of severe porcine epidemic diarrhoea in pigs in the USA. *Veterinary Record* 173, 146-148.
- Yang X, Huo JY, Chen L, Zheng FM, Chang HT, Zhao J, Wang XW, Wang CQ (2013): Genetic variation analysis of reemerging porcine epidemic diarrhea virus prevailing in central China from 2010 to 2011. *Virus Genes* 46, 337-344.