UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

DAMIR J. BENKOVIĆ

MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA PARVOVIRUSA I CIRKOVIRUSA DETEKTOVANIH U POPULACIJAMA DIVLJIH SVINJA I MESOJEDA NA TERITORIJI ZAPADNOBAČKOG OKRUGA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2026. godina

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

DAMIR J. BENKOVIĆ

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PARVOVIRUSES AND CIRCOVIRUSES DETECTED IN WILD BOARS AND WILD CARNIVORES FROM THE WEST BAČKA DISTRICT

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

Mentor:

Prof. dr Andrea Radalj, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:
1. Prof. dr Jakov Nišavić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Dejan Krnjaić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Nataša Stević, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
4. Dr Ratko Sukara, viši naučni saradnik, Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Zahvalnica

Moj dolazak u Veterinarski specijalistički institut Sombor bio je rezultat spleta nekoliko srećnih okolnosti. Do tada nisam znao da u mom gradu postoji ustanova u kojoj ću, kako se kasnije pokazalo, provesti jedan od najvažnijih perioda svog profesionalnog razvoja. Kao mlad veterinar, sa mnogo teorijskog znanja i malo praktičnog iskustva, ovde sam imao priliku da učim i radim u različitim oblastima veterinarske medicine. Iza svakog od tih koraka stajale su kolege koje su bile spremne da svoje znanje i iskustvo podele sa mnom.

Kolektivu instituta zahvaljujem na strpljenju sa kojim ste me učili poslu, na razumevanju za početničke greške, na savetima, podršci i poverenju koje ste mi pružali tokom svih ovih godina. Znanje koje sam ovde stekao nije dolazilo samo iz stručne literature, već pre svega od ljudi sa kojima sam svakodnevno radio. Zbog toga završetak doktorskih studija ne doživljavam samo kao lični uspeh. U njemu je ugrađen deo znanja, vremena i strpljenja kolega sa kojima sam imao privilegiju da radim. Svako je na svoj način doprineo da stignem do ovog trenutka.

Posebnu i iskrenu zahvalnost dugujem svojoj mentorki, dr Andrei Radalj, čiji je doprinos nastanku ove disertacije nemerljiv. Njena uloga nije se završavala savetima i usmeravanjem istraživanja, već je bila prisutna u svim fazama njegovog oblikovanja – od organizacije i tehničkog uobličavanja rada, preko statističke obrade i bioinformatičkih metoda koje su za mene predstavljale jedan od najzahtevnijih delova istraživanja. Ova disertacija u svom konačnom obliku nosi veliki trag njenog znanja, truda i posvećenosti i zbog toga sam joj neizmerno zahvalan.

Na kraju, ali iznad svega, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, koja je zajedno sa mnom, na svoj način, prošla čitav put do završetka ove disertacije. Svojim roditeljima dugujem zahvalnost za sve ono što je prethodilo ovom trenutku – za ljubav, vaspitanje, podršku i vrednosti koje su mi usadili, kao i za veru u mene koja me je pratila tokom čitavog školovanja i profesionalnog puta.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj supruzi, koja je tokom godina izrade ove disertacije bila moj najbliži oslonac. Hvala joj na razumevanju, strpljenju i podršci, ali i na tome što je na sebe često preuzimala više nego što je trebalo kako bih se ja posvetio radu, istraživanju i učenju. Bez njene podrške ovaj put bi bio neuporedivo teži.

Mojim ćerkama, Heleni i Jani, dugujem možda i najnežnije izvinjenje i najveće hvala. Njihovo detinjstvo odvijalo se paralelno sa mojim radom na ovoj disertaciji, a deo vremena koje je trebalo da pripada njima neretko su uzimali eksperimenti, knjige, radovi i obaveze. Hvala im što su, i onda kada to možda nisu mogle potpuno da razumeju, prihvatale da tata ponekad mora da radi, uči ili jednostavno nije dostupan onoliko koliko bi želele. Nadam se da će jednog dana, kada budu dovoljno velike da razumeju šta je sve ovaj put podrazumevao, znati da su upravo one bile jedan od najvažnijih razloga da ga završim.

MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA PARVOVIRUSA I CIRKOVIRUSA DETEKTOVANIH U POPULACIJAMA DIVLJIH SVINJA I MESOJEDA NA TERITORIJI ZAPADNOBAČKOG OKRUGA

Sažetak

Divlje svinje i mesojedi predstavljaju važne, nedovoljno istražene rezervoare parvovirusa i cirkovirusa u Evropi. Cilj disertacije bio je utvrđivanje prisustva i molekularna karakterizacija navedenih virusa kod divljih svinja i mesojeda sa teritorije Zapadnobačkog okruga, uz genotipizaciju i detekciju rekombinantnih sojeva. Ispitano je 90 uzoraka tkiva divljih svinja i 98 uzoraka tkiva divljih mesojeda (45 šakala i 53 lisice). Prisustvo virusa utvrđeno je real-time PCR metodom, a pozitivni uzorci dalje analizirani konvencionalnim PCR protokolima i sekvenciranjem po Sangeru, uz filogenetsku analizu, analizu p-distanci i procenu prisustva genskih rekombinacija primenom bioinformatičkih softvera. Kod divljih svinja parvovirusi su detektovani u 61,1% uzoraka, najčešće PPV2, u 92,7%, i PPV7, u 70,9%, a zatim PPV3, u 32,7%, i PPV6, u 18,2% pozitivnih uzoraka, dok PPV1, PPV4 i PPV5 nisu detektovani. Mešovite infekcije sa dva ili više parvovirusa registrovane su u 76,4% pozitivnih uzoraka. PCV2 je detektovan u 18,9%, a PCV3 u 13,3% uzoraka, uz koinfekcije sa parvovirusima u 34,5% PPV-pozitivnih uzoraka. Sekvence PPV2 svrstane su u evropski ogranak, PPV7 su pokazale izraženiju heterogenost, PCV2 su pripadale genotipovima PCV2b i PCV2d, a PCV3 genotipu PCV3-a. Kod divljih mesojeda CPV2 i FPV detektovani su u 12,2% uzoraka, i to CPV2 češće kod šakala, a FPV kod lisica. Sojevi CPV2 pripadali su genotipovima CPV2b i CPV2c, sa srodnošću sojevima pasa iz Srbije, dok su sojevi FPV svrstani u grupu FPV-B. Cirkovirus pasa detektovan je u 31,6% uzoraka, češće kod šakala, sa genotipovima 4 i 5, odnosno FoxCV linijom. Rekombinacioni signali utvrđeni su kod sekvenci PPV2, PPV7 i CanineCV/FoxCV, dok kod PCV3 nijedan signal nije zadovoljio zadate kriterijume, a kod PPV6, PCV2, CPV2 i FPV signali nisu utvrđeni. Rezultati ukazuju da divlje svinje i mesojedi predstavljaju značajne domaćine parvovirusa i cirkovirusa, sa potencijalnom ulogom u njihovom održavanju i širenju.

Ključne reči: divlja svinja; zlatni šakal; crvena lisica; parvovirusi; cirkovirusi; molekularna karakterizacija; filogenetska analiza; genske rekombinacije.

Naučna oblast: Veterinarska medicina
Uža naučna oblast: Mikrobiologija sa imunologijom
UDK:

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PARVOVIRUSES AND CIRCOVIRUSES DETECTED IN WILD BOARS AND WILD CARNIVORES FROM THE WEST BAČKA DISTRICT

Abstract

Wild boars and wild carnivores are important, understudied reservoirs of parvoviruses and circoviruses in Europe. This dissertation aimed to assess the presence and molecular characteristics of these viruses in wild boars and wild carnivores from the West Bačka District, together with genotyping and recombinant-strain detection. A total of 90 tissue samples from wild boars and 98 from wild carnivores, 45 golden jackals and 53 red foxes, were examined. Viral nucleic acids were detected by real-time PCR, positive samples were analyzed by conventional PCR, Sanger sequencing, phylogenetic and p-distance analysis, and bioinformatic recombination assessment. In wild boars, parvoviruses were detected in 61.1% of samples, most often PPV2, in 92.7%, and PPV7, in 70.9%, followed by PPV3, in 32.7%, and PPV6, in 18.2% of positive samples, while PPV1, PPV4, and PPV5 were not detected. Mixed infections involving two or more parvoviruses occurred in 76.4% of positive samples. PCV2 was detected in 18.9% and PCV3 in 13.3% of samples, with co-infection with parvoviruses in 34.5% of PPV-positive samples. PPV2 sequences clustered within the European lineage, PPV7 showed greater heterogeneity, PCV2 belonged to genotypes PCV2b and PCV2d, and PCV3 to genotype PCV3a. In wild carnivores, CPV2 and FPV were detected in 12.2% of samples, CPV2 more often in jackals and FPV in foxes. CPV2 strains belonged to genotypes CPV2b and CPV2c and were related to Serbian canine strains, while FPV strains fell within the FPV-B group. Canine circovirus was detected in 31.6% of samples, more often in jackals, with genotypes 4 and 5, i.e. the FoxCV lineage. Recombination signals were found in PPV2, PPV7, and CanineCV/FoxCV sequences, whereas no PCV3 signal met the acceptance criteria, and no signals were found in PPV6, PCV2, CPV2, or FPV. Findings indicate wild boars and wild carnivores are important hosts of parvoviruses and circoviruses, with a potential role in their maintenance and spread.

Keywords: wild boar; golden jackal; red fox; parvoviruses; circoviruses; molecular characterization; phylogenetic analysis; genetic recombination.

Scientific field: Veterinary Medicine
Scientific subfield: Microbiology and Immunology
UDC:

SADRŽAJ

UVOD 1

1. Biološke osobine i klasifikacija parvovirusa 2

Parvovirusi svinja 9

Parvovirusi mesojeda 11

2. Biološke osobine i klasifikacija cirkovirusa 14

Cirkovirusi svinja 17

Cirkovirus pasa 20

PREGLED LITERATURE 22

CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA 36

MATERIJAL I METODE 38

1. Prikupljanje i obrada uzoraka organa divljih svinja i mesojeda 38

2. Otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina parvovirusa i cirkovirusa u uzorcima poreklom od divljih svinja i mesojeda primenom metoda real-time PCR 38

3. Otkrivanje prisustva pojedinačnih svinjskih parvovirusa (PPV1–PPV7) primenom konvencionalnog multiplex PCR-a u uzorcima pozitivnim u real-time PCR 40

4. Sekvenciranje i filogenetska analiza gena koji kodiraju sintezu kapsida detektovanih svinjskih parvovirusa 41

5. Sekvenciranje i filogenetska analiza varijabilnog segmenta gena koji kodira sintezu kapsida detektovanih sojeva PCV2 42

6. Sekvenciranje i filogenetska analiza kompletnog genoma detektovanih sojeva PCV3 43

7. Sekvenciranje i filogenetska analiza varijabilnog segmenta gena koji kodira sintezu kapsida detektovanih sojeva parvovirusa mesojeda 44

8. Sekvenciranje i filogenetska analiza kompletnog genoma sojeva cirkovirusa detektovanih kod divljih mesojeda 44

9. Analiza prisustva genskih rekombinacija u dobijenim nukleotidnim sekvencama parvovirusa i cirkovirusa divljih svinja i mesojeda 45

REZULTATI 47

1. Otkrivanje prisustva nukleinske kiseline svinjskih parvovirusa u uzorcima poreklom od divljih svinja primenom metode real-time PCR 47

2. Otkrivanje prisustva pojedinačnih svinjskih parvovirusa (PPV1–PPV7) primenom konvencionalnog multiplex PCR-a u uzorcima pozitivnim u real-time PCR i struktura pojedinačnih i mešovitih infekcija 47

3. Analiza gena koji kodiraju sintezu kapsida svinjskih parvovirusa, upoređivanje dobijenih nukleotidnih sekvenci sa analognim sekvencama dostupnim u Banci gena i njihova filogenetska analiza 49

4. Otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina PCV2 i PCV3 u uzorcima poreklom od divljih svinja primenom metode real-time PCR 56

5. Analiza varijabilnog segmenta gena koji kodira sintezu kapsida PCV2 i filogenetska analiza dobijenih nukleotidnih sekvenci radi izvođenja genotipizacije virusa 57

6. Analiza kompletnog genoma detektovanih sojeva PCV3, upoređivanje dobijenih nukleotidnih sekvenci sa analognim sekvencama dostupnim u Banci gena i njihova filogenetska analiza u cilju izvođenja genotipizacije virusa 59

7. Otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina parvovirusa mesojeda (CPV2 i FPV) u uzorcima poreklom od šakala i lisica primenom metode real-time PCR 63

8. Analiza varijabilnog segmenta gena koji kodira sintezu kapsida detektovanih sojeva parvovirusa mesojeda i filogenetska analiza dobijenih nukleotidnih sekvenci u cilju genotipizacije virusa 63

9. Otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina cirkovirusa pasa (CanineCV) i lisica (FoxCV) u uzorcima poreklom od šakala i lisica primenom metode real-time PCR 67

10. Analiza kompletnog genoma detektovanih sojeva cirkovirusa mesojeda, upoređivanje dobijenih nukleotidnih sekvenci sa analognim sekvencama dostupnim u Banci gena i njihova filogenetska analiza 67

11. Analiza prisustva genskih rekombinacija u dobijenim nukleotidnim sekvencama parvovirusa i cirkovirusa divljih svinja i mesojeda 71

Svinjski parvovirus 2 (PPV2) 71

Svinjski parvovirus 7 (PPV7) 71

Svinjski cirkovirus 3 (PCV3) 76

Cirkovirus pasa (CanineCV) 78

Svinjski parvovirus 6 (PPV6), svinjski cirkovirus 2 (PCV2) i parvovirusi mesojeda (CPV2 i FPV) 78

DISKUSIJA 80

Parvovirusi i cirkovirusi divljih svinja 80

Parvovirusi i cirkovirusi divljih mesojeda 89

ZAKLJUČCI 95

LITERATURA 97

UVOD

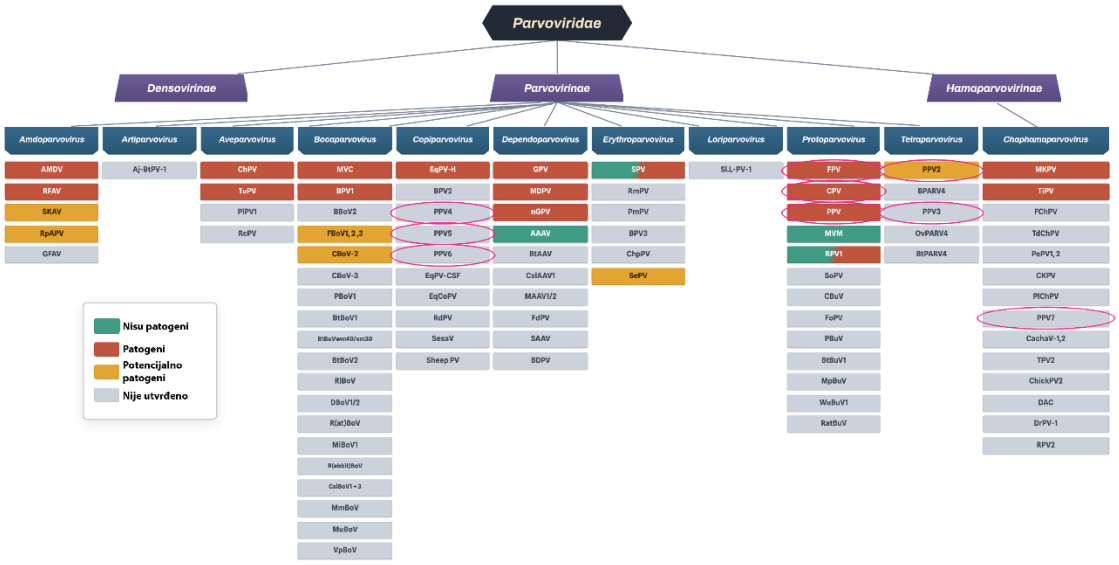
Divlja svinja (*Sus scrofa*) vodi poreklo iz jugoistočne Azije, gde se ovaj rod diverzifikovao i proširio prema kontinentalnoj Aziji, Evropi i severnoj Africi (Lucchini i sar., 2005). Prema dostupnim podacima, divlje svinje pojavile su se u Evropi pre između 1,5 i 4 miliona godina, u zavisnosti od toga da li se procena zasniva na arheološkim ili podacima dobijenim primenom molekularnih metoda (Scandura i sar., 2011). Rasprostranjenost divljih svinja u Evropi posledica je kolonizacije iz južnih delova kontinenta tokom kasnog pleistocena i zadržala se do danas uz povremene fluktuacije brojnosti (Kusza i sar., 2014). Osnovni činioci koji utiču na veličinu populacije divljih svinja su promene u životnoj sredini (Morelle i sar., 2016), klimatske promene (Markov i sar., 2019) i izmene u agroekosistemima. Posebno zabrinjava uloga divljih svinja u širenju uzročnika zaraznih bolesti, naročito virusne etiologije, kao što je na primer virus afričke kuge svinja (AKS) (Simon i sar., 2024). Zavisno od životnih uslova i konfiguracije terena, divlje svinje sposobne su da prelaze velike udaljenosti, što dodatno naglašava njihov značaj kao rezervoara brojnih patogena (Park i sar., 2021). U Srbiji, nizak nivo biosigurnosti i tradicionalni način držanja domaćih svinja koji omogućava njihov neposredan ili posredan kontakt sa divljim svinjama povećava mogućnost prenošenja različitih patogena (Milićević i sar., 2016), što je naročito problematično sa stanovišta suzbijanja bolesti koje mogu naneti znatne štete stočarskoj proizvodnji.

Crvena lisica (*Vulpes vulpes*) i zlatni šakal (*Canis aureus*) dve su najrasprostranjenije simpatrične[1] vrste divljih mesojeda na evropskom kontinentu (Torretta i sar., 2021; Tsunoda i sar., 2022). Evropski zlatni šakal nastanjuje širok geografski pojas koji obuhvata severnu i istočnu Afriku, jugoistočnu Evropu i delove južne Azije (Arnold i sar., 2012). Tokom poslednjih dvadesetak godina zabeleženo je značajno širenje populacije šakala u ravničarska područja severnih regiona Bosne i Hercegovine, pri čemu su pojedini migracijski pravci vodili iz Srbije i severoistočne Hrvatske, čime je uspostavljena stabilna populacija ove vrste u navedenim područjima (Kovačič i sar., 2026; Nikitović i sar., 2023). Bliski odnosi šakala i lisica na istom geografskom području uz ograničene izvore hrane uslovili su razvoj različitih prehrambenih navika ove dve vrste. Kod šakala, sitni sisari i divlji papkari, a naročito divlje svinje, predstavljaju glavni izvor hrane tokom cele godine, dok se kod lisica taj odnos menja u proleće i leto, kada prevladavaju biljni materijal i ptice (Lanszki i sar., 2016). Značajno povećanje brojnosti ovih vrsta mesojeda u poslednjim godinama, praćeno njihovim prodorom u naseljena područja, predstavlja poseban rizik od prenošenja brojnih uzročnika bolesti sa zoonoznim potencijalom (Castelló i sar., 2018; Campbell i sar., 2020; Delcourt i sar., 2022; Balić i sar., 2024). Pored uzročnika zoonoza, brojna istraživanja ukazala su na prisustvo i drugih uzročnika virusnih bolesti od značaja u veterinarskoj medicini, kao što su virus štenećaka, parvovirus pasa, adenovirusi, cirkovirusi i mnogi drugi (Truyen i sar., 1998; Kurucay i sar., 2023; Magliocca i sar., 2024; Benković i sar., 2025).

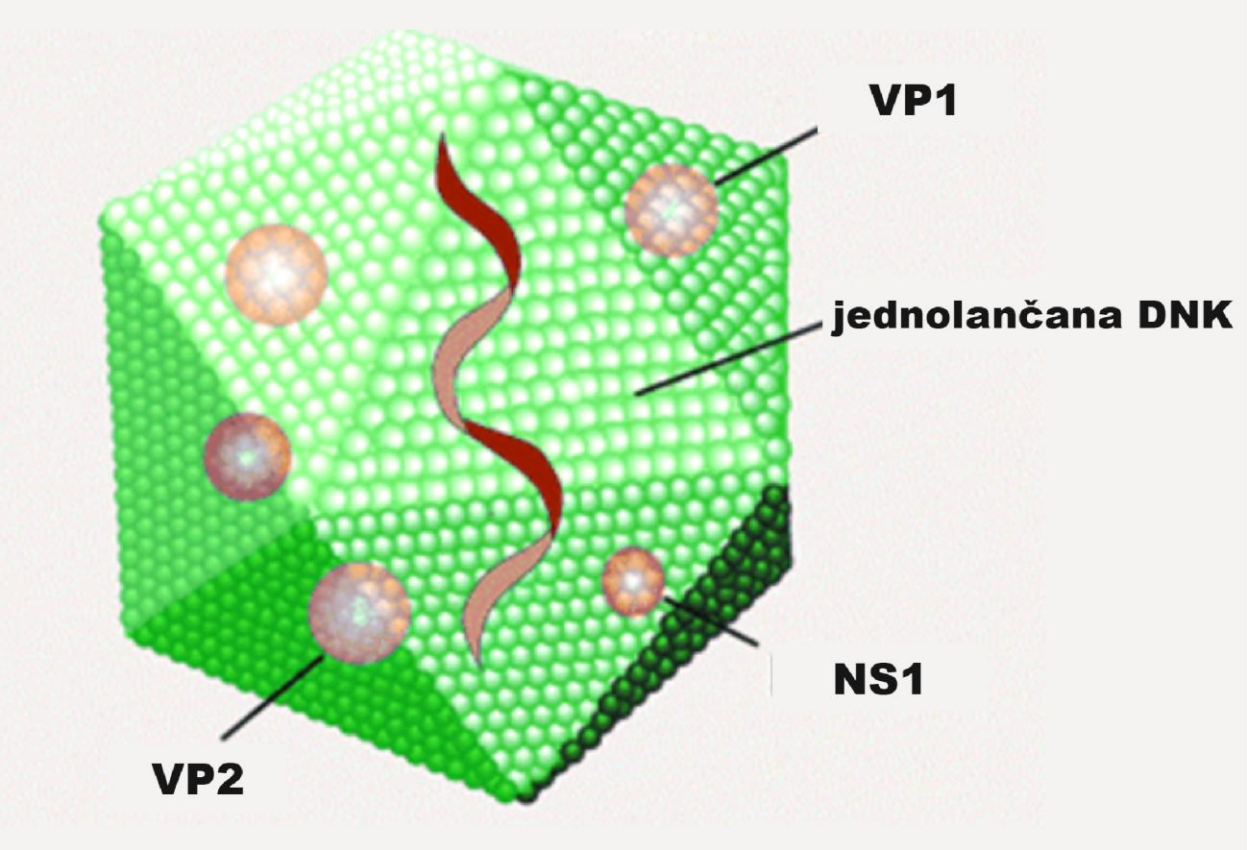
[1] Srodne vrste koje koegzistiraju u zajedničkom životnom prostoru.

1. Biološke osobine i klasifikacija parvovirusa

Virusi iz familije *Parvoviridae* su poznati uzročnici mnogih značajnih oboljenja u veterinarskoj medicini, pri čemu se posebno izdvajaju parvovirus pasa (CPV2), virus panleukopenije mačaka (FPV), parvovirusi svinja (PPV) i mnogi drugi (Cotmore i sar., 2019). Uprkos dosta složenoj sistematizaciji, ovi virusi poseduju zajedničkog pretka i veoma slične biološke osobine kao što su otpornost u spoljašnjoj sredini, i proces replikacije zavistan od prisustva ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa, pri čemu su na infekciju naročito prijemčive mlade jedinke (Lamm i sar. 2008). Navedeni afinitet prema mitotski aktivnim ćelijama objašnjava i tropizam virusa prema hematopoetskim ćelijama, limfocitima i progenitorskim ćelijama crevne mukoze. Prema najnovijoj sistematizaciji Međunarodnog komiteta za taksonomiju virusa (*International Commitee on Taxonomy of Viruses – ICTV)* familija *Parvoviridae* obuhvata 3 podfamilije: *Densovirinae, Hamaparvovirinae i Parvovirinae* sa 26 rodova i preko 100 vrsta od kojih su neke sa izraženim patogenim potencijalom (Slika 1) (Cotmore i sar., 2019; Jager i sar., 2021). Ne poseduju spoljašnji omotač, kao ni lipide i polisaharide u svojoj strukturi, a veličina virusnih čestica iznosi od 18 do 22 nm (Cotmore i sar., 2019).



Slika 1. Klasifikacija virusa iz familije *Parvoviridae*: prikazani su neki od najznačajnijih predstavnika za veterinatsku medicinu; Bojama je označen njihov patogeni potencijal; Obeleženi virusi su predmet ispitivanja ove disertacije (adaptirano prema Jager i sar., 2021)



Slika 2. Struktura parvovirusa: proteini kapsida VP1 i VP2, nestrukturni protein virusa (NS1) i jednolančana DNK (adaptirano prema Broliden i sar., 2006)

Virioni parvovirusa odlikuju se ikosaedričnom simetrijom, a njihov kapsid obrazuje brojne površinske strukture u vidu simetričnih udubljenja i ispupčenja, koje su usko povezane sa funkcijom virusne čestice (Slika 2). Genom parvovirusa čini jednolančana DNK (engl. *single-stranded DNA*, ssDNA), linearnog oblika i veličine od 4,5 do 5,5 kb, koja obuhvata dva glavna okvira čitanja (engl. *open reading frame*, ORF). Prvi ORF, smešten na 3' segmentu DNK lanca, kodira sintezu nestrukturnih proteina (NS) i ima ulogu u transkripciji i replikaciji, dok drugi, smešten u okviru 5' segmenta, kodira izgradnju strukturnih proteina kapsida, različito označenih kao VP ili Cap. Nestrukturni protein NS1 ključan je za otpočinjanje replikacije i osigurava efikasnu amplifikaciju virusnog genoma (Cotmore i sar., 2007; Sanchez i sar., 2021; Zhang i sar., 2022a).

Lanac DNK negativnog polariteta služi kao matrica za sintezu virusne informacione RNK (iRNK) nakon ulaska virusa u ćeliju domaćina. Ovakva organizacija genoma omogućava brzu ekspresiju virusnih gena, čime se olakšava preusmeravanje ćelijskih procesa u korist virusne replikacije, uključujući modulaciju signalnih puteva i imunskog odgovora domaćina (Cotmore i sar., 2007). Genom virusa sadrži i terminalne palindromske sekvence, koje omogućavaju formiranje ukosnica (engl. *hairpin*) i drugih kompleksnih struktura neophodnih za replikaciju (Cotmore i sar., 2019).

Kapsid parvovirusa sastoji se od 60 proteinskih molekula, od kojih oko 90% čini protein VP2, a oko 10% protein VP1, pri čemu se ovakva organizacija odnosi na predstavnike podfamilije *Parvovirinae*, dok članovi podfamilije *Hamaparvovirinae*, u koju spada i PPV7, kodiraju jedinstven kapsidni protein (VP). Kod pojedinih vrsta parvovirusa javlja se i treći strukturni protein, VP3, koji nastaje odsecanjem terminalnih peptida proteina VP2 (Cotmore i sar., 2010). Kod tih vrsta VP3 predstavlja dominantan kapsidni protein sa ključnom ulogom u stabilnosti virusnih čestica. Osim toga, kod nekih parvovirusa ptica VP3 protein je najvarijabilniji i imunološki najznačajniji protein, što ga čini primarnom metom neutralizujućih antitela. Tačna uloga proteina VP3 u životnom ciklusu parvovirusa, posebno u interakcijama virusa sa ćelijama domaćina i u aktivaciji imunskog sistema, još uvek se intenzivno istražuje (Yin i sar., 2012; Li i sar., 2016; Mietzsch i sar., 2019).

Pored strukturnih proteina kapsida, parvovirusi poseduju i nestrukturne proteine, NS1 i NS2, neophodne za replikaciju i ekspresiju virusnog genoma. NS1 je glavni regulatorni protein sa višestrukim funkcijama u životnom ciklusu virusa: deluje kao helikaza, ATPaza i endonukleaza, učestvuje u replikaciji virusne DNK i regulaciji transkripcije, a njegov CRM1[2]-zavisni transport između jedra i citoplazme neophodan je za umnožavanje virusa (Jin i sar., 2020; Cao i sar., 2021; Chen i sar., 2021a; Vargas-Ruíz i sar., 2025). Interakcijom sa ćelijskim proteinima COP[3] i CCT5[4], NS1 inhibira produkciju interferona tipa I (IFN-β), čime pogoduje virusnoj replikaciji, a istovremeno aktivira NF-κB[5] putem TLR2[6] i podstiče sintezu proinflamatornih citokina, uključujući IL-6 i TNF-α (Chen i sar., 2021a; Du i sar., 2024). Pored toga, NS1 indukuje apoptozu ćelija, oštećenje DNK usled akumulacije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i zastoj ćelijskog ciklusa. Sve navedeno doprinosi razvoju patoloških promena (Zhang i sar., 2019a; Vargas-Ruíz i sar., 2025). Protein NS1 sadrži i konzervisane domene i motive značajne za njegovu funkciju, ali i za taksonomsku klasifikaciju parvovirusa (Vargas-Ruíz i sar., 2025). Zahvaljujući ulozi u replikaciji, imunomodulaciji i ispoljavanju citopatogenih efekata, NS1 predstavlja centralni protein u biologiji i patogenezi parvovirusa.

Multifunkcionalni protein NS2 je uključen u virusnu replikaciju, odgovor na oštećenje DNK i sintezu proteina. Interakcijom sa CRM1 omogućava transport viriona iz jedra, pri čemu prekid ove interakcije dovodi do njihove retencije i smanjene infektivnosti (Bodendorf i sar., 1999; Ohshima i sar., 1999; Eichwald i sar., 2002). Zbog izuzetno kompaktnog genoma, parvovirusi koriste različite mehanizme ekspresije gena, uključujući alternativno iskrajanje (engl. *splicing*), alternativnu poliadenilaciju, alternativnu translaciju, a kod pojedinih predstavnika i pomeranje okvira čitanja (engl. *frameshifting*), čime se omogućava produkcija većeg broja proteina iz ograničenog genetskog materijala (Xie i sar., 2023; Uhl i Fasina, 2025).

---

[2] CRM1 (engl., *Chromosome Region Maintenance 1*) je ćelijski transportni protein koji omogućava izlazak molekula iz jedra u citoplazmu kroz jedarne pore.

[3] COP (engl., *Coat Protein Complex*) grupa proteina zadužena za formiranje vezikula.

[4] CCT5 (engl., *Chaperonin Containing TCP1 Subunit 5*) ima ulogu u formiranju proteina citoskeleta.

[5] NF-κB (engl., *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer aktiviranih B ćelija*) je grupa ćelijskih faktora koji regulišu brojne procese u ćeliji kao što su inflamatorni i/ili imunološki odgovor.

[6] TLR2 (engl., *Toll-like receptor 2*) je protein na površini ćelija ključan za pokretanje različitih signalnih puteva koji aktiviraju urođene imunološke mehanizme.

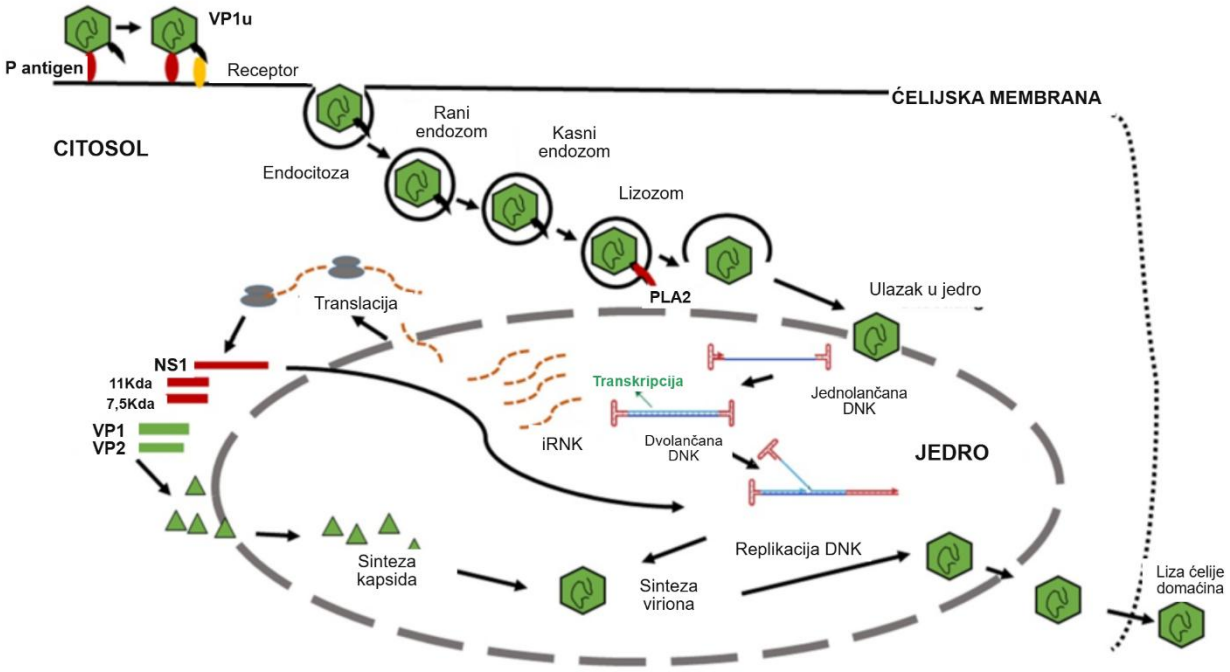
Parvovirusi su izrazito otporni u spoljašnjoj sredini, zahvaljujući odsustvu lipidnog omotača i stabilnoj strukturi kapsida, što im omogućava preživljavanje pri širokom rasponu temperatura i pH vrednosti, kao i otpornost prema brojnim uobičajenim dezinfekcionim sredstvima. Zbog toga dekontaminacija površina predstavlja značajan izazov i zahteva primenu dezinfekcionih sredstava sa dokazanim virucidnim dejstvom (Nandi i Kumar, 2010; Decaro i Buonavoglia, 2012). Visoka stabilnost virusa u spoljašnjoj sredini omogućava efikasnu indirektnu transmisiju putem kontaminiranih predmeta, zemljišta i vode, čime se olakšava održavanje i širenje infekcije između domaćih i divljih životinja koje dele ista ili susedna staništa (Decaro i Buonavoglia, 2012; Arkel i sar., 2019).

Replikacija parvovirusa usko je povezana sa životnim ciklusom ćelije domaćina, budući da se u ćelijama koje nisu u aktivnoj deobi i u ćelijama u fazi mirovanja ne odvijaju efikasna replikacija virusnog genoma niti produktivna infekcija (Cotmore i sar., 2019). Istraživanja sprovedena na stimulisanim limfocitima pokazala su da je umnožavanje parvovirusa neposredno zavisno od ćelijskog ciklusa. Limfociti koji nisu u fazi deobe ne podržavaju replikaciju virusa, iako on u njima može perzistirati određeno vreme. Nakon stimulacije ćelija, čak i nekoliko dana po infekciji, dolazi do nastavka virusne replikacije, što potvrđuje da su proliferativno aktivne ćelije neophodne za uspešno umnožavanje virusa i razvoj infekcije. Nasuprot tome, monociti i makrofagi, koji imaju ograničen proliferativni potencijal, uglavnom ne podržavaju replikaciju virusa (Paul i sar., 1979).

Infekcija parvovirusima započinje vezivanjem viriona za receptore na površini prijemčive ćelije i njegovim ulaskom putem endocitoze. Kod CPV2 i FPV najvažniji receptor jeste transferinski receptor, dok u procesu vezivanja mogu učestvovati i heparan-sulfatni proteoglikani (HSPG), sijalinska kiselina i integrini. Sposobnost korišćenja različitih receptora značajno utiče na spektar prijemčivih vrsta domaćina i na tkivni tropizam virusa (Parker i Parrish, 2000; Cotmore i sar., 2007; Boisvert i sar., 2010). Nakon endocitoze, acidifikacija endozoma dovodi do konformacionih promena kapsida i izlaganja jedinstvenog regiona proteina VP1 (VP1u), koji poseduje aktivnost fosfolipaze A2 (PLA2). Navedeni mehanizam nije univerzalan, budući da kapsidni protein PPV7 ne sadrži VP1u region ni PLA2 domen. Navedeni enzim lizira membranu endozoma i obezbeđuje oslobađanje kapsida u citoplazmu (Farr i sar., 2005; Lakshmanan i sar., 2022; Bieri i sar., 2024). Kapsidi se zatim transportuju ka jedru duž mreže mikrotubula uz pomoć proteina dineina (Mattola i sar., 2022a; Shi i sar., 2023; Chen i sar., 2024). Ulazak u jedro najčešće se odvija aktivnim transportom kroz komplekse jedarnih pora, pri čemu nuklearne lokalizacione signale (NLS) prepoznaju importin α/β kompleksi (Mäntylä i sar., 2017; Mäntylä i sar., 2018; Shi i sar., 2023; Alvisi i sar., 2023). Zbog malih dimenzija kapsida, pojedini parvovirusi mogu dospeti u jedro i alternativnim mehanizmima, uključujući prolazak kroz sistem pora u intaktnom obliku ili privremenu disrupciju jedarne membrane. Nakon ulaska u jedro, virus koristi ćelijski aparat za replikaciju DNK i započinje umnožavanje svog genoma (Slika 3) (Mäntylä i sar., 2017; Mattola i sar., 2022a).

Za uspešnu replikaciju parvovirusa neophodno je da se ćelija domaćina nalazi u S ili kasnoj S/G2 fazi ćelijskog ciklusa. Budući da ne poseduju sopstvenu DNK polimerazu, parvovirusi koriste replikacioni aparat ćelije domaćina, koji je najaktivniji tokom S faze (Gil-Ranedo i sar., 2015; Mattola i sar., 2022b). Konverzija virusnog jednolančanog DNK genoma u dvolančani oblik, neophodna za transkripciju i dalju replikaciju, takođe se odvija pretežno u S fazi (Wolter i sar., 1980; Mattola i sar., 2022b). Tokom infekcije parvovirusi mogu indukovati zaustavljanje ćelijskog ciklusa u S fazi kako bi obezbedili optimalne uslove

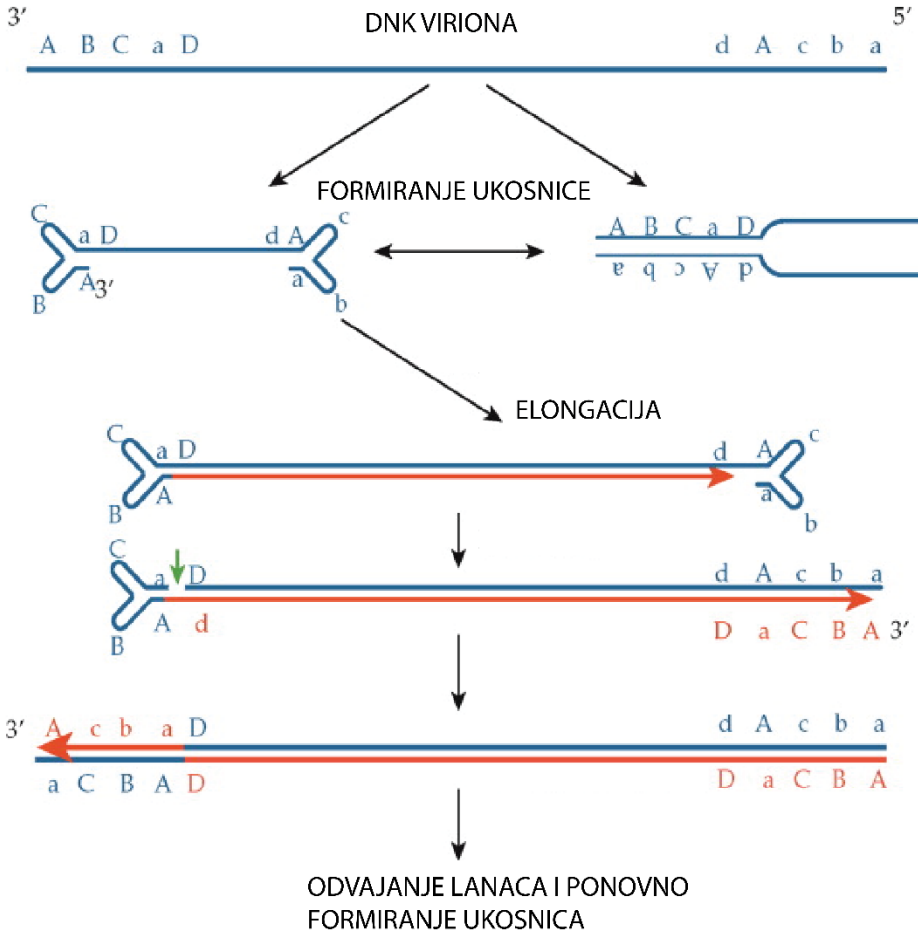
za umnožavanje. U tom procesu značajnu ulogu imaju virusni proteini, posebno NS1, koji modulišu ćelijske signalne puteve, inhibiraju mitozu i stvaraju povoljno okruženje za replikaciju virusa. Istovremeno, virusna replikacija aktivira sistem odgovora na oštećenje DNK (engl. *DNA damage response*, DDR), koji dodatno doprinosi regulaciji ćelijskog ciklusa i održavanju pogodnih uslova za replikaciju (Ganaie i sar., 2018; Chen i sar., 2024; Abrahams i sar., 2025).



Slika 3. Ciklus replikacije parvovirusa – šematski prikaz (adaptirano prema Zakrzewska i sar., 2023)

Replikacija genoma parvovirusa odvija se prema modelu „kotrljajuće ukosnice" (engl. *rolling-hairpin replication*), složenom mehanizmu čiji pojedini aspekti još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni (Slika 4). Terminalne palindromske sekvence virusnog jednolančanog DNK genoma formiraju ukosnice koje služe kao prajmeri za započinjanje replikacije; konkretno, 3′ terminalna ukosnica negativnog lanca deluje kao sopstveni prajmer (engl. *self-primer*) za sintezu dvolančane DNK. Tokom replikacije dolazi do uzastopnog otvaranja i ponovnog formiranja terminalnih struktura ukosnica, čime se omogućava višestruko započinjanje sinteze novih lanaca DNK. Nakon završetka replikacije, virusne endonukleaze učestvuju u razdvajanju međuproizvoda, pri čemu nastaju novi jednolančani genomi spremni za pakovanje u virusne čestice (Berns, 1990; Ganaie i sar., 2018; Chen i sar., 2024). Zbog izuzetno malog genoma, parvovirusi koriste alternativno iskrajanje (engl. *alternative splicing*) kako bi iz ograničenog broja gena proizveli veći broj funkcionalno različitih proteina. Ovaj proces ima ključnu ulogu u regulaciji virusne replikacije, povećanju diverziteta proteina i interakciji virusa sa ćelijom domaćina. Alternativnim iskrajanjem primarnog transkripta nastaju različite iRNK, uključujući transkripte za sintezu proteina NS1 i NS2. Kod pojedinih svinjskih parvovirusa ćelijski

RNK-vezujući protein SYNCRIP učestvuje u obradi NS1 transkripta i formiranju NS2 iRNK, pri čemu poremećaj ovog procesa negativno utiče na odnos NS1/NS2 i na efikasnost virusne replikacije (Jongeneel i sar., 1986; Naeger i sar., 1992; Cotmore i sar., 2010). Protein NS1 predstavlja glavni regulatorni protein parvovirusa i ima centralnu ulogu u replikaciji virusnog genoma: učestvuje u otpočinjanju i kontroli replikacije DNK i deluje kao helikaza, ATP-aza i specifična endonukleaza neophodna za procesiranje međuproizvoda replikacije, pri čemu može modulirati ćelijski ciklus stvarajući uslove pogodne za umnožavanje virusa (Jongeneel i sar., 1986; Ganaie i sar., 2018; Chen i sar., 2024).



Slika 4. Replikacija genoma parvovirusa prema modelu „kotrljajuće ukosnice“ (Payne, 2017)

Osnovni preduslov za razvoj parvovirusne infekcije jeste prisustvo proliferativno aktivnih ćelija. Zbog izrazite zavisnosti od ćelijskog ciklusa, parvovirusi prvenstveno inficiraju tkiva u kojima se odvijaju intenzivne ćelijske deobe. Infekcija fetusa tokom organogeneze, kao i infekcija novorođenčadi u ranom postnatalnom periodu, dovodi do brzog širenja virusa u tkivima u razvoju, njihove destrukcije i poremećaja normalnog razvoja. Tako FPV može izazvati hipoplaziju malog mozga infekcijom fetusa ili novorođenih

mačića, dok kod pasa parvovirusi mogu zahvatiti miokard u razvoju. Nakon završetka organogeneze, virusna replikacija uglavnom je ograničena na tkiva sa kontinuiranom proliferacijom ćelija, kao što su hematopoetski prekursori, limfociti i progenitorne ćelije crevnog epitela. Posledično, oštećenja izazvana parvovirusima najizraženija su upravo u ovim tkivima i po svojim karakteristikama podsećaju na promene nastale nakon izlaganja jonizujućem zračenju (Parrish, 1995; Tattersall i sar., 2013). Ćelijska smrt tokom parvovirusne infekcije najvećim delom nastaje aktivacijom apoptoze posredovane oštećenjem mitohondrija. Replikacija virusa dovodi do smanjenja membranskog potencijala mitohondrija i povećanog stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta, što pojačava oksidativni stres i destabilizuje ćelijske organele. Istovremeno, virusni protein NS1 aktivira apoptotski put povećanjem permeabilnosti spoljašnje membrane mitohondrija, oslobađanjem citohroma c u citosol i aktivacijom kaspaza 9 i 3, što naposletku dovodi do programirane ćelijske smrti (Nykky i sar., 2014; Zhao i sar., 2016; Zhang i sar., 2019a; Ma i sar., 2020).

Nakon završetka replikacije virusne DNK odvija se nekoliko ključnih događaja u životnom ciklusu parvovirusa. Tokom sklapanja kapsida novosintetisani virusni genom pakuje se u kapsid u procesu usko povezanom sa S/G2 fazom ćelijskog ciklusa, pri čemu se prethodno formirani prazni kapsidi popunjavaju virusnom DNK posredstvom kapsidnih proteina (VP) (Riolobos i sar., 2006; Gil-Ranedo i sar., 2015; Mattola i sar., 2022b). Parvovirusna infekcija uzrokuje nastanak specifičnih replikativnih centara u jedru, tzv. APAR-telašaca (engl. *autonomous parvovirus replication bodies*), koja imaju ulogu u replikaciji virusne DNK i sklapanju viriona (Cziepluch i sar., 2000; Young i sar., 2002; Ihalainen i sar., 2009), dok progresivno širenje replikativnog odeljka u jedru dovodi do izmeštanja (marginalizacije) hromatina prema periferiji, što za posledicu ima značajno strukturno preoblikovanje jedra (Ihalainen i sar., 2009; Mattola i sar., 2022b). Važno je naglasiti da se virusni kapsidni proteini (VP1 i VP2) sintetišu u citoplazmi, na ribozomima ćelije domaćina, dok se njihovo spajanje sa virusnom DNK odvija u jedru, zbog čega je neophodno da se ovi proteini prenesu kroz citoplazmu i uvezu u jedro posredstvom signala jedarnog uvoza (NLS)[7]. Do zadržavanja virusnih proteina u citoplazmi može doći usled nepravilnog nabiranja i oligomerizacije pre uvoza u jedro (Lombardo i sar., 2000; Lombardo i sar., 2002; Ros i sar., 2020), kao i usled mutacija u NLS sekvencama ili u komponentama sistema jedarnog uvoza, što onemogućava efikasan transport i uzrokuje zadržavanje VP proteina u citoplazmi (Lombardo i sar., 2000; Lombardo i sar., 2002). Nakon sklapanja kapsida i inkorporacije virusne DNK, virusne čestice napuštaju ćeliju domaćina, pri čemu novija istraživanja potvrđuju da je taj izlazak kompleksan proces koji podrazumeva aktivne i pasivne mehanizme, tesno povezane sa regulacijom ćelijskog ciklusa i apoptozom. Primarni aktivni put izlaska virusa iz jedra uključuje jedarni izvozni faktor CRM1, koji prepoznaje signal jedarnog izvoza (engl. *nuclear export signal*, NES) na virusnim proteinima, kao što su NS2 i kapsidni protein VP2, a ovaj proces odvija se paralelno sa razgradnjom jedarnog omotača tokom apoptoze i citolize. Promene u propustljivosti jedarnog omotača usko su povezane sa regulacijom kontrolne tačke G2/M ćelijskog ciklusa, koja sprečava ulazak ćelije u mitozu u prisustvu oštećene DNK ili u slučaju

[7] NLS (*Nuclear Localisation Signal*) je kratka sekvenca aminokiselina koja ima ulogu obeleživača usmeravajući protein prema jedru. Ovo je proces koji je ključan za funkcionisanje jedra i koristi se kod mnogih transportnih receptora kao što su importini i kompleks jedarnih pora.

nedovršene replikacije, a u kontekstu parvovirusne infekcije ovaj mehanizam aktivira se akumulacijom ciklina B1 i kinaze Cdk1 (Maroto i sar., 2004; Mattola i sar., 2022a; Mattola i sar., 2022b). Razgradnja jedarnog omotača (engl. *nuclear envelope breakdown*, NEBD) može biti indukovana parvovirusima posredstvom aktivacije mitotskih kinaza (kao što je ciklin-zavisna kinaza Cdk1) ili kaspaze 3, što dovodi do povećanja propustljivosti jedarnog omotača i omogućava pasivni transport kapsida, naročito tokom kasnijih faza infekcije. Virus se služi kaspazama ćelije domaćina kako bi dovršio proteolitičku razgradnju jedarnog omotača, a potom i pasivni transport virusnih čestica u citoplazmu (Mattola i sar., 2022a; Mattola i sar., 2022b). Fosforilacija kapsidnih proteina (VP2) jedan je od najznačajnijih procesa u sazrevanju virusnih čestica, budući da jedino kapsidi koji pored fosforilacije sadrže i virusni genom mogu biti efikasno transportovani, bilo aktivnim bilo pasivnim putem.

Parvovirusi svinja

Parvovirusi svinja (PPV) obuhvataju osam do danas opisanih vrsta, označenih kao PPV1–PPV8 (Vargas-Bermudez i sar., 2023; Liu i sar., 2025). Na osnovu sekvence nestrukturnog proteina NS1, PPV1 i PPV8 svrstani su u rod *Protoparvovirus*, PPV2 i PPV3 u rod *Tetraparvovirus*, PPV4–PPV6 u rod *Copiparvovirus*, dok PPV7 pripada rodu *Chaphamaparvovirus* (podfamilija *Hamaparvovirinae*) (Guo i sar., 2022; Zhao i sar., 2024; Liu i sar., 2025). Za razliku od cirkovirusa svinja i parvovirusa mesojeda, kod kojih se varijabilnost opisuje na nivou genotipova unutar jedne vrste, PPV1–PPV8 predstavljaju zasebne vrste svrstane u četiri različita roda, zbog čega se u ovom radu za njih koristi navedeni termin "vrsta". Virus PPV1 je najpoznatiji uzročnik reproduktivnih poremećaja svinja u sklopu SMEDI sindroma (engl. *stillbirth, mummification, embryonic death, infertility*) (Streck i sar., 2015; Liu i sar., 2025). Virusi PPV2–PPV8 zajednički se označavaju kao „novi" svinjski parvovirusi (nPPV) i njih odlikuje slična građa genoma, ali i značajne razlike u dužini i organizaciji ORF segmenata, naročito u genu za kapsidni protein VP, što utiče na virulenciju, tropizam i antigenske karakteristike (Vargas-Bermudez i sar., 2023; Liu i sar., 2025). Novi svinjski parvovirusi globalno su rasprostranjeni i detektuju se u različitim tkivima (pluća, limfoidno tkivo, pobačeni plodovi), često u mešovitim infekcijama sa PCV2, PCV3 i PRRSV. Najviše dokaza postoji o povezanosti PPV2 sa kompleksom respiratornih oboljenja svinja (engl. *porcine respiratory disease complex*, PRDC), dok se za PPV4, PPV6 i PPV7 sugeriše moguća uloga u reproduktivnim poremećajima, za koju, međutim, još nema potvrde (Kim i sar., 2022; Faustini i sar., 2024; Vargas-Bermudez i sar., 2024). Molekularno-epizootiološke studije pokazuju visoku prevalenciju nPPV u populacijama svinja, pri čemu PPV2, PPV3, PPV5, PPV6 i PPV7 često predstavljaju dominantan nalaz u odnosu na PPV1 u uzorcima iz tovnih kategorija i kod jedinki sa kliničkim problemima, uz učestale mešovite infekcije (Kim i sar., 2022; Zhao i sar., 2024; Vargas-Bermudez i sar., 2024). Najskorije opisani PPV8 filogenetski je svrstan u rod *Protoparvovirus*; prvobitno je detektovan u Kini, a zatim i u Južnoj Americi, gde je opisan u okviru mešovite infekcije sa PCV2 i PRRSV kod svinja sa respiratornim oboljenjem, pri čemu je njegov patogeni značaj još uvek neutvrđen (Guo i sar., 2022; Vargas-Bermudez i sar., 2024). Iako postoji sve više dokaza o mogućoj ulozi pojedinih nPPV u respiratornim sindromima svinja, naročito PPV2, za većinu ovih virusa još nije uspostavljena jasna uzročno-posledična veza sa određenim bolestima, niti je moguća njihova izolacija *in vitro*, što dodatno otežava eksperimentalnu procenu njihove patogenosti (Faustini i sar., 2024;

Vargas-Bermudez i sar., 2024). Parvovirusi svinja stoga predstavljaju heterogenu grupu virusa sa potvrđenim značajem za reproduktivno zdravlje (PPV1), dok se značaj novijih tipova tek istražuje kroz brojne studije koje ukazuju na njihovu široku rasprostranjenost, visok stepen genetičke raznolikosti kao rezultat mutacija i rekombinacija, te čestu pojavu mešovitih infekcija sa drugim virusima od značaja za zdravlje svinja (Streck i sar., 2015; Guo i sar., 2022; Vargas-Bermudez i sar., 2024; Liu i sar., 2025).

Divlje svinje su značajan rezervoar parvovirusnih infekcija za domaće svinje, pri čemu je do sada najduže i najdetaljnije proučavan PPV1 (Roić i sar., 2005; Streck i sar., 2015). Serološka istraživanja u Hrvatskoj pokazala su veliku rasprostranjenost antitela protiv PPV1 u populaciji divljih svinja (41,6%), uz značajno veću seroprevalenciju kod odraslih (70%) nego kod juvenilnih jedinki (31%), što ukazuje na intenzivnu i dugotrajnu cirkulaciju virusa na svim ispitivanim lokalitetima (Roić i sar., 2005). Slični rezultati dobijeni su u Saksoniji (Nemačka), gde su specifična antitela protiv PPV1 utvrđena kod više od polovine ispitivanih divljih svinja, sa visokim titrima u većini seropozitivnih uzoraka i bez jasne razlike prema polu ili lovištu, pri čemu su izrazito visoki titri zabeleženi kod starijih životinja (Streck i sar., 2015). Molekularna ispitivanja u Srbiji detektovala su prisustvo DNK PPV1 u 56% uzoraka divljih svinja u jednoj studiji, dok je u drugoj najčešće utvrđivan PPV3 (69,6% pozitivnih), potom PPV1 (63,8%) i PPV2 (21,7%), a PPV4 nije potvrđen, što ukazuje na to da divlje svinje predstavljaju značajan prirodni rezervoar više tipova parvovirusa (Nišavić i sar., 2021; Jezdimirović i sar., 2024). Velika studija sprovedena u Slovačkoj utvrdila je prisustvo PPV3 kod gotovo petine ispitivanih divljih svinja (19,1%), često u mešovitoj infekciji sa PCV2, a filogenetska analiza gena VP1 i NS1 ukazala je na blisko srodstvo slovačkih izolata sa sojevima iz drugih zemalja, što svedoči o globalnoj cirkulaciji ovog virusa u divljim i domaćim populacijama svinja (Sliz i sar., 2015). Velika studija sprovedena u Rusiji, zasnovana na pregledu slezine, pluća i limfnih čvorova divljih svinja iz više regiona, pokazala je prisustvo svih tipova od PPV1 do PPV7, pri čemu su najčešće detektovani PPV7 (59,3%) i PPV3 (49,1%), bez značajne povezanosti prevalencije sa polom i starošću, dok su mešovite infekcije sa PCV2 i PCV3 ocenjene kao slučajne (Komina i sar., 2025). Svi prethodno navedeni nalazi potvrđuju da su divlje svinje važan rezervoar kako za PPV1, tako i za novootkrivene tipove PPV2–PPV7, sa visokom učestalošću mešovitih infekcija i potencijalom za razmenu sojeva sa domaćom populacijom svinja.

Dijagnostika parvovirusnih infekcija svinja zasniva se na kombinaciji metoda, pri čemu direktne metode obuhvataju detekciju virusne DNK, antigena i, ređe, izolaciju virusa, dok indirektne metode podrazumevaju serološko ispitivanje prisustva specifičnih antitela (Kim i sar., 2021). Detekcija virusne DNK najčešće se sprovodi klasičnim i real-time PCR testovima, uključujući multipleks formate kojima se istovremeno identifikuje više vrsta PPV (PPV1–PPV7) ili PPV u kombinaciji sa drugim DNK virusima reproduktivnog i respiratornog trakta, uz visoku specifičnost, granicu detekcije do 10 kopija po reakciji i pogodnost za rutinsku dijagnostiku različitih vrsta uzoraka (serum, pluća, limfni čvorovi, creva, feces) (Kim i sar., 2021; Chen i sar., 2023). Izolacija parvovirusa tradicionalno se sprovodi na osetljivim ćelijskim linijama (npr. PK-15 ili primarnim ćelijama svinjskog testisa), međutim ova metoda je tehnički zahtevna, manje osetljiva od molekularnih metoda i danas se uglavnom primenjuje u istraživačke svrhe i za dobijanje antigena (Anoyatbekova i sar., 2025). Indirektna dijagnostika zasniva se pre svega na serološkim testovima za detekciju antitela, od kojih su ranije primenjivani test inhibicije

hemaglutinacije (HI) i reakcija vezivanja komplementa, dok je ELISA postala zlatni standard zahvaljujući višem stepenu automatizacije, osetljivosti i specifičnosti. Savremene varijante ELISA testa razvijene su korišćenjem rekombinantnog proteina VP2 ili virusima sličnih čestica (VLP) PPV1 kao antigena, pri čemu ih odlikuju visoka osetljivost i specifičnost, dobra korelacija sa HI testom, kao i pogodnost za epizootiološki nadzor i detekciju serokonverzije nakon vakcinacije (Gao i sar., 2022; Li i sar., 2023). Ipak, novije studije ukazuju na to da serološki testovi, naročito kod vakcinisanih krmača i nazimica, mogu biti ograničene vrednosti za procenu uspešnosti vakcinacije i zdravstvenog statusa zapata, usled uticaja maternalnih antitela, razlika između vakcina i promenljive dinamike titra antitela (Renzhammer i sar., 2024).

Aktuelna molekularno-epizootiološka istraživanja pokazuju da divlje svinje predstavljaju značajan prirodni rezervoar ne samo klasičnog PPV1, već i čitavog spektra novootkrivenih parvovirusa svinja (PPV2–PPV7), koji u ovim populacijama često cirkulišu u vidu mešovitih infekcija (Cadar i sar., 2012; Roić i sar., 2005). Preklapanje staništa, i neposredan kontakt sa domaćim svinjama u uslovima ekstenzivnog držanja omogućavaju dvosmerno prenošenje sojeva i potencijalnu rekombinaciju između virusa poreklom iz divljih i domaćih populacija (Cadar i sar., 2012). Takvo održavanje različitih parvovirusa u organizmima divljih svinja otežava kontrolu infekcija u komercijalnim zapatima i naglašava ulogu divljih svinja kao indikatora i izvora genetičke raznolikosti ovih virusa. Imajući to u vidu, nadzor parvovirusa u populacijama divljih svinja predstavlja epizootiološki značajnu, a još uvek nedovoljno istraženu komponentu kontrole, što predstavlja osnovu za ispitivanja u okviru ove disertacije.

Parvovirusi mesojeda

Pseći parvovirus tip 2 (CPV2), izuzev pasa, može da dovede do infekcije velikog broja vrsta, pri čemu se naročito izdvajaju divlji mesojedi. Prisustvo virusa dokazano je kod vukova, kojota, cibetki, oposuma, jazavaca, pa čak i pandi (Kimpston i sar., 2022; Lina i sar., 2022; Kurucay i sar., 2023). Parvoviroza mesojeda je jedno od najznačajnijih infektivnih oboljenja u veterinarskoj medicini, kako zbog visoke kontagioznosti, tako i zbog osobina samog virusa, koji se odlikuje visokom stopom mutacija i čestom pojavom novih varijanti (Li i sar., 2017). Reč je o teškom sistemskom oboljenju pasa svih rasa, naročito izraženom kod štenadi mlađe od dva meseca, koje je praćeno hemoragičnim enteritisom i ređe, miokarditisom. Uzročnik, pseći parvovirus tipa 2 (CPV2), nastao je krajem sedamdesetih godina prošlog veka, najverovatnije adaptacijom virusa srodnog uzročniku panleukopenije mačaka (FPV) na novog domaćina (Truyen, 1999). Ubrzo po pojavi, tokom 1978. godine, infekcija je poprimila formu panzootije, raširivši se po celom svetu za manje od godinu dana. Stabilnost i otpornost virusa u spoljašnjoj sredini, uz efikasan feko-oralni put širenja i prijemčivost svih pripadnika familije *Canidae*, doprineli su tako brzom širenju. Poslednjih godina miokardijalna forma sreće se sve ređe, zahvaljujući široko rasprostranjenoj vakcinaciji i kolostralnom imunitetu, dok hemoragični enteritis i dalje predstavlja ozbiljan zdravstveni problem koji neretko dovodi do fatalnog ishoda. Bliski srodnik psećeg parvovirusa jeste virus panleukopenije mačaka (FPV), sa kojim CPV2 čini vrstu *Protoparvovirus carnivoran 1* (Truyen i Parrish, 2013; Yeo i sar., 2023). Virus FPV se smatra jednim od najznačajnijih patogena domaćih i divljih mesojeda, koji enzootski cirkuliše u populacijama domaćih mačaka širom sveta (Yeo i sar., 2023). Oboljenje koje karakterišu

profuzni enteritis, izrazita leukopenija i visok mortalitet, naročito kod mladih jedinki, što je posledica tropizma virusa prema ćelijama intestinalnih kripti koje se brzo dele, koštane srži i limfoidnog tkiva, po obrascu analognom onom kod CPV2. Premda se FPV odlikuje znatno većom genetičkom stabilnošću od CPV2, koji podleže čestim mutacijama (Truyen i Parrish, 2013), oba virusa dele osnovne mehanizme patogeneze i kliničku sliku, zbog čega infekcije izazvane varijantama CPV2 kod mačaka mogu klinički podsećati na panleukopeniju.

Izvorni CPV2 nije imao sposobnost replikacije u organizmu mačaka, dok je FPV efikasno inficirao isključivo felide (Truyen, 1999). Virus CPV2 se genetički razlikuje od ranije identifikovanog psećeg parvovirusa poznatog kao minutni virus pasa (engl. *Canine minute virus*), koji je istorijski označavan kao pseći parvovirus tip 1, a prema važećoj taksonomiji svrstan je u rod *Bocaparvovirus*. Usled stalnih genetičkih promena došlo je do razvoja novih varijanti CPV2, od kojih su tri glavne: 2a, 2b i 2c (Capozza i sar., 2023). Zanimljivo je da su upravo ove novije varijante (2a, 2b i 2c), za razliku od originalnog soja CPV2 iz sedamdesetih godina prošlog veka, ponovo stekle sposobnost inficiranja mačaka. Varijanta CPV2c postala je dominantna u mnogim regionima sveta, potisnuvši ranije preovlađujuće sojeve CPV2a i CPV2b (Mira i sar., 2019; Balboni i sar., 2021a; Hao i sar., 2022a). Značaj ovih virusa nije ograničen na domaće životinje, budući da i CPV2 i FPV predstavljaju ozbiljnu pretnju za očuvanje ugroženih divljih mesojeda. Transmisija virusa između vrsta, najčešće indirektnim kontaktom sa kontaminiranom sredinom, dokumentovana je kod niza ugroženih vrsta mesojeda, uključujući velike mačke poput amurskog tigra, kod kojih FPV može dovesti do fatalnog ishoda čak i u vakcinisanim populacijama (Duarte i sar., 2013; Yeo i sar., 2023). Serološka i molekularna istraživanja sprovedena u populacijama divljih mesojeda potvrđuju rasprostranjenost protoparvovirusa u prirodi i ukazuju na to da slobodnoživeće i populacije u zoo vrtovima istovremeno predstavljaju i rezervoar ovih virusa (Duarte i sar., 2013).

Kao visoko kontagiozno infektivno oboljenje koje se primarno javlja kod štenadi i nevakcinisnih pasa, parvoviroza uzrokuje ozbiljna oštećenja gastrointestinalnog sistema, a ponekad i miokarda. Patogeneza oboljenja je povezana sa osobinama parvovirusa, pre svega zavisnošću replikacije od ćelija u deobi (S-faza ćelijskog ciklusa), što za kratko vreme dovodi do destrukcije tkiva sa intenzivnom proliferacijom, visokog mortaliteta i imunosupresije. Virus se širi feko-oralnim putem, inicijalno se umnožavajući u limfoidnom tkivu orofarinksa, a potom se krvlju širi kroz organizam, dovodeći do viremije i diseminacije u ciljne organe (Mia i Hasan, 2021; Capozza i sar., 2023; Sari i sar., 2024; Zhou i sar., 2025a). Kao i drugi parvovirusi, CPV2 ispoljava tropizam prema ćelijama u aktivnoj deobi, posebno u ćelijama intestinalnih kripti i koštane srži, a kod novorođene štenadi i u kardiomiocitima (Arora i sar., 2021). Hemoragični enteritis, praćen profuznom krvavom dijarejom, više je svojstven oboljenju uzrokovanom CPV2 nego mačjoj panleukopeniji. Iako je učestalost oboljenja opala od prvog identifikovanja virusa, zahvaljujući široko rasprostranjenoj vakcinaciji, CPV2 i dalje predstavlja značajan uzrok infektivne dijareje kod mladih pasa. Povraćanju koje je često prvi simptom, prethode anoreksija i letargija, a zatim se javlja i profuzna dijareja koja brzo dovodi do teške dehidratacije. Kod obolelih pasa javlja se dijareja neretko sa prisustvom krvi, koja perzistira do oporavka ili do uginuća. Smrtni ishod je najčešći kod mlade štenadi, kod koje sekundarno može nastati bakterijemija (Mia i Hasan, 2021; Capozza i sar., 2023; Sari i sar., 2024; Zhou i sar., 2025a). Sindrom miokarditisa, koji nastaje usled infekcije tokom prve nedelje života, obično se manifestuje kao akutna srčana insuficijencija i iznenadno uginuće štenadi, često bez prethodnih

kliničkih znakova. Štenad koja prežive akutno oštećenje miokarda mogu naknadno razviti kardiomiopatiju u uzrastu od četiri do osam nedelja. Iako je ovaj sindrom bio prilično čest po pojavi virusa, danas je redak, kao posledica široko rasprostranjenog imuniteta priplodnih kuja, koji putem kolostruma štiti većinu štenadi tokom ovog osetljivog perioda. Infekcija miokarda nastaje usled intenzivne proliferacije kardiomiocita karakteristične za prvu nedelju nakon štenjenja. Posledična inflamacija i nekroza miokarda dovode do plućnog edema i kongestije jetre usled akutne srčane insuficijencije. Kod štenadi koja prežive duže vreme razvija se kardiomiopatija, uz posledični limfocitni miokarditis i fibrozu (Capozza i sar., 2023; Sari i sar., 2024). Infekcija parvovirusom dovodi i do supresije funkcije koštane srži, koja dovodi do leukopenije, slabljenja imuniteta i posledične osetljivosti na sekundarne bakterijske infekcije (Mia i Hasan, 2021; Capozza i sar., 2023; Sari i sar., 2024).

U dijagnostici infekcija izazvanih parvovirusima mesojeda koristi se niz metoda koje se međusobno razlikuju po osetljivosti, specifičnosti, brzini i praktičnosti izvođenja. Molekularne metode, pre svega konvencionalni PCR i kvantitativni PCR (qPCR, real-time PCR), predstavljaju zlatni standard u pogledu osetljivosti i specifičnosti, ali njihovo izvođenje zahteva odgovarajuće opremljene laboratorije i obučen stručni kadar (Walter-Weingärtner i sar., 2021). Nasuprot tome, brzi antigenski testovi izvode se neposredno uz pacijenta i odlikuju se brzinom i jednostavnošću, ali im je osetljivost niska, te negativan rezultat ne isključuje infekciju kod životinje sa odgovarajućom kliničkom slikom (Walter-Weingärtner i sar., 2021). Iznenadno povraćanje i pojava krvave dijareje izrazito neprijatnog mirisa kod štenadi i mladih pasa mogu ukazivati na infekciju CPV2, ali sami po sebi nisu dovoljan dijagnostički pokazatelj. Brzi imunohromatografski testovi uzoraka fecesa omogućavaju rano otkrivanje infekcije neposredno u ambulanti, premda je izlučivanje virusa fecesom prolazno i intermitentno, što kod uzorkovanja van perioda intenzivne ekskrecije virusa može dati lažno negativan rezultat (Segev i sar., 2022). Pored fecesa, virusna DNK može se uspešno detektovati i u uzorcima pune krvi i briseva farinksa, koji u pojedinim fazama oboljenja pokazuju i veću osetljivost, zbog čega izbor mesta uzorkovanja utiče na pouzdanost molekularne dijagnostike (Segev i sar., 2022). Laboratorijska dijagnoza može se postaviti i metodom hemaglutinacije eritrocita svinje u prisustvu virusa u fekalnim ekstraktima, pri čemu uzorci poreklom od pasa sa akutnim enteritisom sadrže visoke titre virusa. Navedeni test je jednostavan i jeftin, ali manje osetljiv i specifičan od molekularnih metoda (Decaro i Buonavoglia, 2012). Za potvrdu kliničke dijagnoze koriste se i elektronska mikroskopija i izolacija virusa na ćelijskim kulturama, koje su visoko specifične, ali tehnički zahtevne, skupe i nedovoljno osetljive za rutinsku primenu, pa se danas pretežno koriste u istraživačke svrhe (Decaro i Buonavoglia, 2012). Retrospektivna dijagnostika može se postaviti serološki ispitivanjem parnih uzoraka seruma, najčešće primenom IgM i/ili IgG ELISA testa.

Najnovije studije zasnovane na filogenetskoj analizi potvrđuju da divlji mesojedi nisu tek slučajni domaćini, već aktivan rezervoar parvovirusa mesojeda. Dokumentovana je transmisija ovih virusa između domaćih i divljih populacija, pri čemu pasaža virusa kroz pojedine divlje vrste, poput rakuna, može selekcionisati mutacije u kapsidnom proteinu VP2 koje menjaju afinitet za transferinski receptor i šire spektar domaćina (Allison i sar., 2013). Upravo su takve promene omogućile da varijante CPV2 ponovo steknu sposobnost inficiranja mačaka, dok je kruženje virusa kod divljih mesojeda poput vukova, jazavaca i kuna potvrđeno u brojnim populacijama, što ove vrste svrstava među važne prirodne

rezervoare i izvore novih varijanti (Allison i sar., 2013). Osim toga, *Protoparvovirus carnivoran 1* je molekularno dokazan i okarakterisan kod zlatnog šakala u Srbiji i Hrvatskoj (Milićević i sar., 2024; Ćorić i sar., 2026), a kod crvene lisice i evropskog jazavca u susednim područjima srednje Evrope (Petroušková i sar., 2025), čime se potvrđuje cirkulacija ovih virusa u populacijama divljih mesojeda iz neposrednog okruženja. S obzirom na to da kontinuirana cirkulacija parvovirusa u divljim populacijama može da dovede do pojave novih antigenskih varijanti i potencijalno ugrozi efikasnost postojećih vakcina, ispitivanje njihovog prisustva i molekularna karakterizacija sojeva poreklom od divljih mesojeda predstavljaju jedan od zadataka ove disertacije.

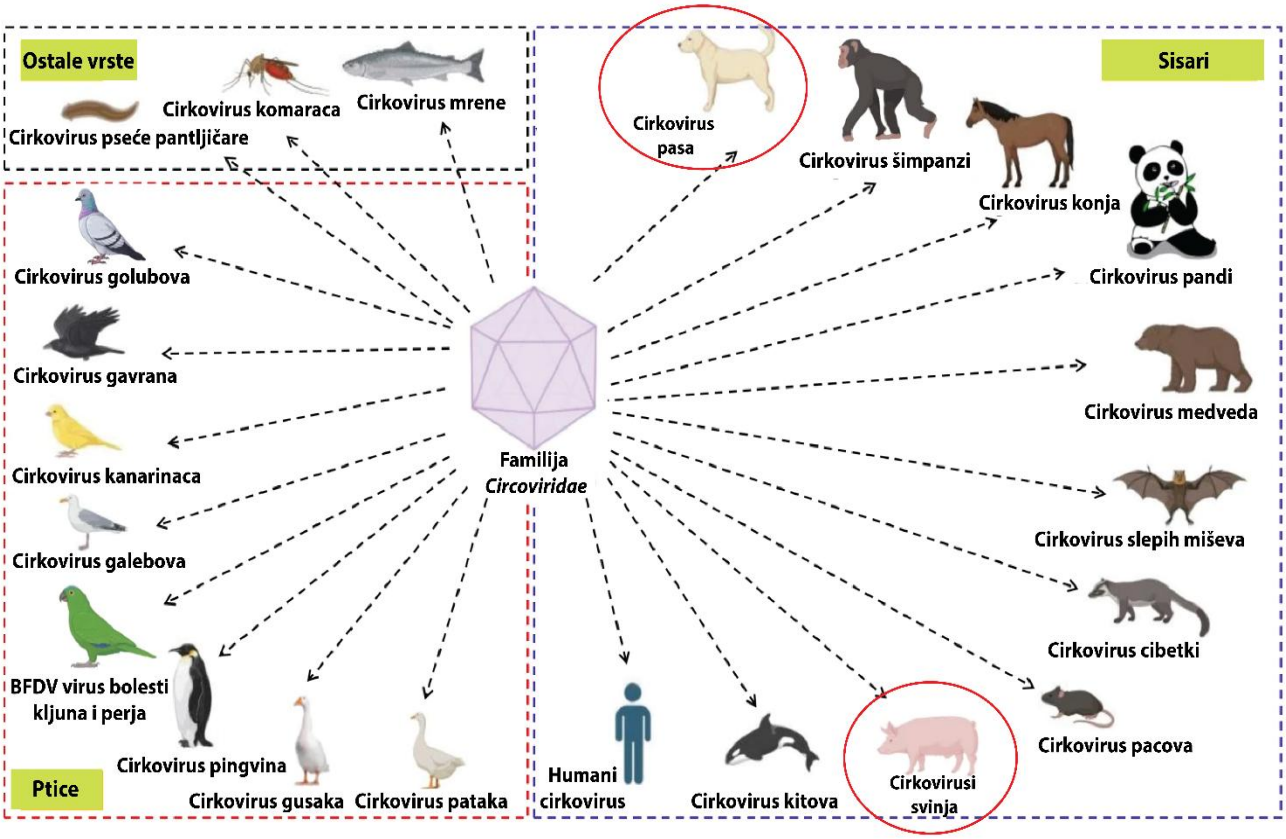
2. Biološke osobine i klasifikacija cirkovirusa

Virusi koji pripadaju familiji *Circoviridae* poseduju cirkularni jednolančani DNK genom i dele zajednička fizičko-hemijska i genetička svojstva. Zajedno sa članovima familije *Parvoviridae*, ovo su najmanji poznati DNK virusi kičmenjaka, a pokazuju i sličnosti sa jednolančanim DNK virusima biljaka. Pored patogena svinja, navedena familija obuhvata i viruse koji izazivaju oboljenja mesojeda i ptica (Breitbart i sar., 2017). Cirkovirus svinja otkriven je sedamdesetih godina prošlog veka kao kontaminent ćelijske linije PK-15 pri čemu njegovom inokulacijom u organizam svinja nije dolazilo do razvoja kliničkih simptoma, te je virus smatran nepatogenim (Yang i sar., 2024a).

Virusi iz familije *Circoviridae* imaju slične osobine viriona i genoma, ali se biološki i antigenski znatno razlikuju. Familija trenutno obuhvata dva roda, *Circovirus* i *Cyclovirus* (Breitbart i sar., 2017). Svinjski cirkovirus 1 (engl. *Porcine circovirus 1*, PCV1) pripada rodu *Circovirus*, čiji članovi poseduju dva glavna gena Rep i Cap, iako smeštena na cirkularnom genomu, kodirana na suprotnim lancima (Niu i sar., 2022; Yang i sar., 2024a). Svinjski cirkovirus 2 (PCV2), otkriven krajem devedesetih godina. Navedeni virus nanosi značajne ekonomske štete svinjarskoj proizvodnji, a izaziva širok spektar kliničkih manifestacija, od multisistemskog sindroma kržljavosti prasadi nakon zalučenja do reproduktivnih, bubrežnih i kožnih oboljenja (Niu i sar., 2022; Maity i sar., 2023; Yang i sar., 2024a). Svinjski cirkovirus 3 (PCV3), otkriven 2016. godine, povezuje se sa reproduktivnim poremećajima i oboljenjima srca (Turlewicz-Podbielska i sar., 2022; Chen i sar., 2023). Svinjski cirkovirus 4 (PCV4), identifikovan krajem 2019. godine, povezuje se sa respiratornim i digestivnim simptomima, dok mu se klinički značaj još utvrđuje (Zhang i sar., 2019b; Wang i sar., 2022; Gao i sar., 2024).

Rod *Circovirus* obuhvata i druge patogene značajne u veterinarskoj medicini: virus bolesti kljuna i perja ptica (engl. *Beak and feather disease virus*, BFDV), guščiji i golubiji cirkovirus kao i cirkovirus kanarinaca (Slika 5). Virus anemije živine (engl. *Chicken anemia virus*, CAV), ranije je svrstavan u familiju *Circoviridae*, ali je reklasifikovan u familiju *Anelloviridae*. Virioni cirkovirusa su mali (prečnika oko 20–25 nm), bez omotača, sferičnog oblika i ikosaedrične simetrije (Slika 6). Genom čini jednolančana DNK (ssDNA) dužine približno 1,7–2,1 kb, koja kodira dve glavne grupe proteina: Rep, sa ulogom u replikaciji, i Cap, proteine kapsida (Tochetto i sar., 2018; Ji i sar., 2020; Nath i sar., 2020). Virion grade isključivo 60 monomernih kapsidnih subjedinica koje okružuju virusnu DNK i formiraju oklop tipa T=1, dajući simetričnu ikosaedričnu strukturu kao najmanju i ujedno najstabilniju formu, koja se sreće i kod brojnih drugih virusa (Khayat i sar., 2011; Wang i sar., 2019a; Zhang i sar., 2019b; Nath i sar., 2020). Protein Cap je konusnog oblika u kojem

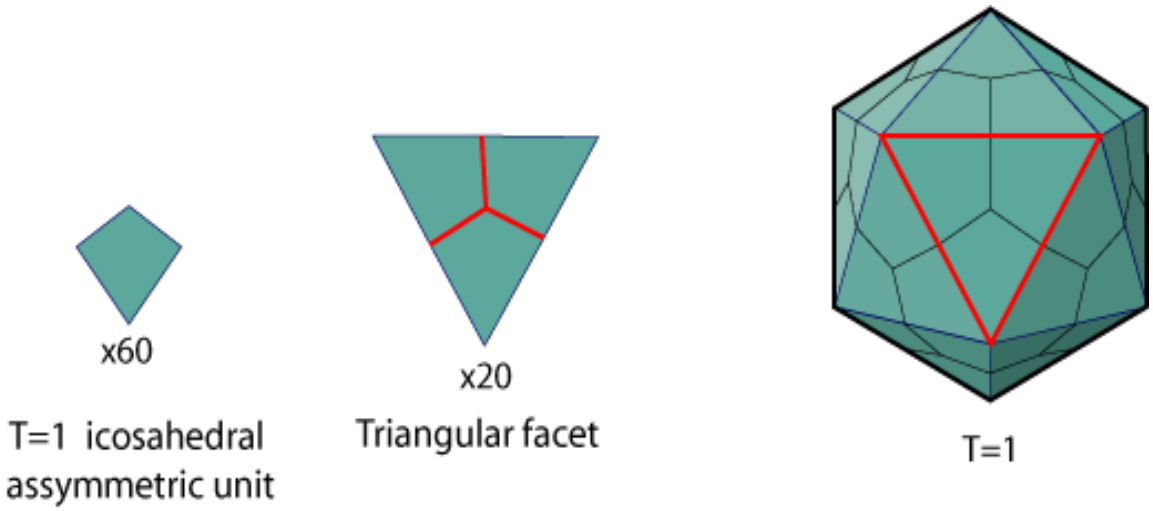
je osam beta lanaca raspoređeno u dva sloja tako da su njihovi N-terminalni krajevi, bogati argininom, okrenuti prema DNK i pospešuju njeno vezivanje (Khayat i sar., 2011).



Slika 5. Odabrani predstavnici familije *Circoviridae*; Obeleženi virusi su predmet ispitivanja ove disertacije (adaptirano prema Liu i sar., 2024)

Cirkovirusi se replikuju u jedrima inficiranih ćelija koje su u deobi. Veoma su stabilni u spoljašnjoj sredini, otporni na zagrevanje (60 °C tokom 30 minuta) i na brojne dezinficijense, a dobro podnose i različite pH vrednosti (Segalés i sar., 2005).

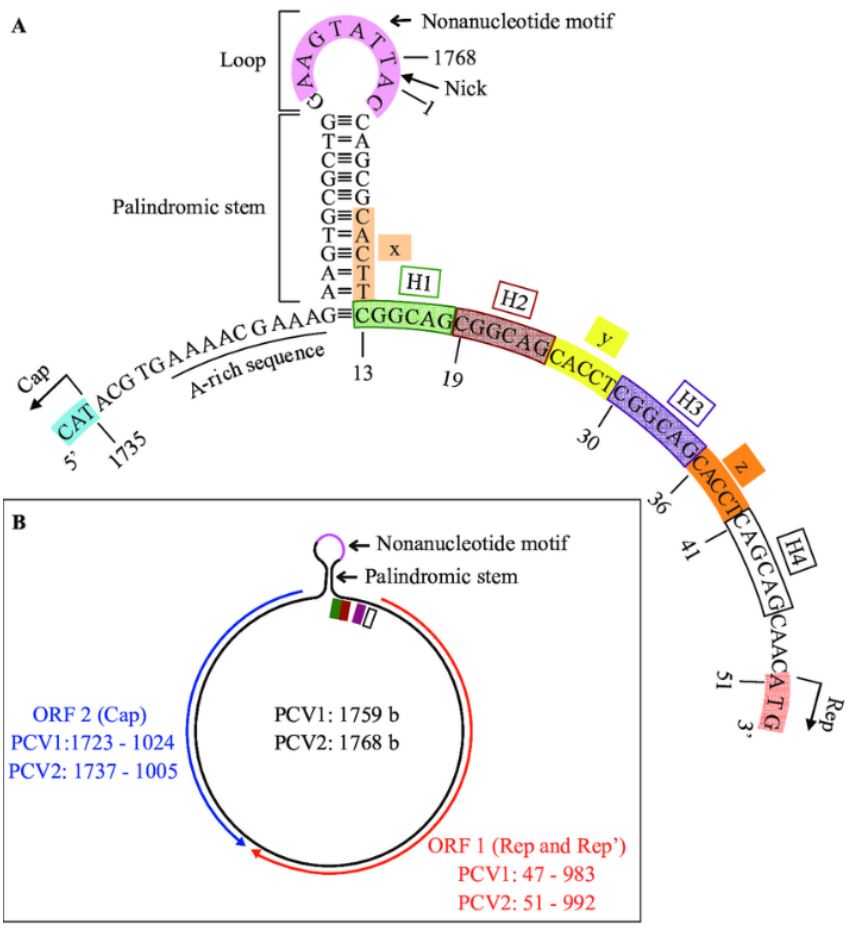
Istraživanja su otkrila nekoliko vrsta receptora na površini ćelije domaćina koji cirkovirusima omogućavaju vezivanje, prodiranje i replikaciju, a naročito se ističu heparan-sulfat i hondroitin-sulfat B (Misinzo i sar., 2009; Wei i sar., 2019; Wang i sar., 2025). Tako na primer, PCV3 primarno koristi endocitozu posredovanu klatrinom i dinaminom 2, pri čemu je za konformacione promene kapsida i oslobađanje genoma neophodna acidifikacija endozoma, dok PCV2 dodatno koristi i složeniji, ćelijski zavisan put, u kojem su za infekciju epitelnih ćelija neophodni aktin i GTP-zavisni signalni put (Misinzo i sar., 2009; Shi i sar., 2021).



Slika 6. Građa kapsida cirkovirusa (preuzeto sa https://viralzone.expasy.org/1057)

Genom cirkovirusa se replikuje mehanizmom tzv. kotrljajućeg prstena (engl. *rolling-circle replication*, RCR). Navedeni proces započinje na strukturi matične petlje, odnosno ukosnice (engl. *stem-loop*) koja predstavlja formu nastalu spajanjem dva komplementarna dela istog lanca, sa nesparenim krajem na jednom završetku. Mesto početka replikacije (engl. *origin of replication*, Ori) leži u okviru palindromske sekvence sa konzervisanim motivom od devet nukleotida (Slika 7) (Misinzo, 2007). Imajući u vidu da cirkovirusi ne sintetišu sopstvenu DNK polimerazu, ovi virusi koriste enzime ćelije domaćina, dostupne tokom S faze ćelijskog ciklusa, a jednolančana DNK se pritom konvertuje u dvolančani međuproizvod koji služi kao matrica za sintezu novih genoma (Mankertz i sar., 2004; Steinfeldt i sar., 2006; Cheung, 2012). Da bi obezbedio optimalne uslove za replikaciju, cirkovirus zaustavlja ćelijski ciklus u S fazi koristeći p53 signalni put (Xu i sar., 2016; Deng i sar., 2022). Replikacija zavisi i od faktora domaćina: protein jedarceta NPM1 stupa u interakciju sa proteinom Cap i pospešuje replikaciju genoma, a njegova posttranslaciona modifikacija, dodatno stimulisana infekcijom, ubrzava procese u jedru i sintezu virusne DNK. Protein Cap pritom sadrži signalne sekvence koje virusni genom i proteine zadržavaju u jedru (Zhou i sar., 2020; Du i sar., 2024). Ključni mehanizmi su signalni putevi NF-κB[8], JAK/STAT[9], MAPK[10] i NLRP3[11], koji podstiču sintezu citokina poput IL-6, IL-1β, IFN-γ i ISG15[12], naročito izraženu u mešovitoj infekciji sa drugim virusima (Shi i sar., 2021; Fehér i sar., 2023). Cirkovirusi mogu uzrokovati i perzistentne infekcije domaćina, premda su pomenuti mehanizmi nedovoljno istraženi i pretpostavlja se da ih omogućavaju virusni proteini koji u ranoj fazi infekcije podržavaju antiapoptotsko stanje ćelija, odnosno imunosupresija u kasnijim fazama (Fehér i sar., 2023).

[8]NF-κB Jedarni faktor kapa lakih lanaca, obezbeđuje preživljavanje i podstiče klonsku ekspanziju aktivisanih B ćelija.
[9] JAK/STAT (engl. *Janus kinase / signal transducer and activator of transcription*) signalni put kojim citokini prenose signal do jedra i pokreću ekspresiju gena imunskog i antivirusnog odgovora.
[10] MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*) mitogenom aktivirana protein-kinaza koja spoljašnje signale prevodi u odgovore poput proliferacije, apoptoze i produkcije citokina.
[11] NLRP3 (engl. *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*) jeste unutarćelijski receptor koji aktivira inflamazom i pokreće sazrevanje proinflamatornih citokina IL-1β i IL-18.
[12] ISG15 interferonom stimulisani gen 15, ključan protein urođenog imuniteta.



Slika 7. Šematski prikaz genoma cirkovirusa svinja (Misinzo, 2007)

Cirkovirusi svinja

Cirkovirusi svinja (engl. *Porcine circovirus*, PCV) ubrajaju se među najmanje poznate animalne viruse i danas predstavljaju jedan od ekonomski najznačajnijih problema u intenzivnom svinjarstvu. Reč je o sitnim virusima ikozaedarne simetrije bez spoljašnjeg omotača, čiji genom čini cirkularna jednolančana DNK dužine svega oko 1,7–2,0 kb. Genom je organizovan u vidu dva glavna okvira čitanja i to: ORF1, koji kodira proteine replikacije (Rep), i ORF2, koji kodira kapsidni protein (Cap) kao glavnu antigensku determinantu. Unutar roda *Circovirus* do danas su opisane četiri vrste svinjskih cirkovirusa, označene od PCV1 do PCV4, koje se međusobno bitno razlikuju po patogenom potencijalu i kliničkom značaju (Niu i sar., 2022; Maity i sar., 2023; Yang i sar., 2024a).

Prvi opisani predstavnik, PCV1, identifikovan je 1974. godine kao perzistentni, necitopatogeni kontaminent ćelijske linije svinjskog bubrega PK-15 i do danas se ne smatra patogenim za svinje. Tokom devedesetih godina prošlog veka, kod zalučene prasadi u Severnoj Americi i Evropi zabeležen je nov klinički entitet izvorno nazvan multisistemski

sindrom kržljanja prasadi nakon zalučenja (engl. *postweaning multisystemic wasting syndrome*, PMWS) čiji se uzročnik pokazao antigenski i genetički različitim od PCV1 i potom dobio naziv PCV2 (Niu i sar., 2022; Maity i sar., 2023). Za relativno kratko vreme PCV2 je dostigao gotovo ubikvitarnu rasprostranjenost širom sveta i prepoznat je kao značajan patogen. U savremenoj literaturi termin PMWS ustupio je mesto širem konceptu cirkovirusnih bolesti svinja (engl. *porcine circovirus diseases*, PCVD, odnosno *porcine circovirus-associated diseases*, PCVAD), pod kojim se objedinjuje više kliničko-patoloških entiteta povezanih sa infekcijom PCV2. Tu se ubrajaju sistemska bolest izazvana PCV2 (engl. *PCV2 systemic disease*, PCV2-SD), koja odgovara nekadašnjem PMWS, zatim reproduktivna bolest (PCV2-RD), subklinička infekcija (PCV2-SI) te sindrom dermatitisa i nefropatije svinja (engl. *porcine dermatitis and nephropathy syndrome*, PDNS) (Segalés, 2012; Niu i sar., 2022). Nakon uvođenja masovne vakcinacije, sve više pažnje zavređuje problem subkliničke infekcije (PCV2-SI), koja se ispoljava sniženim dnevnim prirastom bez upadljivih simptoma, dok se manifestna PCV2-SD danas sreće sporadično (Segalés, 2012; Maity i sar., 2023).

Patogeneza cirkovirusnih bolesti ima izrazito multifaktorijalan karakter imajući u vidu da prisustvo PCV2 jeste nužan, ali ne i dovoljan uslov za ispoljavanje kliničke bolesti, što je dugo onemogućavalo dokazivanje uzročnosti u skladu sa Kohovim postulatima. Za progresiju iz subkliničke u kliničku formu presudni su pridruženi činioci poput mešovite infekcije drugim patogenima (najčešće virusom reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja, PRRSV, parvovirusom svinja te bakterijom *Mycoplasma hyopneumoniae*) i nepovoljnih zoohigijenskih uslova (Pallarés i sar., 2002; Opriessnig i sar., 2007). Patohistološki, PCV2-SD karakteriše deplecija limfocita i granulomatozna upala limfoidnog tkiva sa posledičnom imunosupresijom i sklonošću ka sekundarnim bakterijskim infekcijama. Klinička slika kod obolelih životinja obuhvata zaostajanje u rastu, kržljavost, otežano disanje, proliv, žuticu i limfadenopatiju, najčešće kod prasadi starosti između 5 i 18 nedelja (Opriessnig i sar., 2007; Maity i sar., 2023). Sindrom dermatitisa i nefropatije (PDNS) imunološki je posredovano stanje zasnovano na reakciji preosetljivosti tipa III u kojoj se imunski kompleksi (IgG, IgM i komplement) talože u zidovima krvnih sudova i izazivaju nekrotični vaskulitis i fibrinozno-nekrotični glomerulonefritis. Bolest se klinički prepoznaje po nepravilnim, purpurno-crvenim makulama, papulama i nekrozama kože, najizraženijim na zadnjim ekstremitetima, perineumu i trbušnom zidu, uz apatiju, gubitak apetita i febru. Zbog upečatljive kliničke slike, PDNS zauzima važno mesto u diferencijalnoj dijagnostici klasične i afričke kuge svinja.

Genotipizacija PCV2, zasnovana na analizi gena ORF2, prema trenutno najprihvaćenijoj shemi razvrstava virus u osam genotipova (PCV2a–PCV2h), koji svi pripadaju jedinstvenom serotipu (Franzo i Segalés, 2018). Populacionu dinamiku virusa odlikuju sukcesivne smene dominantnih genotipova: izvorno preovlađujući PCV2a tokom ranih dvehiljaditih potisnut je genotipom PCV2b, da bi nakon toga PCV2d preuzeo primat u većini svetskih regiona. Visoka stopa nukleotidnih supstitucija, naglašena sklonost ka rekombinaciji i neprekidna evolucija čine PCV2 jednim od genetički najvarijabilnijih DNK virusa i što dovodi u pitanje efikasnost raspoloživih vakcina (Franzo i Segalés, 2018; Maity i sar., 2023).

Osim PCV2, u protekloj deceniji opisana su i dva dosad nepoznata svinjska cirkovirusa. PCV3 je otkriven 2016. godine u Sjedinjenim Američkim Državama, metagenomskim sekvenciranjem uzoraka poreklom od krmača sa kliničkom slikom nalik

PDNS, uz reproduktivne poremećaje, miokarditis i sistemsku inflamaciju. Danas je poznato da enzootski cirkuliše u populacijama svinja širom sveta, premda njegov puni patogeni značaj još nije konačno utvrđen (Palinski i sar., 2017; Klaumann i sar., 2018a). Pored toga, PCV4 je prvi put opisan 2019. godine u kineskoj provinciji Hunan, a potom potvrđen i u drugim delovima sveta, uključujući Evropu. Povezuje se sa respiratornim, enteričnim, kožnim i bubrežnim simptomima, ali njegov klinički značaj ostaje predmet daljih ispitivanja (Zhang i sar., 2019b; Maity i sar., 2023).

Divlje svinje zauzimaju posebno mesto u epizootiologiji cirkovirusnih infekcija i, kao rezervoar relevantan za zdravlje domaćih svinja, predstavljaju opravdan predmet naučnog interesovanja u okviru ove doktorske disertacije. Retrospektivna serološka istraživanja su pokazala prisustvo antitela protiv cirkovirusa u uzorcima poreklom od divljih svinja iz osamdesetih godina prošlog veka, a kasnija istraživanja potvrdila su cirkulaciju PCV2 i PCV3 kod ove vrste praktično na svim kontinentima (Vicente i sar., 2004; Franzo i sar., 2025). Stope seroprevalencije i molekularne detekcije znatno variraju u zavisnosti od geografskog područja i toga da li su divlje svinje intenzivno gajene. Ograđene populacije po pravilu pokazuju višu prevalenciju od onih u prirodnim staništima pri čemu su za PCV3 zabeležene vrednosti u rasponu od svega nekoliko procenata do preko 70%, uz dokumentovanu pojavu perzistentne infekcije (Vicente i sar., 2004; Klaumann i sar., 2018b). Uprkos čestoj detekciji virusnog genoma, kod divljih svinja izostaju jasne patohistološke lezije svojstvene cirkovirusnim bolestima domaćih svinja, što sugeriše da je klinički ispoljena bolest u populacijama divljih svinja malo verovatna i da su ove životinje naročito značajne kao rezervoari virusa (Klaumann i sar., 2018a; Franzo i sar., 2025).

Dijagnostika cirkovirusnih infekcija svinja oslanja se na kombinaciju molekularnih i seroloških metoda, pri čemu se dijagnoza PCV2-SD i ostalih cirkovirusnih bolesti postavlja tek povezivanjem kvantitativne detekcije virusa sa odgovarajućom kliničkom slikom i karakterističnim patohistološkim lezijama, budući da je virus prisutan i kod klinički zdravih jedinki (Segalés, 2012). Genom PCV2, PCV3 i PCV4 najčešće se dokazuje konvencionalnim i qPCR metodama, koje omogućavaju određivanje koncentracije virusa u tkivima i serumu i razlikovanje subkliničke infekcije od klinički značajne bolesti (Klaumann i sar., 2018b). Za potvrdu uzročne povezanosti virusa sa lezijama koriste se imunohistohemija i *in situ* hibridizacija, kojima se virusni antigen, odnosno nukleinska kiselina, lokalizuju neposredno u promenjenim tkivima (Opriessnig i sar., 2007). Serološke metode, pre svega ELISA, primenjuju se u nadzoru i proceni statusa zapata, ali su ograničene vrednosti za dijagnozu pojedinačnih slučajeva zbog široke rasprostranjenosti infekcije i vakcinacije (Segalés, 2012). Kod novootkrivenih cirkovirusa, naročito PCV3 i PCV4, standardizovani dijagnostički kriterijumi još uvek nisu u potpunosti uspostavljeni, što otežava procenu njihovog kliničkog značaja (Palinski i sar., 2017; Klaumann i sar., 2018a).

Najnovije filogeografske i rekombinacione analize pokazuju da divlje svinje nisu pasivan, već aktivan činilac u evoluciji i cirkulaciji svinjskih cirkovirusa. Dokumentovana je dvosmerna razmena virusa (engl. *spillover*) između domaćih i divljih svinja, podstaknuta preklapanjem staništa, neposrednim kontaktom i premeštanjem životinja u okviru lova i trgovine, kao i doprinos rekombinacije nastanku novih genotipova (Franzo i sar., 2025). Na navedeni način nezavisno održavanje virusa u divljim populacijama može umanjiti dejstvo vakcinacije u domaćim zapatima, naročito prema genotipovima koje postojeće vakcine ne pokrivaju u potpunosti. Imajući sve navedeno u vidu, sistematski nadzor cirkovirusa u

populacijama divljih svinja predstavlja epizootiološki ključnu, a još uvek nedovoljno istraženu komponentu kontrole ovih infekcija, što ujedno čini i polazište istraživanja sprovedenog u okviru ove doktorske disertacije.

Cirkovirus pasa

Pseći cirkovirus (engl. *Canine circovirus*, CanineCV), klasifikovan u rod *Circovirus* familije *Circoviridae*, predstavlja jedan od novijih virusa otkrivenih kod mesojeda i sve značajniji predmet istraživanja u veterinarskoj virusologiji (Kapoor i sar., 2012). Virus je prvi put identifikovan 2011. godine u Sjedinjenim Američkim Državama, u krvnom serumu klinički zdravih pasa, a do danas je dokazan na gotovo svim kontinentima, kako kod domaćih, tako i kod divljih mesojeda (Kapoor i sar., 2012; Beikpour i sar., 2025; Benković i sar., 2025). Klinički značaj CanineCV još uvek nije u potpunosti razjašnjen, budući da se virus dokazuje i kod obolelih i kod klinički zdravih jedinki. Uprkos tome, infekcija se dovodi u vezu sa hemoragičnim gastroenteritisom, respiratornim oboljenjima, nekrotičnim vaskulitisom i granulomatoznim limfadenitisom, a posebno se naglašava njegova uloga kao kofaktora koji pogoršava tok drugih infekcija (Li i sar., 2013; Decaro i sar., 2014). Naime, CanineCV se često dokazuje u mešovitoj infekciji sa drugim enteričnim i respiratornim patogenima, pre svega sa CPV2, pri čemu takve infekcije po pravilu prati teža klinička slika i viša stopa mortaliteta (Decaro i sar., 2014). Najteži, fatalni oblici bolesti opisani su upravo kod pasa istovremeno inficiranih sa CanineCV i CPV2 (Anderson i sar., 2017).

Divlji mesojedi imaju poseban značaj u epizootiologiji psećeg cirkovirusa, što ih čini značajnim predmetom proučavanja u okviru ove disertacije. Identični ili blisko srodni sojevi CanineCV dokazani su kod vukova, lisica, šakala i jazavaca, što potvrđuje mogućnost transmisije ovog virusa između vrsta (Canuti i sar., 2024). Prevalencija znatno varira među vrstama, od niskih vrednosti kod lisica do izrazito visokih kod vukova, kod kojih je u pojedinim populacijama virus dokazan kod gotovo polovine ispitanih jedinki, zbog čega se ova vrsta smatra prirodnim rezervoarom (Canuti i sar., 2024). Filogenetske analize razlikuju nekoliko genotipova, pri čemu se poseban genotip 5, izvorno opisan kao lisičji cirkovirus (engl. *fox circovirus,* FoxCV), javlja pretežno kod divljih mesojeda (Canuti i sar., 2024). U sklopu istraživanja u okviru ove disertacije, prisustvo i genetička raznovrsnost CanineCV nedavno su potvrđeni kod zlatnih šakala i crvenih lisica u severozapadnoj Srbiji, pri čemu su šakali nosili sojeve karakteristične za domaće pse, a lisice varijantu svojstvenu divljim mesojedima. Osim toga, istovremeno prisustvo obe varijante virusa kod pojedinih šakala ukazuje na njihovu ulogu u mešanju i rekombinaciji sojeva (Benković i sar., 2025).

Dijagnostika infekcije psećim cirkovirusom zasniva se prevashodno na molekularnim metodama, budući da se virus ne može izolovati u rutinskim uslovima, a klinička slika nije specifična. Detekcija virusne DNK najčešće se sprovodi primenom konvencionalnih i qPCR metoda (Kapoor i sar., 2012; Benković i sar., 2025). U dijagnostici je, osim dokazivanja samog genoma, značajno i utvrđivanje da li je virus zaista povezan sa uočenim patomorfološkim promenama, za šta se primenjuju imunohistohemija i *in situ* hibridizacija kao metode kojima se kapsidni protein, odnosno virusna DNK, prikazuju direktno unutar lezija u tkivu. Pored toga, sekvenciranje i filogenetska analiza Rep i Cap gena omogućavaju razvrstavanje sojeva u genotipove i praćenje njihovog porekla i širenja (Li i sar., 2013; Benković i sar., 2025).

Genetička raznovrsnost i sklonost rekombinaciji čine CanineCV virusom koji kontinuirano evoluira, a populacije divljih mesojeda predstavljaju jedan od glavnih izvora genetički raznovrsnih sojeva. Sve češći kontakt šakala i lisica sa naseljenim područjima, kao i preklapanje njihovih staništa sa domaćim psima, stvara uslove za razmenu i mešanje sojeva poreklom iz divljih i domaćih populacija, čime se otvara put nastanku rekombinantnih varijanti virusa (Benković i sar., 2025). Upravo zbog navedene dinamike, praćenje cirkovirusa kod divljih mesojeda dobija poseban epizootiološki značaj, a nedostatak takvih podataka za područje jugoistočne Evrope predstavlja jedan od razloga za sprovođenje istraživanja u okviru ove doktorske disertacije.

PREGLED LITERATURE

Klasični svinjski parvovirus (PPV1), pripadnik roda *Protoparvovirus*, decenijama je bio jedini poznati predstavnik podfamilije *Parvovirinae* koji inficira svinje i prepoznat je kao jedan od glavnih uzročnika reproduktivnih poremećaja, koji se klinički manifestuju kao sindrom SMEDI. Napredak molekularnih tehnika, a posebno metagenomskog sekvenciranja, doveo je tokom poslednje dve decenije do otkrića niza novih vrsta, označenih od PPV2 do PPV8, koji se danas svrstavaju u više rodova: *Protoparvovirus* (PPV1), *Tetraparvovirus* (PPV2 i PPV3), *Copiparvovirus* (PPV4, PPV5 i PPV6) i *Chaphamaparvovirus* (PPV7) (Jager i sar., 2021). Tokom poslednje dve decenije, primenom sekvenciranja, uz klasični PPV1, opisano je još šest novih vrsta (PPV2–PPV7), od kojih su tri najranije identifikovana PPV2, PPV3 i PPV4 (Cadar i sar., 2013a). Tako je PPV2 prvi put otkriven 2001. godine u Mjanmaru, kada je slučajno detektovan u krvnom serumu svinja tokom istraživanja hepatitisa E. Genom ovog virusa od oko 5 kb pokazao je sličnost sa parvovirusom mošusne patke i goveđim parvovirusom 3, ali se filogenetski izdvojio kao zaseban član podfamilije *Parvovirinae* (Hijikata i sar., 2001; Cadar i sar., 2013a). PPV3 je opisan 2008. godine u Hongkongu, prvobitno nazvan svinjski hokovirus (porcine hokovirus, PHoV) i blisko srodan humanom parvovirusu 4 (PARV4) i goveđem hokovirusu, a naknadno je klasifikovan kao PPV3 (Lau i sar., 2008; Cheung i sar., 2010). Slično, PPV4 je prvi put detektovan 2010. godine u Severnoj Karolini (SAD), u zapatima istovremeno pozitivnim na PCV2 i obolelim od PCVAD (Cadar i sar., 2013a; Sun i sar., 2015). PPV2 i PPV3 svrstani su u rod *Tetraparvovirus*, dok PPV4 pripada rodu *Copiparvovirus*. Svinjski parvovirus 5 (PPV5) je okarakterisan kao zasebna vrsta blisk PPV4 (Xiao i sar., 2013b), dok je PPV6 identifikovan u Kini metagenomskim sekvenciranjem materijala poreklom od pobačenih fetusa (Ni i sar., 2014). Prisustvo PPV6 ubrzo je potvrđeno i izvan Kine, prvim nalazom u Poljskoj (Cui i sar., 2017a). Nakon toga, PPV7, prvi put je opisan u Sjedinjenim Američkim Državama, a potom dokazan i u Kini (Xing i sar., 2018), pri čemu je njegova molekularna karakterizacija dopunjena nalazom u centralno-istočnoj Kini (Wang i sar., 2019c). Za detekciju svih sedam vrsta razvijene su i validirane multipleks PCR metode što je omogućilo sistematsko praćenje njihove cirkulacije u terenskim uzorcima (Kim i sar., 2021). Spektar poznatih genotipova dodatno je proširen opisom do tada nepoznatog osmog člana grupe. Primenom sekvenciranja materijala dobijenog iz uzoraka pluća obolelih svinja pozitivnih na PRRSV, u provinciji Guangdong u Kini identifikovan je novi virus, privremeno nazvan svinjski parvovirus 8 (PPV8), čiji soj GDJM2021 ima genom dužine 4380 nukleotida sa dva preklapajuća otvorena okvira čitanja (Guo i sar., 2022). Genetička identičnost PPV8 sa do tada poznatim vrstama kretala se između 16,23% i 44,18%, pri čemu je najveća srodnost utvrđena sa klasičnim PPV1, dok je retrospektivnom analizom 211 uzoraka prikupljenih tokom 24 godine ovaj virus dokazan u 37 uzoraka (17,5%) raspoređenih u dvanaest regiona Kine, čime je potvrđena njegova široka i dugotrajna cirkulacija (Guo i sar., 2022). Pokušaji izolacije *in vitro* nisu bili uspešni, što PPV8 svrstava u grupu novijih vrsta čija patogenost ostaje nerazjašnjena, slično većini članova grupe PPV2–PPV7, koji do danas nisu uspešno umnoženi u kulturi ćelija.

Genom svinjskih parvovirusa čini jednolančai linearni molekul DNK veličine približno 4 do 6 kb, sa dva glavna otvorena okvira čitanja koji kodiraju nestrukturni protein (NS1) i kapsidne proteine (VP). Uporedne filogenetske analize pokazale su da novi genotipovi ispoljavaju izraženu genetičku raznovrsnost i da evolucione činioce koji ih

oblikuju treba posmatrati odvojeno za pojedine rodove virusa. Analiza evolucije kapsidnih proteina i komparativna filogenija novih parvovirusa ukazale su na značaj rekombinacije i specifičnih selekcionih pritisaka u njihovoj diverzifikaciji, kao i na ulogu i domaćih i divljih svinja u tom procesu (Cadar i sar., 2013a,b).

Evolutivne mehanizme dodatno je rasvetlila analiza genotipova PPV2–PPV7, sprovedena na sekvencama poreklom iz Kine pri čemu je utvrđeno je da prirodna selekcija, a ne mutacioni pritisak, igra dominantnu ulogu u oblikovanju genoma (Xie i sar., 2022). Sveobuhvatna ispitivanja sprovedena u Kini potvrdila su da je za većinu genotipova vrednost odnosa nesinonimnih i sinonimnih supstitucija (dN/dS) niža od jedinice, što ukazuje na preovlađujuću purifikacionu selekciju, dok PPV7 odstupa od tog obrasca, a opisana je i rekombinacija među sojevima poreklom od divljih svinja (Li i sar., 2021). Genetička raznovrsnost PPV7 detaljno je okarakterisana na uzorcima iz južne Kine, gde je sekvenciranjem celih genoma i analizom rekombinacije među sojevima iz provincija Fudžijan i Guangdong dokumentovano postojanje više podtipova, od kojih su PPV7e i PPV7f bili najrasprostranjeniji, uz identifikaciju rekombinantnog soja 21FJ09 (Zhang i sar., 2022b). Sličan obrazac genetičke raznovrsnosti i prisustvo insercija od 3 do 15 nukleotida u kapsidnom genu šesnaest sojeva opisani su i za sojeve PPV7 iz provincije Guangsi, kod kojih je sličnost sa referentnim sojevima iznosila 93,9–97,9% za NS1 i 87,4–95,0% za kapsidni gen (Wang i sar., 2019b). Ovi nalazi zajedno ukazuju na to da PPV7, uprkos relativno nedavnom otkriću, poseduje bogatu genetičku strukturu i dinamičnu evoluciju, što ga izdvaja među novim genotipovima.

Epizootiološka istraživanja pokazuju široku rasprostranjenost novih vrsta u populaciji domaćih svinja, često sa višom prevalencijom od klasičnog PPV1. U Mađarskoj su prva ispitivanja dokazala cirkulaciju PPV2, PPV3 i PPV4 i ukazala na njihovu pojavu kao novih infekcija u svinjskim populacijama (Cságola i sar., 2012). Na velikom uzorku od 450 domaćih svinja iz Kine, prikupljenih tokom perioda od 2004. do 2014. godine, najveću prevalenciju ispoljili su PPV3 (45,11%) i PPV2 (39,56%), zatim PPV4 (21,56%) i PPV1 (5,56%), dok je za svaki virus filogenetskom analizom utvrđeno postojanje dve glavne loze (Sun i sar., 2015). Sistematska ispitivanja koja obuhvataju svih sedam vrsta dodatno su učvrstila ove nalaze. U Kini je tokom perioda od 2016. do 2020. godine na 435 kliničkih uzoraka iz osam provincija dokazana ukupna prevalencija PPV od 55,40%, pri čemu su PPV2 i PPV3 (oba 22,53%) bile najzastupljenije vrste, a mešovita infekcija sa dve do pet vrsta parvovirusa utvrđena je u 27,36% uzoraka (Li i sar., 2021). U Republici Koreji ispitivanjem 286 uzoraka seruma, 481 uzorka pluća i 281 uzorka fecesa prikupljenih u periodu od 2018. do 2020. godine dokazano je široko rasprostranjeno prisustvo svih sedam vrsta, sa najvišim stopama detekcije u plućima, gde se prevalencija kretala od 7,9% za PPV1 do 32,6% za PPV2, a najviše vrednosti zabeležene su kod tovljenika, što ukazuje na hroničnu prirodu infekcije i kontinuiranu cirkulaciju virusa (Kim i sar., 2022). Pojedine vrste pokazuju izrazit tkivni tropizam te je tako PPV2 najučestaliji u plućnom tkivu, a visoke stope detekcije zabeležene su i u tonzilama i srcu klinički zdravih tovnih svinja (Saekhow i sar., 2014).

Iako patogenost većine novih vrsta parvovirusa ostaje nerazjašnjena, sve veći broj istraživanja ukazuje na njihovu moguću ulogu u sklopu kompleksnih bolesti svinja, naročito u kombinaciji sa PCV2 i PRRSV. Pregledni radovi naglašavaju da klasični PPV1, pored patogenog uticaja u reproduktivnim poremećajima, deluje i kao kofaktor u nastanku bolesti povezanih sa PCV2 (Streck i Truyen, 2020). U eksperimentalnim mešovitim infekcijama

PPV1 i PCV2 beleži se pogoršanje kliničke slike karakteristične za PCVAD, što ukazuje na sinergistički odnos ovih virusa. Povezanost novih parvovirusa sa PCV2 potvrđena je u više terenskih studija. U kineskom istraživanju mešovita infekcija sa PCV2 bila je česta, dokazana kod 24% uzoraka za PPV3, 22,44% za PPV2, 12% za PPV4 i 4% za PPV1, što upućuje na njihovu zajedničku ulogu u cirkovirusnim bolestima (Sun i sar., 2015). Među sojevima PPV7 iz Kine mešovita infekcija sa PCV2 zabeležena je u 17,4% od 385 ispitanih seruma (Wang i sar., 2019c). Korejsko ispitivanje pokazalo je da su uzorci pozitivni na PCV2 imali značajno više stope detekcije PPV1 i PPV6, dok je prisustvo PPV2 i PPV7 bilo izraženije u uzorcima inficiranim PRRSV. Osim toga, PPV5 je bio najučestaliji u uzorcima istovremeno pozitivnim na oba patogena, čime je potvrđena povezanost pojedinih vrsta parvovirusa sa uzročnicima kompleksa respiratornih bolesti svinja (engl. *porcine respiratory disease complex*, PRDC) (Kim i sar., 2022). Posebna pažnja posvećena je ulozi PPV2 u sklopu PRDC. Dokazano je da PPV2 pretežno izaziva infekciju makrofaga i da se u plućnom tkivu obolelih životinja dokazuje hibridizacijom *in situ* u alveolarnim makrofagima, iako njegova replikacija *in vitro* nije potvrđena (Nelsen i sar., 2021). Retrospektivna ispitivanja u Ujedinjenom Kraljevstvu i Irskoj, koja obuhvataju period od 1997. do 2012. godine, pokazala su visoku prevalenciju PPV2, često u mešovitoj infekciji sa PCV2 (Lagan Tregaskis i sar., 2021). Ovi nalazi zajedno ukazuju na to da, iako Kohov postulat za samostalnu patogenost novih parvovirusa nije ispunjen, njihova dosledna povezanost sa kliničkim materijalom i drugim patogenima opravdava dalja ispitivanja njihove uloge u multifaktorijalnim bolestima svinja.

Najveći broj novijih istraživanja potvrđuje ključnu ulogu divljih svinja u održavanju i cirkulaciji svinjskih parvovirusa, pri čemu se one sve više posmatraju ne kao pasivni domaćini, već kao aktivan činilac u evoluciji i prenošenju virusa. Ranija istraživanja u Mađarskoj i Rumuniji dokumentovala su filogeniju i genetičku raznovrsnost PPV1 u populaciji divljih svinja (Cadar i sar., 2011; Cadar i sar., 2012). U Portugaliji je tokom lovne sezone 2011/2012. navedeni virus dokazan u jetri i krvnom serumu kod 24% od 50 ispitanih divljih svinja, uz visoku srodnost sojeva sa evropskim, američkim, brazilskim i kineskim referentnim sojevima (Miranda i sar., 2015). Mešovite infekcije parvovirusa i cirkovirusa dokumentovane su i u populacijama divljih svinja. U Slovačkoj je na uzorku od 194 odstreljene divlje svinje PPV3 dokazan u 19,1%, a istovremena infekcija sa PCV2 u 11,3% jedinki, čime je prvi put opisana mešovita infekcija PPV3 i PCV2 kod divljih svinja (Sliz i sar., 2015). Značaj divljih svinja kao indikatorske populacije potvrđen je i prvim nalazom PPV3 u Italiji, gde je virus metagenomskim sekvenciranjem dokazan u tkivu uginule divlje svinje, a dobijena sekvenca pokazala je najveću srodnost sa sojevima iz rumunskih divljih svinja, što ukazuje na relativno nisku evolucionu stopu i postojanje stabilnih, geografski povezanih varijanti virusa (Amoroso i sar., 2019). U ispitivanju sprovedenom u centralnoj Italiji na uzorku poreklom od 46 gravidnih krmača sa reproduktivnim poremećajima i njihovih fetusa, u najvećem broju slučajeva utvrđen je PPV1, a dobijene sekvence pokazale su blisku srodnost sa sojevima iz domaćih svinja istog područja (Pacini i sar., 2021).

Najpotpuniji uvid u rasprostranjenost različitih vrsta parvovirusa prisutnih kod divljih svinja pružila su istraživanja iz Južne Koreje, u kojima je kod odstreljenih jedinki dokazano šest od sedam vrsta (PPV1, PPV3, PPV4, PPV5, PPV6 i PPV7, ali ne i PPV2), pri čemu su korejski sojevi PPV1 nosili istih šest aminokiselinskih supstitucija u proteinu VP2 koje karakterišu virulentni soj Kresse, a utvrđena je i rekombinacija među sojevima PPV7

domaćih i divljih svinja (Park i sar., 2021). Novija istraživanja proširila su sliku geografske rasprostranjenosti. U južnoj Italiji, ispitivanjem reproduktivnih organa 63 divlje svinje, PPV1 je bio najučestaliji patogen sa prevalencijom od 44,4%, znatno ispred PCV2 (Ferrara i sar., 2024). U populaciji divljih svinja poreklom iz dela teritorije Rusije sprovedena su dva komplementarna istraživanja: u uzorcima poreklom od 476 jedinki prikupljenih u periodu 2021–2025. godine PPV1 je dokazan u 25,4% uzoraka, uz prisustvo genotipova PPV1a, PPV1b i PPV1d i mešovite infekcije sa cirkovirusima (Rykova i sar., 2026), a kod 108 jedinki iz tri ruska regiona dokazano je prisustvo PPV1–PPV7, pri čemu su najzastupljeniji bili PPV7 (59,3%) i PPV3 (49,1%) (Komina i sar., 2025). Poseban značaj imaju istraživanja na divljim svinjama Zapadnog Balkana i Srbije. Nišavić i sar. (2021) ispitali su zastupljenost i genetsku raznovrsnost parvovirusa svinja kod divljih svinja u Srbiji. U 122 uzorka organa (slezina, tonzile, limfni čvorovi) prikupljena tokom 2018. godine, DNK najmanje jednog parvovirusa dokazana je kod 54% ispitanih jedinki. Najučestaliji je bio PPV3 (69,6% pozitivnih uzoraka), zatim PPV1 (63,8%) i PPV2 (21,7%), dok PPV4 nije utvrđen. Pojedinačne infekcije bile su češće od mešovitih, a istovremeno prisustvo dva, odnosno tri virusa zabeleženo je u 34,8% i 10,1% uzoraka, najčešće u kombinaciji PPV1 i PPV3. Filogenetska analiza pokazala je da se srpski sojevi PPV1 grupišu sa evropskim i američkim sojevima domaćih svinja, ali odvojeno od kineskih sojeva i soja NADL-2, dok su sojevi PPV2 i PPV3 pokazali blisku srodnost sa sojevima iz susednih zemalja, uz nalaz da genetski različiti PPV3 sojevi istovremeno cirkulišu u populacijama divljih i domaćih svinja u Srbiji. Pored toga, u Srbiji je tokom 2023. godine, ispitivanjem uzoraka poreklom od 50 divljih svinja iz tri okruga, PPV1 dokazan u 56% uzoraka, virus Aujeckijeve bolesti u 18%, a citomegalovirus u 8%, dok PRRSV nije utvrđen (Jezdimirović i sar., 2024). U prvom opisu mešovite infekcije PPV1, PCV2 i citomegalovirusa kod divljih svinja Zapadnog Balkana, na 66 uzoraka slezine poreklom iz zapadne Srbije i Republike Srpske, prisustvo bar jednog od tri virusa utvrđeno je u 86,4% jedinki, citomegalovirus u 74,2%, PCV2 u 50%, a PPV1 u 28,8%, pri čemu su mešovite infekcije sa dva virusa zabeležene kod 42,4%, a sa tri virusa kod 12,1% životinja (Glišić i sar., 2025). Ovi nalazi učvršćuju poziciju divljih svinja kao značajnog rezervoara svinjskih parvovirusa, naročito u regionima sa rasprostranjenim ekstenzivnim i poluekstenzivnim držanjem svinja niske biosigurnosti, gde divlje populacije mogu predstavljati ulaznu tačku za unošenje patogena na komercijalne farme.

Pregled dostupne literature jasno pokazuje da se ispitivanja koja se odnose na parvoviruse i cirkoviruse svinja često ne mogu sagledavati kao odvojene celine. Do danas su opisane četiri vrste cirkovirusa svinja: PCV1, PCV2, PCV3 i PCV4 od kojih su PCV2 i PCV3 najrelevantnije za zdravlje ovih životinja. PCV1, prvobitno detektovan 1974. godine kao kontaminant PK-15 ćelijske kulture, smatra se apatogenim, dok je PCV2, identifikovan krajem 1990-ih u Severnoj Americi i Evropi, etiološki agens kompleksa oboljenja PCVAD (Segalés, 2012). Komercijalne vakcine protiv PCV2 dostupne su od 2006. godine i znatno su umanjile ekonomske gubitke, premda virus i dalje cirkuliše unutar vakcinisane populacije. Genom PCV2 iznosi 1766–1769 bp i, uz PCV1 (1758–1760 bp), spada među najmanje. S druge strane, genom PCV3 je znatno duži (1999–2001 bp), a kod PCV4 iznosi 1770 bp (Tan i sar., 2022). Sve vrste poseduju dva glavna otvorena okvira čitanja u suprotnoj orijentaciji ORF1, koji kodira replikazu (Rep), i ORF2, koji kodira kapsidni protein (Cap). Podelu na vrste unutar roda određuje granica od 80% sličnosti genoma. Na navedeni način PCV3 deli sa PCV2 manje od 50% nukleotidne sličnosti, sa svega 48% i 26–36% sličnosti u sekvenci aminokiselina u ORF1 odnosno ORF2, što potvrđuje njegovu izrazitu genetsku

divergentnost. Primenom metagenomskog sekvenciranja, PCV3 je prvi put identifikovan u SAD 2016. godine kod svinja sa simptomima koji odgovaraju PDNS i reproduktivnim poremećajima (Phan i sar., 2016; Palinski i sar., 2017), a njegova patogena uloga i dalje ostaje nepotpuno razjašnjena, budući da se često nalazi i kod klinički zdravih životinja. U Kini je PCV3 prvi put opisan u provinciji Guangdong 2016, a Wen i sar. (2018) su sekvenciranjem pokazali da se homologija celog genoma među PCV3 sojevima kretala od 97,5 do 99,4%.

Divlje svinje predstavljaju značajan rezervoar oba virusa, sa potencijalom transmisije u populacije domaćih svinja, pa su istraživanja prevalencije u divljim populacijama postala ključni element velikog broja studija. Zabeležene vrednosti prevalencije pokazuju izrazitu geografsku varijabilnost. Među najnižima su one iz Japana, gde su Kaneko i sar. (2023) detektovali PCV2 u svega 8,3% i PCV3 u 16,8% divljih svinja, uz statistički značajno češću detekciju PCV3 kod odraslih nego kod mladih jedinki. Slično, niske vrednosti prikazne su u studiji iz Južne Koreje, gde su Yang i sar. (2024b) od 296 seruma divljih svinja ustanovili PCV2, odnosno PCV3 u 15,9% uzoraka, pri čemu je dominirala infekcija PCV2 (80,9% pozitivnih), a mešovite infekcije su bile retke (4,2%). U Nemačkoj su Prinz i sar. (2019) u dve različite populacije divljih svinja u okolini Berlina našli PCV3 u 50% odnosno 23% jedinki, a PCV2 u 12,5% i 10%, uz registrovane mešovite infekcije. Nasuprot tome, najviše vrednosti potiču iz južne Italije iz ispitivanja Amoroso i sar. (2021) u kojem je kod 148 divljih svinja utvrđena prevalencija PCV2 i PCV3 od 74,32%, pri čemu je PCV2 nađen u 47,30%, PCV3 u 49,32%, a mešovita infekcija kod 22,3% jedinki, uz ženski pol kao značajan faktor rizika. U centralnoj Italiji Melegari i sar. (2025) su od 116 divljih svinja detektovali PCV2 kod 62,07% i PCV3 kod 45,16% jedinki, što je više nego kod domaćih svinja (34,97% odnosno 26,32%). U Poljskoj je PCV3 takođe veoma zastupljen. Czyżewska-Dors i sar. (2026) su u svom ispitivanju detektovali 54% uzoraka poreklom od divljih svinja pozitivnih na prisustvo PCV3 od ukupno 285 jedinki, pri čemu je virus najčešće detektovan u tkivu jetre (47,02%), a najređe u fecesu (2,5%). Jedna kineska studija koja je obuhvatila 247 divljih svinja iz 19 regiona pokazala je prisustvo PCV2 u 58,3%, PCV3 u 10,9% i PCV1 u svega 1,62% uzoraka, dok PCV4 nije zabeležen (Gong i sar., 2023). Serološki nadzor je takođe pokazao seroprevalenciju PCV2 od 53,9% (90/167 uzoraka krvnog seruma). Značajne studije na ovu temu sprovedene su i u Rusiji. Krasnikov i sar. (2024) su u Moskovskom regionu kod 30 divljih svinja našli PCV2 u 50% i PCV3 u 10% uzoraka, uz mešovitu infekciju u 13,3%, pri čemu je PCV2 pretežno detektovan u limfnim čvorovima, a PCV3 u slezini. Rykova i sar. (2026) sproveli su do sada najobimnije istraživanje ispitujući uzorke od 476 divljih svinja iz 23 regiona u periodu od 2021. do 2025. pri čemu su utvrdili PCV2 u 34,9% i PCV3 u 35,5% uzoraka, uz različite stope prevalencije zavisno od regiona, od 5,7% (Amur) do 76,0% (Belgorod) za PCV2, odnosno do 100% (Ivanovo) za PCV3. Na Balkanu i u Srbiji prikupljeno je nekoliko studija. Nišavić i sar. (2024) su ispitivali uzorke divljh svinja iz južnobanatskog okruga Vojvodine (lovna sezona 2021/2022) i detektovali DNK PCV2 u 17,48% (18/103) i PCV3 u 15,53% (16/103) jedinki, uz veoma retke mešovite infekcije (2,94% pozitivnih uzoraka). Navedeno ispitivanje je ujedno bio prvi nalaz PCV3 kod divljih svinja u Srbiji. U istočnoj Srbiji su Šolaja i sar. (2025), analizom tkiva 166 divljih svinja, dobili znatno više vrednosti i to kombinovanu prevalenciju PCV2 i PCV3 od 72,7%, odnosno 59,2% za PCV2, 49,0% za PCV3 i 31,0% za mešovite infekcije. U studiji koja obuhvata zapadnu Srbiju i Republiku Srpsku Glišić i sar. (2025) su u uzorcima 66 slezina odstreljenih divljih svinja detektovali PCV2 u

50% uzoraka, što je u skladu sa vrednostima iz južne Italije (47,3%) i Nemačke (50,7%), a iznad onih iz Mađarske (20,5%), Rumunije (13,5%) i Ukrajine (31,8%). Uočena varijabilnost prevalencije pripisuje se razlikama u tipu uzorka (tkivo nasuprot krvnom serumu, pri čemu slezina i jetra predstavljaju naročito pogodne uzorke), osetljivosti metoda (qPCR nasuprot konvencionalnom PCR), gustini populacije divljih svinja i intenzitetu uzgoja domaćih svinja u navedenim regionima.

PCV2 je trenutno klasifikovan u osam genotipova (PCV2a–PCV2h), pri čemu PCV2a, PCV2b i PCV2d cirkulišu širom sveta sa visokom prevalencijom, dok su PCV2c, PCV2e i PCV2f geografski ograničeni i smatraju se manje patogenim (Franzo i Segalés, 2018). Tokom evolucije PCV2 ističu se dva perioda: oko 2003. godine PCV2a je zamenjen genotipom PCV2b, a tokom protekle decenije usledio je drugi pomak ka PCV2d, koji je i danas dominantan. Ovu dinamiku detaljno je dokumentovala austrijska studija Weissenbacher-Lang i sar. (2020) koji su analizom 134 sekvence kapsidnog gena iz perioda od 2002. do 2017. godine ustanovili PCV2b kao najzastupljeniji (77,6%), uz PCV2d (13,4%), PCV2a (8,2%) i PCV2g (0,8%). U navedenom ispitivanju PCV2d je prvi put detektovan već 2004. godine, a oba globalna pomaka jasno su se ispoljila i pored visoke stope vakcinacije, što ukazuje na to da prirodna i vakcinom indukovana selekcija utiču na evoluciju ovog virusa. Visoka haplotipska, ali niska nukleotidna divergencija potvrdile su izuzetno visoku evolucionu stopu PCV2, najvišu među DNK virusima. Pomak ka PCV2d potvrđen je i kod divljih svinja. U Maleziji su Tan i sar. (2022) klasifikovali 96,2% sekvenci (76/79) kao PCV2d, što predstavlja izrazit kontrast u odnosu na raniju dominaciju PCV2b. U Kini su Gong i sar. (2023) kod divljih svinja utvrdili prisustvo PCV2a, PCV2b i PCV2d sa udelima od 8,75%, 38,75% i 52,5%, a Hu i sar. (2022) su detektovali PCV2b (18/19) i PCV2d. U Rusiji su utvrđena dva genotipa, PCV2b i PCV2d, uz dominaciju PCV2d (Krasnikov i sar., 2024; Rykova i sar., 2026), pri čemu je analiza prisustva rekombinacija dala negativne rezultate. U Južnoj Koreji su Yang i sar. (2024a) ustanovili PCV2d u 97,5% i PCV2a u 2,5% slučajeva. U Srbiji su Nišavić i sar. (2024) detektovali PCV2d (72,2%) i PCV2b (27,8%), pri čemu su PCV2d sojevi pripadali klasteru PCV2d-2 i grupisali se sa sekvencama iz prethodne sezone sa istih lovišta, kao i sa sojevima iz Mađarske, Kine i SAD, čime je potvrđen globalni pomak u zastupljenosti genotipova i u srpskoj populaciji divljih svinja.

Za razliku od PCV2, klasifikacija PCV3 znatno je manje ujednačena. Fux i sar. (2018) su sekvenciranjem 15 kompletnih genoma PCV3 iz Nemačke razdvojili sojeve u dve glavne klade (PCV3-a i PCV3-b), definisane specifičnim nukleotidnim i aminokiselinskim markerima na pozicijama 24, 27, 77 i 150 kapsidnog proteina. Pojedini autori su predložili i treći genotip (PCV3c), dok su Chung i sar. (2021) ponudili sistem zasnovan na podeli na PCV3-1, PCV3-2 i PCV3-3. U studiji Nišavić i sar. (2024) sojevi su pripali genotipovima PCV3-1 (87,5%) i PCV3-3c (12,5%), pri čemu su se PCV3-1 sekvence grupisale sa nemačkim sojevima, a PCV3-3c predstavnik je bio udaljen od indijskih i kineskih sojeva, što potvrđuje odsustvo geografske korelacije u distribuciji PCV3 genotipova. Svi ruski PCV3 sojevi pripadali su genotipu PCV3-a (Rykova i sar., 2026), kao i svi poljski sojevi (Czyżewska-Dors i sar., 2026). U severnoj Italiji su Franzo i sar. (2023) zabeležili visoku stopu mutacija kod sojeva PCV3 ($1{,}49 \times 10^{-3}$) i vreme do najskorijeg zajedničkog pretka (tMRCA) oko 1973. godine, uz procenu da su sojevi prenošeni sa divljih na domaće svinje približno osam puta češće nego u suprotnom smeru.

Mešovite infekcije PCV2 i PCV3, kao i udružene infekcije sa drugim svinjskim patogenima, redovno se prikazuju u dostupnoj literaturi što ukazuje na njihovu

sinergističku ulogu u PCVAD. Kod divljih svinja stope zabeleženih mešovitih infekcija PCV2 i PCV3 kreću se od 2,0% u Japanu (Kaneko i sar., 2023), od 13,3% do 16% u Rusiji (Krasnikov i sar., 2024; Rykova i sar., 2026), i sve do 22,3% u italijanskom regionu Kampanja (Amoroso i sar., 2021), dok je u centralnoj Italiji dostigla čak 29% (Melegari i sar., 2025). Kod domaćih svinja vrednosti su znatno više: u centralnoj Kini je stopa mešovitih infekcija PCV2 i PCV3 iznosila 19,7%, a u SAD je ista rasla sa 3,4% (2016. godina) na 16,1% (2018. godina). Ispitivanjem 624 uzorka seruma klinički zdravih svinja iz devet evropskih zemalja utvrđeno je prisustvo PCV2, PCV3 i mešovite infekcije u 21%, 8% i 3% uzoraka (Saporiti i sar., 2020). Pored toga, oba cirkovirusa se često nalaze udružena sa PEDV, PRRSV, PRV, CSFV i PPV. Najnoviji nalaz iz Srbije prikazali su Glišić i sar. (2025) koji su u zapadnoj Srbiji i Republici Srpskoj, od 66 slezina divljih svinja, dokumentovali istovremeno prisustvo PPV, PCV2 i PCMV, sa kumulativnom prevalencijom od 86,4% za najmanje jedan virus (PCMV 74,2%, PCV2 50%, PPV 28,8%), mešovite infekcije sa dva virusa zabeležene su kod 42,4%, a trojne kod 12,1% jedinki. U ispitivanjima iz Rusije, učestalost mešovite infekcije PCV2 i PPV1 iznosila je 6,9%, dok je infekcija sa tri virusa PCV2, PCV3 i PPV1 takođe zabeležena kod 6,9% jedinki (Rykova i sar., 2026).

Sve dosadašnje studije navode na zaključak da divlje svinje predstavljaju rezervoar PCV2 i PCV3 pri čemu imaju značajnu ulogu u cirkulaciji ovih virusa nezavisno od domaćih svinja. Najdetaljniji uvid u ovu dinamiku pružili su Almeida i sar. (2025a), koji su u Portugaliji, izvršili analizu kompletnih genoma virusa iz uzoraka poreklom od domaćih i divljih svinja. Nakon filogeografske rekonstrukcije zabeležili su višestruki unos PCV2 i PCV3 iz Kine u Evropu, potom regionalnu diverzifikaciju sojeva i širenje unutar evropskih populacija divljih svinja, uz dokaze o dvosmernoj transmisiji virusa između domaćih i divljih domaćina. Isti autori su pokazali da je rekombinacija imala značajnu ulogu u evoluciji PCV2, sa detektovanim signalima među sekvencama PCV2a i indikacijom da je genotip PCV2h verovatno nastao rekombinacionim događajem između portugalskog PCV2a i kineskog PCV2d soja. Osim toga, kod PCV3 nije detektovan nijedan rekombinacioni događaj, što sugeriše da njegova evolucija počiva pretežno na mutacijama.

Virus panleukopenije mačaka (engl. *feline panleukopenia virus*, FPV) je još početkom XX veka zabeležen kao uzročnik teškog oboljenja mačaka i dugo je smatran genetički stabilnim članom familije *Parvoviridae* (Steinel i sar., 2001; Decaro i sar., 2008). Nasuprot tome, pseći parvovirus tip 2 (engl. *canine parvovirus type 2*, CPV2) pojavio se iznenada krajem sedamdesetih godina XX veka, raširivši se u populacijama pasa širom sveta u roku od nekoliko meseci uz simptome hemoragičog gastroenteritisa i miokarditisa sa visokom smrtnošću (Buonavoglia i sar., 2001; Ikeda i sar., 2002). Naziv „tip 2" uveden je da bi se ovaj virus razlikovao od antigenski različitog psećeg parvovirusa tip 1. Danas se smatra da je CPV2 nastao adaptacijom virusa srodnog FPV, verovatno nakon infekcije nekog prelaznog domaćina, najverovatnije divljeg mesojeda, poput lisica ili rakunolikih pasa (Ikeda i sar., 2002; Allison i sar., 2013).

Oba virusa pripadaju rodu *Protoparvovirus*, unutar kojeg su prema važećoj taksonomiji svrstana u istu vrstu *Carnivore protoparvovirus 1*, odnosno prema novijoj nomenklaturi *Protoparvovirus carnivoran 1* (Leopardi i sar., 2022; Fayos i sar., 2026). Pomenutoj vrsti pripada i podgrupa parvovirusa, koja pored FPV i CPV2 sa varijantama obuhvata i virus enteritisa kuna (engl. *mink enteritis virus*, MEV), parvovirus plave lisice (engl. *blue fox parvovirus*, BFPV), parvovirus rakuna i parvovirus rakunolikog psa (Steinel i sar., 2001; Ikeda i sar., 2002). Genom, poput ostalih parvovirusa, čini jednolančana DNK

dužine oko 5.200 nukleotida sa dva otvorena okvira čitanja: prvi kodira nestrukturne proteine NS1 i NS2 uključene u replikaciju, a drugi strukturne proteine kapsida VP1 i VP2, pri čemu VP3 nastaje naknadnim proteolitičkim razlaganjem VP2 (Franzo i sar., 2019). Protein VP2 čini oko 90% kapsida i predstavlja glavnu determinantu koja određuje spektar prijemčivih domaćina, odnosno antigenska svojstva virusa (An i sar., 2011). Uprkos DNK genomu, parvoviruse mesojeda odlikuju visoke stope mutacija, približno 10^{-4} supstitucija nukleotida po mestu godišnje, što je uporedivo sa istim kod RNK virusa i pripisuje se osobenostima konformacije jednolančane DNK i selekcionom pritisku imuniteta domaćina (Decaro i sar., 2008; Nguyen Manh i sar., 2021). Ubrzo po pojavljivanju, originalni CPV2 potpuno je zamenjen antigenskim varijantama. Između 1979. i 1985. godine sukcesivno su nastale varijante CPV2a i CPV2b, koje se od izvornog tipa razlikuju u pet do šest aminokiselina, a međusobno u položajima 426 (Asn→Asp) i 555 (Ile→Val) proteina VP2 (Buonavoglia i sar., 2001; Ikeda i sar., 2002). Treća varijanta, CPV2c, opisana je 2000. godine u Italiji na osnovu jedinstvene supstitucije Asp426→Glu, koja je izmakla tada uvreženim metodama tipizacije, pa su autori za njeno razlikovanje razvili poseban RFLP test (Buonavoglia i sar., 2001). Aminokiselinski ostatak na položaju 426, smešten u okviru glavnog kapsidnog antigena, i danas predstavlja osnovni marker za razlikovanje varijanti 2a (Asn), 2b (Asp) i 2c (Glu). Razlike u spektru prijemčivih domaćina između FPV i CPV određene su sa šest ključnih ostataka VP2 (položaji 80, 93, 103, 323, 564 i 568), dok su izmene na položajima 87, 101, 300 i 305 obeležile prelaz sa CPV2 na CPV2a (Ikeda i sar., 2002; An i sar., 2011; Novosel i sar., 2019). Za razumevanje mehanizama na osnovu kojih se određuje spektar vrsta prijemčivih domaćina, ključna su istraživanja interakcije kapsida parvovirusa mesojeda sa receptorom transferina tipa 1 (engl. *transferrin receptor type 1*, TfR), koji ovi virusi koriste za ulazak u ćeliju. Callaway i sar. (2018) su pokazali da se afinitet vezivanja izrazito razlikuje u zavisnosti od vrste TfR. Osim toga, da adaptacija na receptore različitih domaćina usmerava evoluciju virusa u prirodi potvrdili su i Allison i sar. (2014) serijskim pasažiranjem virusa u ćelijskim linijama različitih vrsta mesojeda *in vitro* rekonstruisane su iste specifične kapsidne mutacije (naročito na položaju VP2 300) koje se uočavaju kod terenskih sojeva virusa, čime je pokazano da su takve promene adaptivne i da nose selekcionu prednost. Takođe, dokazana je povezanost filogenetske strukture CPV2 i kliničkog ishoda infekcije. Franzo i sar. (2019) su prvi utvrdili značajan filogenetski signal za pokazatelje težine bolesti, pre svega za broj neutrofila i leukocita, sugerišući da je virulencija nasledna osobina i da postoje sojevi različitog patogenog potencijala. Savremene filogeografske analize sve više odstupaju od klasične podele na 2a, 2b i 2c. Analizom 284 kompletna genoma i 684 sekvence VP2, de Oliveira Santana i sar. (2022) izdvojili su dve glavne globalne klade na nivou celog genoma i četiri geografski definisane klade na nivou VP2 (od kojih je jedna isključivo brazilska), koje ne odgovaraju antigenskim varijantama, a čije je poreklo vezano za Severnu Ameriku tokom osamdesetih i devedesetih godina. Slično, u Južnoj Americi opisane su filogrupe „Europe I" (uglavnom 2c) i „Asia I" (uglavnom 2a), pri čemu je „Europe I" široko rasprostranjena i detektovana i u divljoj populaciji (Grecco i sar., 2024). U Aziji je opisana i posebna klada „Asia-IV" na osnovu vijetnamskih CPV2c sojeva sa jedinstvenim mutacijama Thr112Ile u okviru VP1 gena i Ile447Met u okviru VP2 gena, uz procenjene stope supstitucije NS gena oko $3{,}1 \times 10^{-4}$ nukleotida po mestu godišnje (Nguyen Manh i sar., 2021). U ispitivanju sprovedenom u severoistočnoj Indiji sve sekvence pripadale su azijskom CPV2c sa karakterističnim ostacima (5A/G, 267Y, 324I, 370R i 440T u VP2), a pokazano je da položaj 324 razdvaja

„zapadnu" (324Tyr) od „azijske" (324Ile) klade, dok je položaj 426 pod uticajem pozitivne selekcije (Jayappa i sar., 2024). Strukturne analize kolumbijskih CPV2a i CPV2b sojeva potvrdile su da se ključne izmene (297Asn, 324Ile, 440Ala) nalaze u segmentima VP2 proteina uključenim u interakciju sa TfR, a koja ujedno predstavljaju i imunodominantne epitope (Giraldo-Ramirez i sar., 2020). Globalna distribucija varijanti pokazuje izraženu geografsku strukturu: CPV2a preovlađuje u velikom delu Azije, CPV2c u Evropi i Latinskoj Americi, dok je 2b učestaliji u pojedinim regionima (Milićević i sar., 2024). U Kini je, ispitivanjem 2.654 uzoraka fecesa iz sedam provincija, ukupno bilo 50,53% pozitivnih sa CPV2c kao dominantnim genotipom (69,04%), praćenim novim CPV2a (23,81%), izvornim CPV2 (4,42%) kao i novim CPV2b (2,7%), a pri tome su mutacije A5G, Q370R i N426E bile gotovo univerzalno prisutne među CPV2c sojevima (Li i sar., 2025a). U Brazilu je opisana velika raznolikost VP2 sekvenci uz pojavu novih varijanti tako da je pored 20 CPV2c i četiri CPV2b, identifikovano jedanaest „novih CPV2a" sojeva sa dodatnim mutacijama (de Oliveira i sar., 2019).

Poznato je da u evoluciji FPV dominira slučajni genetički drift, a ne pozitivna selekcija. Naime, analizom kompletnog gena VP2 italijanskih i britanskih sojeva ovog virusa utvrđen je odnos nesinonimnih i sinonimnih supstitucija (dN/dS) od svega 0,10, uz očuvanost fragmenata genoma koji razlikuju FPV od CPV2 (Decaro i sar., 2008). Iste zaključke potvrdila je i korejska studija, u kojoj su sojevi FPV razvrstani u tri klastera (G1–G3) bez jasne vremenske ili geografske segregacije, uz dokaz purifikujuće selekcije na genu koji kodira sintezu VP2 (An i sar., 2011). Značajno je napomenuti da su varijante CPV2a i CPV2b, za razliku od izvornog CPV2, ponovo stekle sposobnost umnožavanja u organizmima mačaka, pa se sve češće detektuju i kod domaćih i kod divljih felida (Ikeda i sar., 2002). Uprkos rasprostranjenoj vakcinaciji, CPV2 je i danas jedan od najznačajnijih uzročnika teškog oboljenja sa visokom stopom smrtnosti kod mladih pasa pri čemu se neuspeh imunizacije prevashodno pripisuje interferenciji maternalnih antitela, nepoštovanju protokola vakcinacije i mogućoj reverziji virulencije, dok je uloga antigenskih varijanti i dalje predmet ispitivanja (Decaro i sar., 2020). Analizom parcijalnog VP2 gena sojeva FPV poreklom od zlatnih šakala u Srbiji, Milićević i sar. (2024) su na filogenetskom stablu izdvojili dve podgrupe, označene kao A i B, pri čemu je jedan soj (OR236705) svrstan u podgrupu A zajedno sa sojevima poreklom od lisice i vidre iz Italije, a dva soja (OR236704 i OR236706) u genetički raznovrsniju podgrupu B. Navedena podela zasnovana je na filogenetskom grupisanju, bez formalno definisanih pragova genske divergencije, i do danas nije usvojena kao zvanična klasifikacija FPV.

Podaci regiona Balkana i dela Evrope uklapaju se u ovu sliku, ali istovremeno ukazuju i na dinamične lokalne promene. U Mađarskoj je od 50 uzoraka fecesa pasa 42 bilo pozitivno, a sekvenciranjem je utvrđeno da svi sojevi pripadaju tipu „novi CPV2a" (osim dva rekombinantna soja poreklom od vakcinalnog soja i CPV2a), uz prvi opis izmene Tyr324Ile u Evropi (Cságola i sar., 2014). U Srbiji su Milićević i sar. (2023) prvi sproveli studiju karakterizacije sojeva CPV2 kod pasa sa dijarejom. Naime, u periodu od 2008. do 2020. godine virus je detektovan u 14 od 50 rektalnih briseva (28%), pri čemu je CPV2a bio najzastupljeniji podtip (60%), praćen CPV2b (30%) i CPV2c (10%), uz jasan obrazac u kojem je CPV2a dominirao do 2018. godine, prvi CPV2b zabeležen 2019. godine, a prvi CPV2c tek 2020. godine. U susednoj Rumuniji je *Protoparvovirus carnivoran 1* bio najčešće detektovan virus kod pasa i mačaka, pri čemu je kod većine pasa zabeležen CPV2c

„azijskog" profila (324Ile, 370Arg), a jedan pas bio pozitivan na prisustvo izvornog CPV2 i FPV (Balboni i sar., 2025).

Uloga divljih mesojeda u cirkulaciji parvovirusa mesojeda je odavno poznata. Već u pregledu Steinel i sar. (2001) sistematizovani su nalazi o cirkulaciji FPV i CPV2 kod velikog broja divljih vrsta. Antitela protiv CPV2 zabeležena su još 1980. kod sivih vukova (*Canis lupus*) na Aljasci, kao i kod više populacija kojota (*Canis latrans*) u SAD, a klinička oboljenja opisana su kod dinga, ostrvskih i pustinjskih lisica, azijskih rakunolikih pasa (*Nyctereutes procyonoides*) i grmastih pasa (*Speothos venaticus*). Molekularne analize potvrdile su da je transmisija parvovirusa između različitih vrsta čest i dvosmeran proces. Tako su Allison i sar. (2013) rekonstruisali sekvence parvovirusa detektovanih kod sivih vukova, puma (*Puma concolor*), rakuna (*Procyon lotor*), risova (*Lynx rufus*) i kojota, ukazujući da su upravo rakunski parvovirusi mogli imati posredničku ulogu u prelasku izvornog CPV2 ka kasnijim antigenskim varijantama. Studija iz ekosistema Serengeti u Africi, gde se CPV2 održava u populacija pasa kao primarnom rezervoaru, pokazuje da pikovi detekcije infekcije kod lavova dosledno prate one kod pasa, što je posledica neadekvatne imunizacije pasa (Behdenna i sar., 2019). Skorašnja istraživanja u Evropi dala su detaljnu sliku prevalencije različitih genotipova CPV2 kod divljih mesojeda, uz naglašen značaj kontakta sa domaćim životinjama. U Italiji su Ndiana i sar. (2021) na velikom uzorku divljih mesojeda utvrdili CPV2 kod 54,3% vukova (uz odsustvo FPV), dok su sve lisice bile negativne na CPV2, a FPV prisutan u svega 2,8% uzoraka. Kod jazavaca je CPV2 nađen u šest od deset, a FPV u uzorcima od jedne jedinke, uz prvi opis mešovite infekcije CPV2 i FPV kod jazavca i dominaciju varijante CPV2b. Ista grupa autora naglasila je da je stopa detekcije znatno viša u crevnom sadržaju (64%) nego u slezini (2,8%), što je metodološki relevantno za buduće studije. Leopardi i sar. (2022) su, ispitujući materijal poreklom od divljih mesojeda na severoistoku Italije, dokumentovali visoku stopu cirkulacije FPV kod zlatnih šakala (*Canis aureus*) i jazavaca, dok je CPV2 nađen samo kod jednog vuka. Kod crvenih lisica (*Vulpes vulpes*) u severnoj Italiji *Protoparvovirus carnivoran 1* detektovan je kod 15,9% jedinki, uz zapažen slučaj lisice istovremeno inficirane sa FPV i CPV2b (Magliocca i sar., 2024). Novije istraživanje u severozapadnoj Italiji potvrdilo je cirkulaciju CPV2 i FPV kod tri vuka (6,4%) i jednog jazavca (4,3%), uz zabeleženu mešovitu infekciju sa CPV2c i CanineCV kod jednog vuka (Sarchese i sar., 2025). S druge strane, rezultati uzorkovanja 80 uzoraka fecesa vukova u nacionalnom parku u srednjoj Italiji parvovirusi nisu detektovani, što ukazuje na varijabilnost nalaza u zavisnosti od tipa uzorka i lokaliteta (Ferraro i sar., 2026). U severnoj Španiji je kod iberijskih vukova (*Canis lupus signatus*) *Carnivore protoparvovirus 1* molekularno potvrđen u 32,3% (42/130) uzoraka slezine, uz seroprevalenciju od 78,9% (Fayos i sar., 2026). U Slovačkoj su Petroušková i sar. (2025) prvi izvršili molekularnu karakterizaciju CPV2 kod crvenih lisica i evropskih jazavaca (*Meles meles*), sa ukupnom prevalencijom od 10,9% i dominacijom CPV2b (66,7%), dok je jedan CPV2c soj grupisan u „azijsku" liniju, što su autori protumačili kao dokaz prekograničnog unošenja virusa i njegovu transmisiju u divlje populacije. Klinički značaj transmisije virusa na divlje mesojede potvrđen je i van Evrope, kod mladunaca kojota sa gastroenteritisom u severoistočnom Meksiku izolovan je CPV2c blisko srodan meksičkim i američkim sojevima detektovanim kod pasa (Busqueta-Medina i sar., 2026). Poseban značaj imaju nalazi kod ugroženih vrsta. U Kini je prva identifikacija CPV2c kod mladunca džinovske pande (*Ailuropoda melanoleuca*) u jednom rezervatu zabeležena 2020. godine, uz prevalenciju od 14,52% (9/62) kod okolne divlje faune i visok stepen homologije

genoma (99,2–100%) između sojeva poreklom od pandi i pasa, što je ukazalo na verovatno poreklo infekcije od pasa iz obližnjih naselja (Zhou i sar., 2025b). Slično je dokumentovano i u studiji Huang i sar. (2026) gde je praćenje pasa u okruženju džinovskih pandi pokazalo molekularni potencijal cirkulišućih sojeva da inficiraju pande. Kontakt pasa i divljih mesojeda kao izvor virusa u divljini potvrđen je i u brazilskoj atlantskoj šumi, gde je CPV2 izolovan kod 67% pasa, sa CPV2c kao najzastupljenijom varijantom (50%) (Vieira i sar., 2017).

Na Balkanu, koji je u pogledu parvovirusa mesojeda i dalje nedovoljno istražen, poslednjih godina beleže se značajni podaci. U Bugarskoj je desetogodišnja studija koja je uključila 344 mesojeda (262 psa, 19 mačaka i 57 ulovljenih divljih životinja) pokazala dominaciju CPV2a (79,17%) nad CPV2b (18,52%) i CPV2c (2,31%) kod pasa, dok su od divljih životinja samo vuk i crvena lisica bili pozitivni, oba na CPV2a (Filipov i sar., 2016). U Hrvatskoj je analizom fecesa crvenih lisica iz neposredne okoline naselja parvovirus izdvojen kao jedan od dominantnih nalaza (Lojkić i sar., 2016). Naročito je značajno istraživanje zlatnog šakala kao vrste u ekspanziji pri čemu je od 55 ulovljenih šakala 40% bilo pozitivno na prisustvo FPV, a izdvojena je posebna grupa sojeva zabeležena isključivo kod hrvatskih domaćih mačaka i šakala, uz novu mutaciju A91T nađenu samo kod šakala (Ćorić i sar., 2026). U Srbiji su Milićević i sar. (2024) po prvi put ispitali cirkulaciju *Protoparvovirus carnivoran 1* u populaciji zlatnog šakala pri čemu je od 68 uzoraka slezine ulovljenih životinja 4,4% bilo pozitivno, a svi sojevi okarakterisani kao FPV, čime je ovo tek drugi svetski izveštaj o infekciji FPV kod šakala. Zlatni šakal se tako, kao vrsta u ekspanziji koja sve češće zauzima teritorije blizu naselja, izdvaja kao potencijalno važan rezervoar virusa (Leopardi i sar., 2022; Milićević i sar., 2024; Ćorić i sar., 2026).

Ukupno posmatrano, dostupna literatura potvrđuje da FPV i CPV2 sa svojim varijantama predstavljaju jedinstven kompleks virusa sa dinamičnom evolucijom koji neprekidno cirkuliše između domaćih i divljih populacija mesojeda. Divlji mesojedi predstavljaju rezervoare, ali i pogodne domaćine za gensku diverzifikaciju sojeva, dok domaći psi ostaju primarni rezervoar za održavanje parvovirusa.

Cirkovirus pasa (u novijoj literaturi CanineCV) prvi put je opisan 2012. godine kod naizgled zdravih pasa u Sjedinjenim Američkim Državama, kada je kompletno sekvenciran genom soja NY214 (Kapoor i sar., 2012). Poput drugih predstavnika familije *Circoviridae*, navedeni virus poseduje kaspid ikosaedrične simetrije prečnika 15–17 nm, sa jednolančanim cirkularnim DNK genomom veličine približno 2.063 nukleotida. Genom je organizovan u dva glavna, suprotno orijentisana otvorena okvira čitanja (engl. *open reading frames*, ORF): ORF1, koji kodira replikazu (Rep), i ORF2, koji kodira kapsidni protein (Cap) (Kapoor i sar., 2012; Hao i sar., 2022a). Kapsidni i replikazni proteini CanineCV dele svega oko 25%, odnosno 50% sličnosti sa poznatim cirkovirusima drugih vrsta, što je, prema kriterijumima Međunarodnog komiteta za taksonomiju virusa (ICTV) dovelo do uspostavljanja nove vrste unutar roda (Kapoor i sar., 2012; Varsani i sar., 2024). U okviru poslednje taksonomske revizije porodice *Circoviridae* iz 2024. godine uspostavljena je binomna nomenklatura vrsta, pa je ranija vrsta *Canine circovirus* preimenovana u *Circovirus canine*, dok naziv samog virusa (CanineCV) ostaje nepromenjen (Varsani i sar., 2024). Nedugo nakon prvobitnog opisa u SAD, virus je potvrđen u Italiji, gde je povezan sa slučajevima nekrotizujućeg vaskulitisa i granulomatoznog limfadenitisa, praćenih hemoragičnim gastroenteritisom (Zaccaria i sar., 2016). Rani slučaj hemoragičnog cirkovirusnog enteritisa opisan je i kod psa iz američke savezne države Konektikat (Van

Kruiningen i sar., 2019). CanineCV je od tada identifikovan na gotovo svim kontinentima izuzev Okeanije. Retrospektivne analize arhivskih uzoraka pokazale su da je virus cirkulisao znatno pre svog formalnog otkrića. Naime, DNK CanineCV detektovana je u uzorcima arktičkih lisica sakupljenim još 1996. godine u Norveškoj, petnaest godina pre prvog opisa kod pasa u SAD (Urbani i sar., 2021). Italijanska studija fokusirana upravo na pitanje porekla virusa, sprovedena na lisicama severne Italije, dodatno je podržala hipotezu da su divlje životinje predstavljale dugotrajni evolutivni rezervoar virusa pre njegove detekcije kod pasa (Franzo i sar., 2021). Procenjeno vreme najskorijeg zajedničkog pretka (tMRCA) čitave vrste smešta se, prema pojedinim molekularno-evolutivnim analizama, u kraj XIX veka, oko 1878. godine (Liu i sar., 2024), dok druga analiza smešta ovaj datum još dublje u prošlost (Wang i sar., 2021).

U današnje vreme, veliki broj studija iz celog sveta ukazuje na široku rasprostranjenost ovog uzročnika. U Brazilu je opisan prvi kompletan genom CanineCV kod psa rase nemački ovčar sa intermitentnim hemoragičnim gastroenteritisom, pri čemu je soj D1056 pokazao 98% sličnosti čitavog genoma sa prototipskim sojem iz SAD (Cruz i sar., 2020). Naredna brazilska studija, sprovedena u regionu Amazonije, predstavlja prvu detekciju CanineCV u tom delu Južne Amerike (Cardoso i sar., 2023). U Argentini je opisan soj UBA-Baires identifikovan u slučajevima enteritisa štenadi, filogenetski blizak evropskim, prvenstveno italijanskim sojevima (Kotsias i sar., 2019). U Kini, gde je opisan veliki broj molekularnih studija, retrospektivna analiza obuhvatila je period od 1996. do 2023. godine i 266 kompletnih sekvenci genoma CanineCV (Liu i sar., 2024). U još jednoj studiji iz Kine, od 359 uzoraka krvi pasa, 34 uzorka (9,5%) bila su pozitivna (Lv i sar., 2023). Novija kineska studija u kojoj je ispitivano 887 rektalnih briseva pasa iz četiri provincije identifikovala je 21 pozitivan uzorak (2,37%) i predložila podelu ovog virusa na sedam podtipova (Ji i sar., 2024). U jugoistočnoj Aziji, u Vijetnamu, opisana je mešovita infekcija CanineCV i CPV2 kod 254 psa sa kliničkom slikom enteritisa u 22,83% ispitanih uzoraka (Minh i sar., 2026). Na Tajlandu je, pored inicijalne studije respiratornih oboljenja pasa (Dankaona i sar., 2022), sprovedena i detaljna molekularna karakterizacija kapsidnog gena CanineCV, uz ispitivanje imunodominantnih epitopa (Dankaona i sar., 2024). U Kazahstanu su opisani slučajevi akutnog gastroenteritisa sa visokim mortalitetom kod službenih pasa u Almatiju pri čemu je nakon sekvenciranja detektovanih sojeva CanineCV utvrđena filogenetska bliskost kineskim i tajlandskim sojevima (Sabyrzhan i sar., 2025). U Iranu su sprovedena dva nezavisna istraživanja. Beikpour i sar. (2022) izvršili su molekularnu karakterizaciju CanineCV kod pasa bez simptoma gastroenteritisa, dok su Faraji i sar. (2022) ispitivali 203 uzorka fecesa pasa i pronašli CanineCV isključivo u mešovitoj infekciji sa parvovirusom pri čemu je utvrđena filogenetska bliskost sa turskim sojevima. U Turskoj je kod 150 pasa poreklom iz skloništa sa gastrointestinalnim simptomima CanineCV dokazan kod 6% životinja (Turan i Işıdan, 2020). U Nigeriji je po prvi put molekularno dokumentovano prisustvo CanineCV kod 14% od 100 pasa (Ndiana i sar., 2023).

Klasifikacija CanineCV predstavlja predmet velikog broja skorijih studija i prošli su kroz nekoliko faza, od inicijalne podele na dve grupe zasnovane na ORF2 (Piewbang i sar., 2018), preko podele na četiri, a zatim i na šest genotipova (Urbani i sar., 2021; Beikpour i sar., 2022; Liu i sar., 2024; da Silva i sar., 2025). Numeracija genotipova pri tome nije ujednačena u literaturi. Urbani i sar. (2021) i Beikpour i sar. (2022) grupu koja obuhvata sojeve iz Evrope, Severne i Južne Amerike i Afrike označavaju kao genotip 1, a azijske

sojeve kao genotipove 2, 3 i 4. U ovom radu, kao i u istraživanju Benković i sar. (2025), primenjena je numeracija u kojoj navedena grupa nosi oznaku genotip 4, a azijski sojevi oznake 1, 2 i 3, dok su oznake genotipa 5 (sojevi divljih mesojeda, raniji naziv FoxCV) i genotipa 6 (iranski sojevi) istovetne u oba pristupa. Sastav i topologija svih grupa podudaraju se sa prethodno objavljenim rezultatima, a razlikuju se isključivo njihove brojčane oznake. Važno je napomenuti da genotip 5 (raniji naziv FoxCV) obuhvata sojeve poreklom od divljih mesojeda, prvenstveno lisica, dok genotip 6 čine isključivo iranski sojevi. Pored navedene podele, novija analiza autora iz Kine predlaže finiju podelu na sedam podtipova (CCV-1a do 1e, CCV-2a, CCV-2b), zasnovanu na rezultatima analize 887 rektalnih briseva i 84 referentna soja, što ukazuje da sistemi klasifikacije CanineCV još uvek nisu potpuno usaglašeni u literaturi (Ji i sar., 2024).

Genetička rekombinacija predstavlja jedan od najznačajnijih mehanizama evolucije CanineCV, a prvi put je dokumentovana kod tajlandskih sojeva poreklom od pasa (Piewbang i sar., 2018). U populaciji pasa iz Kine identifikovano je devet rekombinantnih događaja među 167 sekvenci (Lv i sar., 2023). Osim toga, analiza 266 genoma ovog virusa iz većeg broja zemalja identifikovala je 31 potencijalni rekombinantni događaj (Liu i sar., 2024), dok je posebna studija evolutivne dinamike, zasnovana na metagenomskom ispitivanju uzoraka poreklom od pasa iz skloništa (32,4% pozitivnih), potvrdila postojanje pet filogenetskih grupa i analizirala prostorno-vremensku distribuciju virusa (Li i sar., 2025b). Studija Wang i sar. (2021) posebno se bavila poreklom virusa ispitivanjem 93 dostupne sekvence. Analize selekcionog pritiska u većini studija ukazuju na dominaciju purifikacione (negativne) selekcije u evoluciji Cap i Rep gena (Lv i sar., 2023; Benković i sar., 2025).

Klinički značaj infekcije izazvane CanineCV ostaje predmet ispitivanja, budući da se virus često detektuje i kod klinički zdravih životinja. Stopa identifikovanih slučajeva mešovitih infekcija sa CPV2 opisana je u rasponu od 15,6% do 57,7% (da Silva i sar., 2025), pri čemu su ranije studije sprovedene na uzorcima pasa iz Italije pozitivnih na CPV2 pokazale da prisustvo CanineCV i adenovirusa pasa (CAdV) nije bilo povezano sa težim ishodom bolesti (Balboni i sar., 2021b). Eksperimentalno je pokazano da rekombinantni Rep protein CanineCV ispoljava citopatogene efekte i inhibira aktivaciju promotora interferona tipa I, blokirajući ekspresiju gena stimulisanih interferonom (ISG). Pretpostavlja se da CanineCV, izazivajući imunosupresiju, na taj način olakšava replikaciju CPV2, doprinoseći težem kliničkom toku mešovitih infekcija (Hao i sar., 2022b). Patohistološki, kod pasa sa respiratornim oboljenjem i dokazanim prisustvom CanineCV opisane su generalizovana hemoragično-piogranulomatozna pneumonija i teški difuzni supurativni, hemoragični i nekrotični alveolitis (da Silva i sar., 2025).

Uloga divljih mesojeda u ekologiji i evoluciji CanineCV predstavlja jedno od najdinamičnijih polja istraživanja poslednje decenije. Prve sistematske dokaze pružila je italijanska studija koja je obuhvatila 389 uzoraka od 277 jedinki i to: pasa, vukova, lisica i jazavaca. U navedenoj studiji CanineCV je detektovan kod čak 26,4% vukova, 3,8% pasa i 10% jazavaca, dok kod lisica virus nije dokazan (Zaccaria i sar., 2016). Novija italijanska studija, sprovedena na 262 divlje životinje (lisice, vukovi, jazavci) pokazala je prisustvo CanineCV kod 50% vukova i 18% jazavaca, ali kod nijedne lisice, dok je adenovirus tipa 1 dokazan isključivo kod lisica, što ukazuje da distribucija virusa među vrstama i regionima Italije nije uniformna (Ndiana i sar., 2022). Ova zapažanja dodatno su proširena studijom o italijanskim vukovima sa Apenina, gde je CanineCV bio drugi najčešće detektovani DNK

virus, sa 47,8% jedinki inficiranih sa dva ili tri virusa (Balboni i sar., 2021c), kao i novijom studijom iz severozapadne Italije, gde je kod jednog vuka inficiranog varijantom CPV2c dobijen kompletan genom CanineCV (Sarchese i sar., 2025). Prisustvo CanineCV kod lisica potvrđeno je u nekoliko nezavisnih evropskih studija. U Ujedinjenom Kraljevstvu, cirkovirus je otkriven u serumu i moždanom tkivu lisica sa meningoencefalitisom, pri čemu su sekvence poreklom od lisica formirale odvojene filogenetske grane od sekvenci poreklom od pasa. Infekcija kod lisica bila je povezana sa neurološkim znacima bolesti, za razliku od slike kod kliničke slike kod pasa koju odlikuju gastroenteritis i vaskulitis (Bexton i sar., 2015). U Hrvatskoj je cirkovirus lisica (FoxCV, danas poznat kao genotip 5 CanineCV) opisan u fecesu crvenih lisica iz periurbanih područja centralne Hrvatske, gde je predstavljao najzastupljeniji virus u uzorku ispitanom metagenomskim sekvenciranjem (Lojkić i sar., 2016). Retrospektivna analiza uzoraka poreklom od 51 arktičke lisice sa Svalbarda i 59 crvenih lisica sa kontinentalne Norveške pokazala je prisustvo virusne DNK kod jedinki čiji je materijal uzorkovan još 1996. godine, čime je dokazano da su divlje lisice mogle predstavljati domaćina CanineCV čitavu deceniju pre njegovog prvog opisa kod pasa (Urbani i sar., 2021). Van Evrope, cirkovirus lisica je opisan i u Severnoj Americi: u Kanadi (Njufaundlend), analiza uzoraka fecesa lisica pokazala je da severnoamerička populacija lisica nosi sopstvenu, gensku liniju (Canuti i sar., 2022). Upravo ovi kanadski sojevi pojavljuju se kao zasebna linija u filogenetskim stablima novijih evropskih studija, uključujući srpsku koja predstavlja deo ispitivanja ove disertacije (Benković i sar., 2025). U američkoj saveznoj državi Arizoni, analiza uzoraka fecesa kojota (*Canis latrans*) identifikovala je male cirkularne DNK viruse srodne CanineCV, proširujući poznati spektar domaćina virusa na još jednu severnoameričku vrstu divljih mesojeda (Hess i sar., 2024).

Najsveobuhvatnija molekularna studija CanineCV u regionu Balkana sprovedena je u Srbiji u sklopu ove disertacije i to na uzorku od 98 jedinki šakala (*Canis aureus*) i crvenih lisica (*Vulpes vulpes*) iz severozapadne Srbije (Benković i sar., 2025). Cirkovirusna DNK dokazana je kod 31,6% uzoraka, sa jasnom razlikom u distribuciji genotipova između vrsta. Šakali su pretežno bili pozitivni na CanineCV genotip 4 (isti koji dominira kod pasa), dok je kod lisica preovlađivao genotip 5, tipično povezan sa divljim mesojedima. Mešovite infekcije genotipom 4 i genotipom 5 zabeležene su isključivo kod šakala, što ukazuje da ova vrsta može predstavljati domaćina kod kojeg dolazi do "mešanja" virusnih linija što potencijalno dovodi do genetičkih rekombinacija (Benković i sar., 2025). U regionu ističe se i studija iz Mađarske koja je, metagenomskim ispitivanjem 206 uzoraka poreklom od lisica, jazavaca, šakala, kuna i rakunolikih pasa ukazala na rekombinaciju kao ključni pokretač evolucije CanineCV (Fehér i sar., 2025). Značajna je i sasvim nova studija u Rumuniji, koja je po prvi put opisala prisustvo CanineCV kod pasa iz Rumunije (26,8% od 56 pasa), pri čemu je jedan soj filogenetski grupisan sa sojevima tipično prijavljivanim kod lisica, sugerišući moguću transmisiju među divljim i domaćim vrstama (Balboni i sar., 2025). Osim Evrope prisustvo CanineCV potvrđeno je i kod crnoleđih šakala u Namibiji, gde je retrospektivnom analizom arhivskih uzoraka po prvi put dokumentovana široka cirkulacija virusa na afričkom kontinentu, sa učestalošću infekcije kod pasa od 27,1% i kod šakala od čak 43,75% (de Villiers i sar., 2023). Procenjeno vreme najskorijeg zajedničkog pretka namibijskih sojeva smešteno je oko 2011. godine.

CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije bila je identifikacija i molekularna karakterizacija parvovirusa i cirkovirusa detektovanih u populacijama divljih svinja i mesojeda na teritoriji Zapadnobačkog okruga. Planirano ispitivanje imalo je za cilj da utvrdi eventualno prisustvo ovih virusa u populacijama sve brojnijih vrsta divljači koje nastanjuju područja u neposrednoj blizini naseljenih mesta na pomenutoj teritoriji, što je od naročitog značaja u pogledu mogućnosti transmisije ovih patogena na populacije domaćih svinja, odnosno pasa i mačaka. Imajući u vidu diverzitet parvovirusa i cirkovirusa prisutnih u populacijama divljači, proučavanjem varijabilnih genskih segmenata ili celih genoma ovih virusa biće omogućena identifikacija cirkulišućih genotipova kao i utvrđivanje prisustva rekombinantnih sojeva virusa. Pored toga, cilj planiranih ispitivanja bio je i analiza sekvenci kompletnih genoma detektovanih cirkovirusa, odnosno PCV3 i CanineCV, s obzirom na to da o istim još uvek ne postoji dovoljno naučnih podataka. Takođe, ova studija imala je za cilj i uspostavljanje adekvatnih protokola za izvođenje konvencionalnog i real-time PCR koji bi se koristili u dijagnostici navedenih infekcija što bi predstavljalo osnovu za karakterizaciju detektovanih sojeva parvovirusa i cirkovirusa.

Da bi se ispunili ciljevi, definisani su sledeći zadaci, prema fazama izvođenja:

1. Prikupljanje uzoraka organa divljih svinja (limfnih čvorova, tonzila i slezine) i organa šakala i lisica (jetre, slezine, pluća, bubrega, srca, tankih creva i krvi) odstreljenih na teritoriji Zapadnobačkog okruga i njihova laboratorijska obrada radi izvođenja molekularnih metoda virusološke dijagnostike;
2. Otkrivanje prisustva nukleinske kiseline svinjskih parvovirusa u uzorcima poreklom od divljih svinja primenom metode real-time PCR uz upotrebu univerzalnih prajmera za konzervirani region genoma;
3. Otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina pojedinačnih svinjskih parvovirusa 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 (PPV1, PPV2, PPV3, PPV4, PPV5, PPV6 i PPV7) primenom PCR u pozitivnim uzorcima dobijenim primenom real-time PCR;
4. Sekvenciranje genoma detektovanih svinjskih parvovirusa u cilju analize gena koji kodiraju sintezu kapsida navedenih virusa primenom metode po Sangeru, upoređivanje dobijenih nukleotidnih sekvenci sa analognim sekvencama dostupnim u Banci gena i njihova filogenetska analiza;
5. Otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina svinjskih cirkovirusa 2 i 3 (PCV2 i PCV3) u uzorcima poreklom od divljih svinja primenom metode real-time PCR;
6. Sekvenciranje genoma detektovanih sojeva PCV2 u cilju analize varijabilnog segmenta gena koji kodira sintezu kapsida virusa primenom metode po Sangeru i filogenetska analiza dobijenih nukleotidnih sekvenci radi izvođenja genotipizacije virusa;
7. Sekvenciranje kompletnog genoma detektovanih sojeva PCV3 primenom metode po Sangeru, upoređivanje dobijenih nukleotidnih sekvenci sa analognim sekvencama dostupnim u Banci gena i njihova filogenetska analiza u cilju izvođenja genotipizacije virusa;

8. Otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina parvovirusa mesojeda (CPV2 i FPV) u uzorcima poreklom od šakala i lisica primenom metode real-time PCR;
9. Sekvenciranje genoma detektovanih sojeva parvovirusa mesojeda u cilju analize varijabilnog segmenta gena koji kodira sintezu kapsida virusa primenom metode po Sangeru i filogenetska analiza dobijenih nukleotidnih sekvenci u cilju genotipizacije virusa;
10. Otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina cirkovirusa pasa (CanineCV) i lisica (FoxCV) u uzorcima poreklom od šakala i lisica primenom metode real-time PCR;
11. Sekvenciranje kompletnog genoma sojeva cirkovirusa detektovanih kod divljih mesojeda u cilju njihove analize primenom metode po Sangeru, upoređivanje dobijenih nukleotidnih sekvenci sa analognim sekvencama dostupnim u Banci gena i njihova filogenetska analiza;
12. Analiza prisustva genetskih rekombinacija u dobijenim nukleotidnim sekvencama parvovirusa i cirkovirusa divljih svinja i mesojeda primenom bioinformatičkih metoda.

MATERIJAL I METODE

1. Prikupljanje i obrada uzoraka organa divljih svinja i mesojeda

Uzorci limfnih čvorova, tonzila i slezine divljih svinja prikupljani su od odstreljenih životinja dostavljenih u VSI "Sombor" u sklopu monitoringa afričke i klasične kuge svinja u 2021. i 2022. godini. Uzorci krvi, parenhimatoznih organa (jetre, slezine, pluća i bubrega), srca i tankih creva prikupljani su od odstreljenih lisica i šakala dostavljenih u VSI "Sombor" u sklopu monitoringa oralne vakcinacije lisica i drugih divljih mesojeda protiv besnila u 2022. godini. Prikupljeno je ukupno 90 uzoraka poreklom od divljih svinja, odnosno 98 od divljih mesojeda, od čega 45 zlatnih šakala i 53 crvene lisice. Uzorkovanje materijala je izvršeno tokom patoanatomskog pregleda pri čemu kod ispitivanih jedinki nisu uočene lezije koje ukazuju na akutno sistemsko oboljenje. Uzorkovanje je obuhvatilo lovišta na teritoriji Zapadnobačkog okruga, kao i pojedina lovišta u opštinama susednih okruga koje se neposredno graniče sa ispitivanim područjem. Životinje obuhvaćene ovim ispitivanjem poticale su iz sledećih lovišta: Kruščić, Sivac, Kula, Odžaci, Sonta, Kozara, Bačka Topola, Čonoplja, Stara Moravica, Telečka, Lalinske Livade, Vrbas, Pačir, Panonija, Kolut, Bački Monoštor, Deronje, Zapadna Bačka, Bezdan i Apatin. Uzorkovani materijal poreklom od divljih mesojeda, odnosno svinja obrađen je unutar PCR kabineta (Biobase, Kina). Za svaku životinju formiran je jedan zbirni homogenat tkiva koji je predstavljao jedinični uzorak za molekularna ispitivanja. Homogenizacija uzoraka tkiva radi izvođenja ekstrakcije nukleinskih kiselina sprovedena je na sledeći način: u plastične tubice (Eppendorf, Nemačka) dodavane su staklene kuglice do zapremine od 200 µl, nakon čega je dodavano 600 µl fosfatnog pufera (PBS) i približno 20 mg uzorkovanog materijala. Uzorci su homogenizovani u tkivnom homogenizatoru TissueLyser (Qiagen, Nemačka) na 30 Hz tokom 3 minuta, a potom je homogenat centrifugiran na 1500 × g tokom 2 minuta. Ekstrakcija nukleinskih kiselina vršena je prema uputstvu proizvođača kita za ekstrakciju (MagFast DNA/RNA extraction kit, ID VET, Francuska) u uređaju za automatsku ekstrakciju IDEAL32 (ID VET, Francuska). Nakon završetka ekstrakcije, u posebnom PCR kabinetu (Biosan, Latvija) dobijeni DNK ekstrakti dodavani su u obeležene mikrotitracione ploče i odlagani do momenta ispitivanja. Ekstrahovane nukleinske kiseline čuvane su tokom perioda monitoringa i prikupljanja uzoraka do momenta prvih trijažnih ispitivanja u VSI "Sombor" u zamrzivaču Arctiko (Danska) na temperaturi od −80 °C. U svim primenjenim molekularnim metodama korišćene su odgovarajuće pozitivne kontrole: DNK ekstrakt PPV1 soja Teen (American Bioresearch, SAD), DNK ekstrakt PCV2 soja 1010-Stoon, DNK ekstrakti PPV2–PPV7, PCV3 i CanineCV (interne kontrole Laboratorije za virusologiju Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu), DNK ekstrakt vakcinalnog soja CPV2 (vakcina Canigen DH(A2)PpiL, Virbac, Francuska).

2. Otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina parvovirusa i cirkovirusa u uzorcima poreklom od divljih svinja i mesojeda primenom metoda real-time PCR

Ispitivanje uzoraka poreklom od divljih svinja i mesojeda na prisustvo nukleinskih kiselina parvovirusa i cirkovirusa vršeno je primenom real-time PCR metoda. U cilju pripreme reakcione smeše korišćen je DNK mastermiks Luna Universal Probe qPCR Mastermix (NEB, SAD), voda za PCR (Thermo Scientific, SAD) i specifični parovi prajmera sa probama (Metabion International AG, Nemačka). Prajmeri i probe korišćeni su u određenim radnim koncentracijama prema uputstvu proizvođača mastermiksa, i to za prajmere 0,4 μM, odnosno 0,2 μM za probu. Za kontrolu uspešnosti ekstrakcije korišćena je endogena interna kontrola gena za β-aktin sa sledećim setom prajmera i probe: 5'-CTC GAT CAT GAA GTG CGA CGT-3' i 5'-GTG ATC TCC TTC TGC ATC CTG TC-3', sa fluorescentno obeleženom probom HEX-ATC AGG AAG GAC CTC TAC GCC AAC ACG G-BHQ1 (Duvigneau i sar., 2005). Za potrebe izvođenja real-time PCR metoda korišćeni su AriaMx Real-time PCR aparati proizvođača Agilent (SAD). Termalni protokol za detekciju svih virusa izuzev PCV2 opisan je od strane proizvođača mastermiksa: 95 °C tokom 1 minut, a zatim 45 ciklusa na 95 °C tokom 15 sekundi i 60 °C tokom 30 sekundi.

Za otkrivanje prisustva svinjskih parvovirusa primenjen je univerzalni dijagnostički panel real-time PCR testova, koji obuhvata parove prajmera i probe specifične za svaku od vrsta PPV1–PPV7, pri čemu je svaki par usmeren na konzervirani region genoma odgovarajuće vrste. Na taj način obezbeđena je sveobuhvatna (univerzalna) pokrivenost svih sedam vrsta svinjskih parvovirusa u okviru jedinstvenog dijagnostičkog panela. Sve analize za PPV1-PPV6 su izvedene prema metodologiji Milek i sar. (2019), u vidu tri duplex real-time PCR testa uz upotrebu prethodno publikovanih prajmera i proba, pri čemu su fluorescentne oznake proba prilagođene raspoloživim kanalima detekcije. Detekcija PPV1 vršena je primenom prajmera 5'-CAG AAT CAG CAA CCT CAC CA-3' i 5'-GCT GCT GGT GTG TGT ATG GAA G-3', uz TaqMan probu 5′-FAM-TGC AAG CTT AAT GGT CGC ACT AGA CA-3′-BHQ, pri čemu je ciljni region VP2 gen PPV1 (Opriessnig i sar., 2011). Detekcija PPV2 sprovedena je upotrebom prajmera 5'-TAC TGA GCC CTA AGA CTG ACT ACA AGC-3' i 5'-GTT TGT CTC GTT GTT CGT CTG ATG-3', uz TaqMan probu 5′-CY5-AAC TGC TAC ATG AAC CAC TTT ACC CCC STC-3′-BHQ, pri čemu je ciljni region VP2 gen PPV2 (Xiao i sar., 2013a). Za dokazivanje PPV3 korišćeni su prajmeri 5'-CAY GAY GAA CGG TAC GAT GAA AT-3' i 5'-GCG GTA AAA CCT GTG AWA WTT GAA C-3', uz TaqMan probu 5′-CY5-TAG GTT GAT GAA TAA GGA GAT AGA GAG GGC GG-3′-BHQ, pri čemu je ciljni region VP1 gen PPV3 (Xiao i sar., 2012). Detekcija PPV4 realizovana je primenom prajmera 5'-GCA TTG GTG TGT GTC TGT GTC C-3' i 5'-GTG GCA CAT TTG TAC ATG GGA G-3', uz TaqMan probu 5′-FAM-CTC CGC GGG ATG TGC TTA CAA TTT TCA-3′-BHQ, pri čemu je ciljni region NS1 gen PPV4 (Xiao i sar., 2013b). Detekcija PPV5 sprovedena je upotrebom istih prajmera 5'-GCA TTG GTG TGT GTC TGT GTC C-3' i 5'-GTG GCA CAT TTG TAC ATG GGA G-3', uz TaqMan probu 5′-CY5-ACT TTG GTG TTG AGG GAC TTA GCT TTT TTT GTA C-3′-BHQ, pri čemu je ciljni region NS1 gen PPV5 (Xiao i sar., 2013b). Za dokazivanje PPV6 korišćeni su prajmeri 5'-GGC TTC ATA ATC CCT CCA AAA CCT-3' i 5'-GCT CAT CTT CCT CTT GTT TCT CCT G-3', uz TaqMan probu 5′-FAM-CCT CCT CCT CCT CCC TCT CCA ATT CCT-3′-BHQ, pri čemu je ciljni region VP2 gen PPV6 (Cui i sar., 2017a). Detekcija PPV7 vršena je primenom prajmera 5'-AGC AGA GAC AAA CAC AGA CG-3' i 5'-CCA GTT TGC ATT GTT CCC ATC-3', uz TaqMan probu 5'-FAM-CAG GCA GTG GTA GTG AAG GAT CCC-3'-BHQ, pri čemu je ciljni region NS1 gen PPV7 (Palinski i sar., 2016). Primenjeni real-time PCR testovi i konvencionalni multiplex PCR (Kim i sar., 2021) zasnovani su na različitim parovima prajmera i različitim ciljnim sekvencama u okviru

genoma ispitivanih vrsta parvovirusa, zbog čega rezultati konvencionalnog PCR-a predstavljaju metodološki nezavisnu potvrdu nalaza dobijenih real-time PCR metodom.

Analiza prisustva PCV2 u ispitivanim uzorcima vršena je primenom Porcine Circovirus 2 kita (PrimerDesign, Velika Britanija) u kojem su obezbeđeni specifični prajmeri i TaqMan proba. Tokom navedenog ispitivanja korišćen je termalni protokol naveden u uputstvu proizvođača: 95 °C tokom 2 minuta, a zatim 95 °C tokom 10 sekundi i 60 °C tokom 60 sekundi (50 ciklusa).

Za utvrđivanje prisustva genoma PCV3 (fragmenta Cap gena) u ispitivanim uzorcima korišćen je set prajmera 5′-CGC ATA AGG GTC GTC TTG GA-3′ i 5′-CMG CTC AGC AAA CAA AAA CTA TGT TC-3′, kao i proba 5′-CY5-TCC AGG CGC CGT CTA GAT CTA TGG C-BHQ1-3′ (Yuan i sar., 2020).

Prisustvo parvovirusa mesojeda u ispitivanim uzorcima utvrđivano je primenom specifičnih prajmera i probe za Cap gen 5′-AAA CAG GAA TTA ACT ATA CTA ATA TAT TTA-3′ i 5′-AAA TTT GAC CAT TTG GAT AAA CT-3′ kao i probe 5′-FAM-TGG TCC TTT AAC TGC ATT AAA TAA TGT ACC-BHQ1-3′ (Decaro i sar., 2005).

Otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina cirkovirusa pasa (CanineCV) i lisica (CanineCV genotip 5, FoxCV) u uzorcima poreklom od šakala i lisica primenom metode real-time PCR vršeno je uz upotrebu specifičnih prajmera i proba i to: 5’-CTT GCG AGA GCT GCT CCT TAT AT-3’ i 5’-CTC CAC TTC CGT CTT CCA GTT C-3’ sa probom 5′-FAM-TCC GGA GAT GAC CAC GCC CC-BHQ1-3’ za detekciju Rep gena CanineCV (Li i sar., 2013), odnosno 5′-TCC GAG ATA GCC GGC GTG GTA-3′ i 5′-CCC GGC CAC AGA TCA AGT ACT TA-3′ uz probu 5′-FAM-ATC CAA CTC CGG AGG AGG AGG A-BHQ1-3′ za utvrđivanje prisustva Rep gena FoxCV (Bexton i sar., 2015).

3. Otkrivanje prisustva pojedinačnih svinjskih parvovirusa (PPV1–PPV7) primenom konvencionalnog multiplex PCR-a u uzorcima pozitivnim u real-time PCR

Konvencionalni multiplex PCR (Kim i sar., 2021) primenjen je na uzorcima koji su prethodno identifikovani kao PPV-pozitivni real-time PCR panelom. Navedeni postupak sproveden je kao metoda nezavisne potvrde real-time PCR nalaza, budući da obuhvata prajmere specifične za sve vrste PPV1–PPV7 koji se vezuju za različita mesta u okviru ciljnih gena ili cilja segmente genoma različite od onih obuhvaćenih primenjenim real-time PCR testovima, uz vizuelizaciju produkata očekivane dužine za svaku vrstu. Za pripremu PCR reakcione smeše korišćeni su DreamTaq Master Mix (Thermo Scientific, SAD), voda za PCR (Thermo Scientific, SAD) i prajmeri proizvođača Metabion International AG (Nemačka) u finalnoj koncentraciji od 0,5 μM. Termalni protokoli izvođeni su na aparatu Techne Thermal Cycler Prime sa gradijentom (Cole Parmer, Velika Britanija) u skladu sa objavljenim protokolima za svaki ciljni virus.

Za PPV1 (NS1, 163 bp) korišćeni su prajmeri 5′-AGT TAG AAT AGG ATG CGA GGA A-3′ i 5′-TGC TTT GGT AAC CTT TCT TTT ACC-3′, za PPV2 (NS1, 286 bp) 5′-GCG TGC TCA AGC TGT TAC C-3′ i 5′-CTC ACT GCG AGA TGA AGG-3′, za PPV3 (VP, 498 bp) 5′-GCT GAT AGG TTG ATG AAT TAA GGA G-3′ i 5′-CCG CAT ACC CAT AAC AGG-3′, za PPV4 (ORF3, 592 bp) 5′-CTG AGA CTG AAT TCA TCC CTG-3′ i 5′-ATC AGA ATC ATG TAT GGT CTG C-3′, za PPV5 (VP, 945 bp) 5′-AAC CGA GTT AAG AAC TTT ACC G-3′ i 5′-ACC CAA GTC AGG AGT TCG-3′, za

PPV6 (NS1, 396 bp) 5′-GTG ATA ATG ATG TGA CTA CGG AG-3′ i 5′-CAG CAG TAT GTG CAA TAG CA-3′, kao i za PPV7 (NS1, 802 bp) 5′-AGG AAA TGG AAC ATC CAG G-3′ i 5′-TTA TCT TTT CGT GGC GTC C-3′ (Kim i sar., 2021).

Nakon izvođenja PCR metoda sprovedena je horizontalna elektroforeza u 2% agaroznom gelu radi vizuelizacije i analize dobijenih PCR produkata. Za elektroforezu PCR produkata korišćena su dva sistema: Mupid-exU (Optima, Japan) sa transiluminatorom BandPeeper LED (MaestroGen, Tajvan) i E-gel Power Snap System (Thermo Scientific, SAD).

Prevalencija svinjskih parvovirusa, kao i struktura pojedinačnih i mešovitih infekcija, određene su na osnovu rezultata real-time PCR metode, dok je konvencionalni multiplex PCR primenjen kao nezavisna metoda potvrde prisustva pojedinačnih vrsta.

4. Sekvenciranje i filogenetska analiza gena koji kodiraju sintezu kapsida detektovanih svinjskih parvovirusa

Nakon detekcije uzoraka pozitivnih na prisustvo svinjskih parvovirusa isti su bili pripremljeni za sekvenciranje metodom po Sangeru kako bi se izvršile analize kompletnih gena koji kodiraju sintezu kapsida navedenih virusa. U pomenutu svrhu korišćen je niz prethodno opisanih konvencionalnih PCR protokola uz upotrebu različitih parova prajmera specifičnih za umnožavanje segmenata VP1 i VP2 gena navedenih virusa kako bi se dobili adekvatni PCR produkti. Dobijeni umnoženi segmenti gena predstavljali su fragmente VP1 i VP2 sekvenci koji se preklapaju i koji su nakon sekvenciranja bili sastavljeni u celine primenom bioinformatičkog softvera MEGA 11 kako bi se dobile kompletne nukleotidne sekvence traženih gena. Osim navedenih fragmenata gena kapsida, dodatno je izvršeno i umnožavanje nestrukturnog gena NS1 PPV7 u cilju kompletiranja celog genoma detektovanih sojeva navedenog virusa.

U cilju umnožavanja kompletnih VP1 i VP2 gena PPV2 korišćeni su specifični prajmeri za segmente dužine 1355bp (5'-GGA CGT CGA GGA GGA ACC AA-3' i 5'-CTT CCT CGG CAT CTG CAA GC-3'), 1174bp (5'-AAC ACG ATG AGC GGT ACG AC-3' i 5'-ATG ACG GAG GTT CAA CGT GC-3') i 1379bp (5'-CGT ACA TCA GAC GAA CAA CG-3' i 5'-TAT ACA CGA TGA GCG CGT CC-3') (Cadar i sar., 2013a).

Umnožavanje kompletnih sekvenci VP1 i VP2 gena PPV3 vršeno je upotrebom prajmera specifičnih za segmente od 995bp (5'-TTG GAG GTA CCG GCA GA-3' i 5'TCA TCG TAC CGT TCA TCG-3'), 1115bp (5'-GTG AAC CAG ACC TTG AAC G-3' i 5'-GAG ACC ATG TAT CAC CGG A-3') i 1268bp (5'-TGG CTA TCT TAC TCG AGG AC-3' i 5'-ATG AGC TGG CCT TGT AGA C-3') (Cadar i sar., 2011).

Pored toga, korišćeni su sledeći parovi prajmera specifični za celokupne VP1 i VP2 gene PPV6 sa navedenim segmentima: 759bp (5'-CTCTCAGTCAATCCGACGTT-3' i 5'ATT CTG ACG CCA ATT ATC AGC-3'), 807bp (5'-CAG ATC CCC TAT ATG CTA GCC-3' i 5'-ATC TCG CTG AGC ATT ATC CAA-3'), 1107bp (5'-TCT TAA ACA TGG AGA CTG GC-3' i 5'-CCT CGA ATA AGA GTG GCA TC-3'), 916bp (5'-CAG TCA GCC ACC ATT GCT A-3' i 5'-CTT TTG GAA TGG TAA CAT CCC C-3') i 602bp (5'-AGG TTA GCC TAT CAA CGT C-3' i 5'-TCA ACC AGA ATG CCT GAC AC-3') (Cui i sar., 2017a).

Kompletne sekvence NS1 i VP gena bile su umnožene primenom prajmera za segmente dužina: 977 bp (5'-GTG GTG GGG CTG GCT GAG CTG-3' i 5'-GCG TTG TCT TGC ATG GAC CAG-3'), 1013bp (5'-ACA CAA GCC GGG ATT CCA GCA -3' i 5'-CCA CGA GCA CTC

CAT CCC CTC-3'), 1066bp (5'-CGC AAG ACT TGG CTT CAG CAC-3' i 5'-GGA TGC TGT CCG GGT TGG TGA-3') i 1032bp (5'-AGC TGG AGC AGA CTT ACA CTC-3' i 5'-GCG GGT TAA TAA CAG GAA GGG-3') (Xing i sar., 2018).

Odabrani PCR produkti poslati su na sekvenciranje u Macrogen Europe Laboratoriju u Amsterdamu (Holandija). Sekvencirani su fragmenti gena od ukupno 27 uzoraka pozitivnih na prisustvo prethodno navedenih parvovirusa svinja. Poravnanje F (forward) i R (reverse) sekvenci dobijenih za navedene regione genoma izvršeno je u programu MEGA 11 (Tamura i sar., 2021), nakon čega je identitet sekvenci proveravan BLAST analizom (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Za svaki genski segment formirane su konsenzus sekvence. Po završetku analiza pojedinačnih fragmenata, sekvence su objedinjene u MEGA 11 i one koje su ispunile kriterijume kvaliteta deponovane su u repozitorijum Banke gena (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Dobijene spojene sekvence poravnate su sa referentnim sekvencama preuzetim iz Banke gena, a zatim je sprovedena njihova filogenetska analiza u softveru MEGA 11. Model supstitucije je odabran nakon testiranja u okviru programa (MEGA 11 "Find Best DNA/Protein Models"). U filogenetskoj analizi kompletnog kapsidnog gena PPV2 korišćeno je ukupno 50 nukleotidnih sekvenci od kojih je 42 preuzeto iz Banke gena. Analiza je izvršena primenom Neighbor-Joining metode sa Tamura–Nei (TN93) + G modelom supstitucije i pouzdanošću od 1.000 replikata. Filogenetska analiza kompletnog kapsidnog gena PPV6 izvršena je poređenjem ukupno 39 nukleotidnih sekvenci pri čemu je ukupno 33 preuzeto iz Banke gena. Navedena analiza izvršena je primenom Neighbor-Joining metode sa Kimura 2-Parameter (K2) + G modelom supstitucije i pouzdanošću od 1.000 replikata. Analiza nukleotidnih sekvenci kompletnog genoma PPV7 izvršena je poređenjem sa ukupno 32 sekvence iz Banke gena primenom Neighbor-Joining metode sa Tamura–Nei (TN93) + G modelom supstitucije i pouzdanošću od 1.000 replikata. Uz filogenetsku analizu dobijenih sekvenci, izračunate su i p-distance (udeo nukleotidnih pozicija po kojima se dve sekvence razlikuju) unutar ispitivanih skupova sekvenci PPV2, PPV6 i PPV7 primenom softvera MEGA 11. Vrednosti p-distanci prikazane su na četiri decimale, a odgovarajuće vrednosti nukleotidne sličnosti izražene su u procentima. Za analizu sekvenci svinjskih parvovirusa primenjena je Neighbor-Joining metoda, s obzirom na visok stepen međusobne srodnosti analiziranih sekvenci i niske vrednosti genetičke divergencije unutar skupova, u kojima navedene metode daju stabla uporediva sa Maximum Likelihood metodom. Za skupove sekvenci sa izraženijom divergencijom (PCV2, PCV3, CPV2, FPV i cirkovirusi mesojeda) primenjena je Maximum Likelihood metoda.

5. Sekvenciranje i filogenetska analiza varijabilnog segmenta gena koji kodira sintezu kapsida detektovanih sojeva PCV2

Uzorci DNK u kojima je primenom real-time PCR utvrđeno prisustvo genoma PCV2 bili su pripremljeni za sekvenciranje metodom po Sangeru primenom konvencionalnih PCR protokola. Za dobijanje sekvenci delova Cap gena detektovanih sojeva PCV2 značajnih za genotipizaciju virusa, primenjeni su prajmeri kojima se umnožavaju fragmenti DNK koji se preklapaju dužine 353bp (5'-ACA TGG TTA CAC GGA TAT TG-3' i 5'-GRT TAA GGT TGA ATT CTG GC-3') i 293bp (5'-TGG CGG GMS GAG TAG TTT A-3' i 5'-CGC ACC TTC GGA TAT ACT GT-3') (Weissenbacher-Lang i sar., 2020).

Odabrani uzorci pozitivnih PCR produkata najboljeg kvaliteta poslati su na sekvenciranje u Macrogen Europe Laboratory u Amsterdamu (Holandija). Dobijeno je ukupno četiri sekvence PCV2 visokog kvaliteta. Poravnanje F i R sekvenci pomenutih regiona genoma izvršeno je u programu MEGA 11 (Tamura i sar., 2021). Dobijene nukleotidne sekvence analizirane su u oba pravca, a zatim su primenom MEGA 11 formirane konsenzus sekvence. Nakon formiranja konsenzus sekvenci delova gena koji se preklapaju, iste su sastavljene u cilju dobijanja segmenata od značaja za izvođenje genotipizacije PCV2. Primenom BLAST programa (*eng*. Basic Local Alignment Search Tool), sekvence su upoređene sa analognim sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Filogenetska analiza dobijenih nukleotidnih sekvenci obavljena je u MEGA 11 primenom Maximum Likelihood metode i Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) + G modelom supstitucije i pouzdanošću od 1.000 replikata (*eng.* bootstrap). Model supstitucije je odabran nakon testiranja u okviru programa (MEGA 11 "Find Best DNA/Protein Models"). U filogenetskoj analizi korišćeno je ukupno 89 nukleotidnih sekvenci od kojih je 85 preuzeto iz Banke gena.

6. Sekvenciranje i filogenetska analiza kompletnog genoma detektovanih sojeva PCV3

U cilju analize detektovanih sojeva PCV3 korišćeni su prajmeri i protokoli čijom se primenom umnožavaju tri preklapajuća segmenta celog genoma navedenog virusa i to: 5'-ATT ATG GAT GCT CCT CAT CGT G-3' i 5'-CAT CTT CTC CGC AAC TTC AGT C-3' (553bp); 5'-AGT GCT CCC CAT TGA ACG-3' i 5'-CGA CCA AAT CCG GGT AAG C-3' (1030bp); 5'-CCC ACA TGC GAG GGC GTT TAC C-3' i 5'-CGA GGC CGC TTC ATC ATC CAC T-3' (895bp) (Wen i sar., 2018; Fux i sar., 2018).

Odabrani uzorci pozitivnih PCR produkata najboljeg kvaliteta poslati su na sekvenciranje u Macrogen Europe Laboratory u Amsterdamu (Holandija). Dobijeno je ukupno pet sekvenci PCV3 visokog kvaliteta. Poravnanje F i R sekvenci fragmenata genoma izvršeno je u programu MEGA 11 (Tamura i sar., 2021). Dobijene nukleotidne sekvence analizirane su u oba pravca, a zatim su primenom MEGA 11 formirane konsenzus sekvence. Nakon formiranja konsenzus sekvenci delova genoma koji se preklapaju, iste su sastavljene u cilju dobijanja kompletnog genoma PCV3. Primenom BLAST programa (*eng*. Basic Local Alignment Search Tool), sekvence su upoređene sa analognim sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Radi izvođenja filogenetske analize i komparativnog tumačenja, analiziran je proširen skup od ukupno 42 sekvence, uključujući 37 referentnih genoma PCV3 preuzetih iz Banke gena čime je obuhvaćena globalna raznovrsnost ovog virusa.

Genotipizacija PCV3 u ovom radu izvršena je u skladu sa kriterijumima koje su predložili Franzo i sar. (2020), pri čemu je pripadnost genotipu (PCV3-a i provizorni PCV3-b) zasnovana na usklađenosti filogenetskog grupisanja (uz visoku *bootstrap* podršku čvorova) i pragova genske divergencije izraženih p-distancama (maksimalna vrednost unutar genotipa ≤3% za kompletan genom i ≤6% za Cap fragment – ORF2), uz potvrdu podudarnosti stabala na osnovu analiza kompletnog genoma i ORF2. Sekvence kompletnog genoma PCV3 su poravnate i analizirane dok je ORF2 segment analiziran zasebno. Za navedene grupacije podataka (kompletan genom i ORF2) izračunate su i p-distance

(postotak pozicija nukleotida na osnovu kojih se dve sekvence razlikuju) kao potpora filogenetskoj analizi. Pre izvođenja filogenetske analize, modeli supstitucije odabrani su nakon testiranja u okviru programa (MEGA 11 "Find Best DNA/Protein Models"). Filogenetsko stablo na osnovu sekvenci celog genoma PCV3 formirano je primenom Maximum Likelihood metode i Tamura–Nei+G modela supstitucije uz pouzdanost od 1.000 replikata (*eng.* bootstrap), dok je za ORF2 segment primenjen HKY+G model uz 1.000 bootstrap replikata.

7. Sekvenciranje i filogenetska analiza varijabilnog segmenta gena koji kodira sintezu kapsida detektovanih sojeva parvovirusa mesojeda

Ekstrakti DNK koji odgovaraju uzorcima pozitivnim na prisustvo parvovirusa mesojeda detektovanim primenom real-time PCR bili su pripremljeni za sekvenciranje primenom tri para prajmera specifičnih za segmente dužine 681bp (5'-GAA GAG TGG TTG TAA ATA ATT-3' i 5'-CCT ATA TAA CCA AAG TTA GTA C-3') 611bp (5'-CAG GTG ATG AAT TTG CTA CA-3' i 5'-CAT TTG GAT AAA CTG GTG GT-3') i 555bp (5'-CAG GAA GAT ATC CAG AAG GA-3' i 5'-GGT GCT AGT TGA TAT GTA ATA AAC A-3'), što je predstavljalo osnovu za genotipizaciju detektovanih sojeva virusa (Buonavoglia i sar., 2001).

Odabrani uzorci pozitivnih PCR produkata poslati su na sekvenciranje u Macrogen Europe Laboratory u Amsterdamu (Holandija). Dobijeno je ukupno 12 sekvenci CPV2 (7) i FPV (5) visokog kvaliteta. Poravnanje F i R sekvenci navedenih regione genoma izvršeno je u programu MEGA 11 (Tamura i sar., 2021). Dobijene nukleotidne sekvence analizirane su u oba pravca, a zatim su primenom MEGA 11 formirane konsenzus sekvence. Nakon formiranja konsenzus sekvenci delova genoma koji se preklapaju, iste su sastavljene u cilju dobijanja dela kapsidnog gena parvovirusa mesojeda neophodnog za genotipizaciju virusa. Primenom BLAST programa (*eng*. Basic Local Alignment Search Tool), sekvence su upoređene sa analognim sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Uz filogenetsku analizu dobijenih sekvenci, izračunate su i p-distance unutar ispitivanih grupa sekvenci CPV2 i FPV. Pre izvođenja filogenetske analize, modeli supstitucije odabrani su nakon testiranja u okviru programa (MEGA 11 "Find Best DNA/Protein Models"). Filogenetsko stablo CPV2 formirano je na osnovu 64 nukleotidne sekvence varijabilnog regiona kapsidnog gena primenom Neighbor Joining metode i Tamura 3-parameter modela uz pouzdanost od 1.000 replikata. Radi izvođenja filogenetske analize sekvenci FPV analizirane su ukupno 43 sekvence primenom Maximum Likelihood metode i Tamura–Nei+G+I modela supstitucije uz pouzdanost od 1.000 replikata.

8. Sekvenciranje i filogenetska analiza kompletnog genoma sojeva cirkovirusa detektovanih kod divljih mesojeda

Priprema uzoraka DNK u kojima je primenom real-time PCR prethodno utvrđeno prisustvo CanineCV i FoxCV za sekvenciranje metodom po Sangeru kako bi se dobili podaci o nukleotidnim sekvencama kompletnog genoma detektovanih virusa vršena je implementacijom dva PCR protokola uz upotrebu specifičnih prajmera kojima su se umnožavali fragmenti dužine 920bp (5'-GCG CCG GAC GCT AAG TAC TT-3' i 5'-AAG GGG

GGT GAA CAG GTA AAC-3'), odnosno 1024bp (5'-TTT ACC TGT TCA CCC CCC TTC GA-3' i 5'-GTG CTG TGT CTG TGA CGA G-3') (Piewbang i sar., 2018).

Odabrani uzorci pozitivnih PCR produkata poslati su na uslužno sekvenciranje u Macrogen Europe Laboratory u Amsterdamu (Holandija). Dobijeno je ukupno 9 sekvenci CanineCV visokog kvaliteta. Poravnanje F i R sekvenci delova virusnog genoma izvršeno je u programu MEGA 11 (Tamura i sar., 2021). Nukleotidne sekvence su analizirane u oba pravca, a zatim su primenom MEGA 11 formirane konsenzus sekvence. Nakon formiranja konsenzus sekvenci fragmenata genoma koji se preklapaju, isti su sastavljeni u cilju dobijanja celog genoma cirkovirusa pasa. Primenom BLAST programa (eng. Basic Local Alignment Search Tool), sekvence su upoređene sa analognim sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Dobijene sekvence su po svojoj dužini i kvalitetu predstavljale dovoljnu osnovu za izvođenje filogenetske analize, odnosno genotipizacije. Genotipizacija je izvedena prema shemi koju su predložili Niu i sar. (2020) za genotipove 1–4, a dopunili Urbani i sar. (2021) izdvajanjem genotipa 5 i Beikpour i sar. (2022) izdvajanjem genotipa 6. Navedeni autori genotipove definišu na osnovu filogenetskog grupisanja uz visoku bootstrap podršku čvorova, bez formalno utvrđenog praga genske divergencije, budući da se opsezi nukleotidne sličnosti unutar i između pojedinih genotipova delimično preklapaju. Vrednosti p-distanci su stoga u ovom radu prikazane kao dodatna potpora filogenetskom svrstavanju. Jedini formalno definisan prag jeste onaj za razgraničenje vrsta u okviru familije *Circoviridae*, koji iznosi 80% nukleotidne sličnosti na nivou kompletnog genoma. Uz filogenetsku analizu dobijenih sekvenci, izračunate su i p-distance između ispitivanih sekvenci međusobno kao i sa referentnim sekvencama iz Banke gena. Pre filogenetske analize, modeli supstitucije odabrani su nakon testiranja u okviru programa (MEGA 11 "Find Best DNA/Protein Models"). Filogenetsko stablo sa svim sekvencama CanineCV iz ove studije i 107 sekvenci predstavnika različitih genotipova navedenog virusa poreklom od divljih mesojeda i pasa formirano je primenom Maximum Likelihood metode i General Time Reversible (GTR)+G+I modela supstitucije nukleotida uz pouzdanost od 1.000 replikata. Pored toga, izvršena je i filogenetska analiza sojeva FoxCV (genotipa 5 CanineCV) primenom iste metode poređenjem sa 49 predstavnika navedenog genotipa iz Banke gena.

9. Analiza prisustva genskih rekombinacija u dobijenim nukleotidnim sekvencama parvovirusa i cirkovirusa divljih svinja i mesojeda

Analiza prisustva genskih rekombinacija u dobijenim nukleotidnim sekvencama parvovirusa i cirkovirusa divljih svinja i mesojeda sprovedena je u programu RDP5 (*eng.* Recombination Detection Program v5) (Martin i sar., 2020). Sekvence cirkularnih genoma cirkovirusa analizirane su u opciji za cirkularne molekule, dok su sekvence parvovirusa analizirane kao linearne. Mogući rekombinacioni signali ispitivani su primenom algoritama RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan i 3Seq, uz Bonferonijevu korekciju za multipla poređenja. Tokom analize bile su uključene opcije preciziranja položaja početne i završne tačke rekombinacije i provere usaglašenosti poravnanja. U završnoj interpretaciji kao verodostojni razmatrani su samo signali podržani od strane najmanje tri nezavisne metode uz $p < 0,001$. Svi takvi signali dodatno su provereni pregledom raspodele prekidnih (početnih i završnih) tačaka rekombinacije, grafičkih prikaza pojedinačnih algoritama,

filogenetskih stabala konstruisanih za regione unutar i izvan suspektnih rekombinantnih segmenata, kao i manuelnim pregledom poravnanja sekvenci. Ovaj pristup primenjen je na poravnate sekvence kompletnog kapsidnog gena PPV2 i PPV6, na kompletne genome PCV3, PPV7 i CanineCV, kao i na odgovarajuće skupove poravnatih sekvenci PCV2, CPV2 i FPV.

Prisustvo mogućih početnih i krajnjih tačaka rekombinacije u poravnatim sekvencama dodatno je ispitano primenom GARD algoritma (*eng.* Genetic Algorithm for Recombination Detection) u okviru platforme Datamonkey (Kosakovsky Pond i sar., 2006). U analizu su uključena ista poravnanja sekvenci koja su korišćena i za ispitivanje rekombinacije u programu RDP5. Optimalni broj i položaj pozicija početnih i završnih tačaka procenjivani su poređenjem modela bez rekombinacije i modela sa jednom ili više prekidnih tačaka, na osnovu visine vrednosti Δc-AIC, pri čemu je viša vrednost navedenog parametra u korelaciji sa većom verovatnoćom prisustva rekombinacije. Rezultati GARD analize korišćeni su kao dopunski pokazatelj mogućeg prisustva rekombinacionih prekidnih tačaka i tumačeni su zajedno sa rezultatima RDP5 analize.

REZULTATI

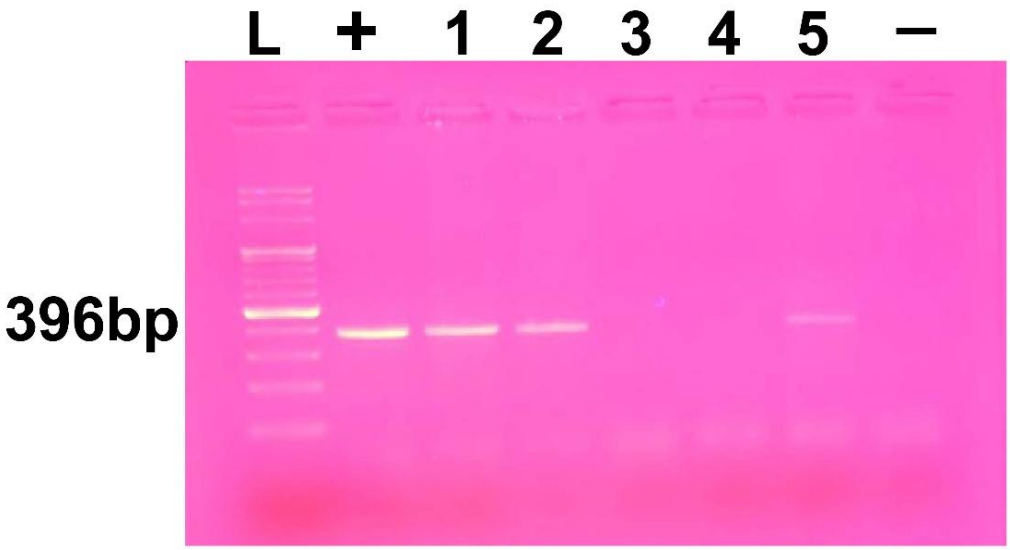
1. Otkrivanje prisustva nukleinske kiseline svinjskih parvovirusa u uzorcima poreklom od divljih svinja primenom metode real-time PCR

U ispitivanim uzorcima poreklom od 90 divljih svinja, real-time PCR panelom za PPV1–PPV7 prisustvo nukleinske kiseline svinjskih parvovirusa detektovano je u 55/90 (61,1%) uzoraka. Među PPV-pozitivnim uzorcima utvrđena je izrazita dominacija PPV2 (51/55; 92,7%) i visoka učestalost PPV7 (39/55; 70,9%), dok su PPV3 i PPV6 detektovani u 18/55 (32,7%) i 10/55 (18,2%) uzoraka. PPV1, PPV4 i PPV5 nisu detektovani (0/55; 0,0%).

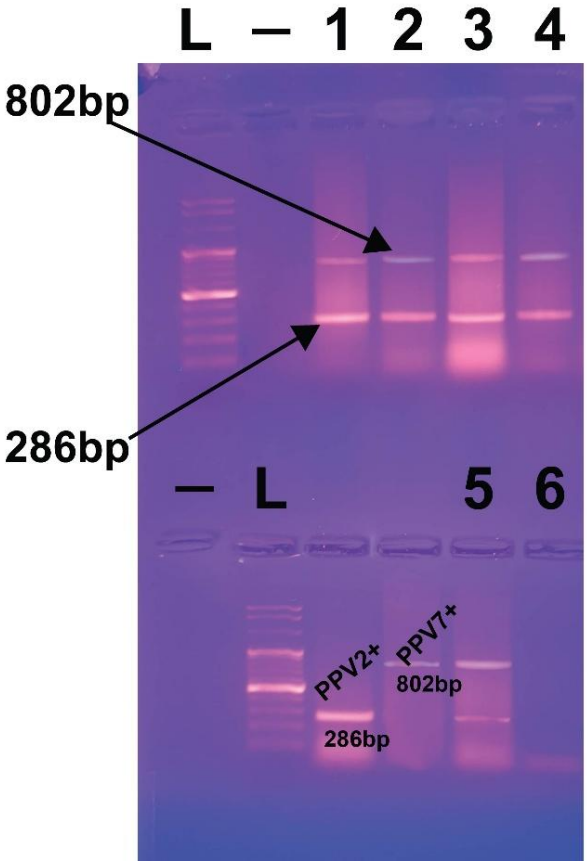
2. Otkrivanje prisustva pojedinačnih svinjskih parvovirusa (PPV1–PPV7) primenom konvencionalnog multiplex PCR-a u uzorcima pozitivnim u real-time PCR i struktura pojedinačnih i mešovitih infekcija

U svih 55 real-time PCR pozitivnih uzoraka prisustvo pojedinačnih vrsta parvovirusa dodatno je provereno primenom multiplex konvencionalnog PCR-a (Slika 8 i 9). Ovom metodom potvrđeno je prisustvo PPV2 u 47/51 (92,2%), PPV7 u 31/39 (79,5%), PPV3 u 13/18 (72,2%) i PPV6 u 6/10 (60,0%) uzoraka prethodno pozitivnih real-time PCR metodom, odnosno ukupno 97 od 118 pojedinačnih nalaza (82,2%). Stopa potvrde je u skladu sa manjom analitičkom osetljivošću konvencionalnog PCR-a i očekivano nižom koncentracijom virusne DNK u uzorcima. Zbog toga su struktura pojedinačnih i mešovitih infekcija i svi dalje navedeni odnosi prikazani na osnovu rezultata real-time PCR metode.

Pojedinačna infekcija jednim svinjskim parvovirusom utvrđena je u 13/55 (23,6%) uzoraka, i to PPV2 u 9/55 (16,4%), PPV7 u 2/55 (3,6%), a PPV3 i PPV6 u po jednom uzorku (1,8%). Mešovite infekcije sa dva ili više parvovirusa zabeležene su u 42/55 (76,4%) uzoraka. Najčešće je registrovano istovremeno prisustvo PPV2 i PPV7, u 37/55 (67,3%) uzoraka, zatim PPV2 i PPV3, u 17/55 (30,9%), i PPV2 i PPV6, u 9/55 (16,4%). Sve utvrđene mešovite infekcije obuhvatale su PPV2, dok su četiri uzorka u kojima PPV2 nije detektovan bila pozitivna samo na jednu vrstu parvovirusa.



Slika 8. Uzorci pozitivni na prisustvo DNK PPV6 (1,2,5); DNK marker (L); pozitivna kontrola(+); negativna kontrola (-); negativni uzorci (3, 4)

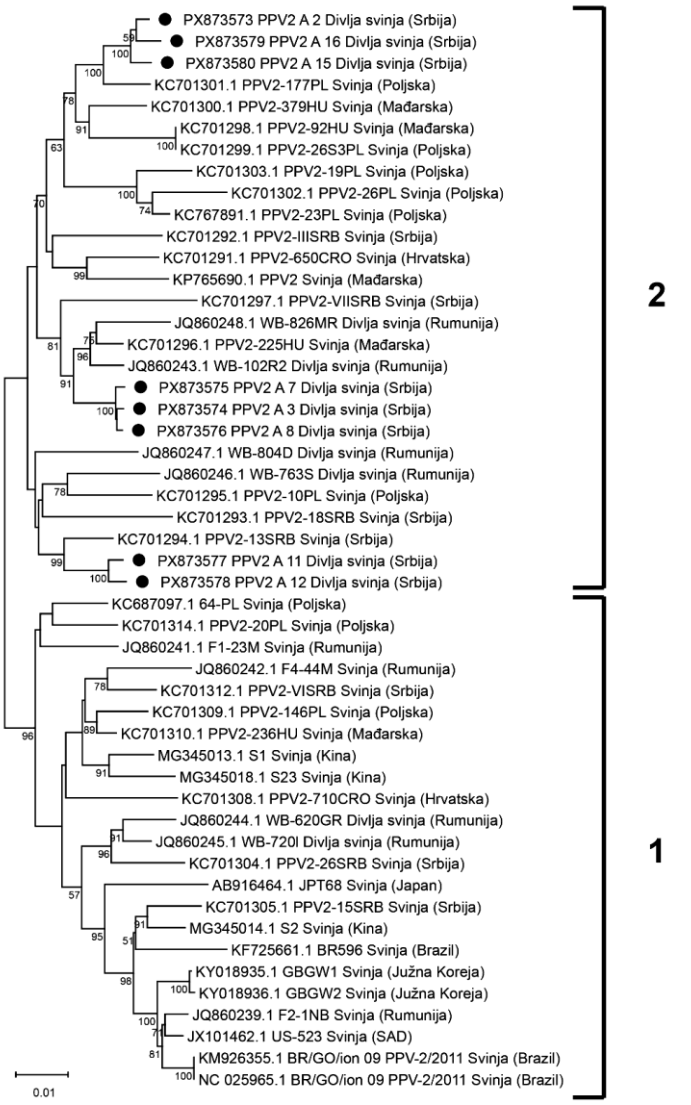


Slika 9. Uzorci pozitivni na prisustvo DNK PPV2 i PPV7(1-5); DNK marker (L); pozitivne kontrole (PPV2+ i PPV7+); negativna kontrola (-); negativan uzorak (6)

3. Analiza gena koji kodiraju sintezu kapsida svinjskih parvovirusa, upoređivanje dobijenih nukleotidnih sekvenci sa analognim sekvencama dostupnim u Banci gena i njihova filogenetska analiza

Sastavljeno je ukupno 23 sekvence poreklom od svakog uzorka svinjskih parvovirusa, od toga 8 sekvenci kompletnog kapsidnog gena PPV2, 6 sekvenci kompletnog kapsidnog gena PPV6 i 9 sekvenci kompletnog genoma PPV7. Sekvence PPV3 nisu ispunile kriterijume kvaliteta zbog nedovoljnog kvaliteta hromatograma i nemogućnosti formiranja pouzdanih konsenzus sekvenci, te nisu korišćene u daljim ispitivanjima. Sekvence parvovirusa svinja deponovane su u Banku gena pod sledećim pristupnim brojevima: PX873573-580 (PPV2, kompletan kapsidni gen), PX857790-795 (PPV6, kompletan kapsidni gen) i PX857796-804 (PPV7, kompletan genom).

Filogenetska analiza kompletnog kapsidnog gena PPV2, izvršena primenom Neighbor-Joining metode uz Tamura–Nei (TN93) + G model supstitucije i 1.000 bootstrap replikata, pokazala je jasno razdvajanje analiziranih sekvenci u dve glavne filogenetske grupe, označene kao 1 i 2 (Slika 10). Svi sojevi poreklom od divljih svinja iz Srbije grupisali su se isključivo unutar grupe 2, što ukazuje da se, u okviru analiziranog skupa sekvenci, uklapaju u evropski filogenetski ogranak PPV2. Istovremeno, ispitivane sekvence ne pripadaju jedinstvenom monofiletskom klasteru, već su bile raspoređene u više manjih potklastera unutar iste grupe, što ukazuje na izvesnu genetičku heterogenost sojeva PPV2 prisutnih u populaciji divljih svinja u Srbiji. Sekvence PX873573, PX873579 i PX873580 formirale su zaseban potklaster u bliskoj vezi sa sekvencom KC701301.1 iz Poljske, pri čemu su terminalni čvorovi podržani visokim bootstrap vrednostima, što ukazuje na njihovu blisku međusobnu srodnost. Drugi dobro definisan potklaster činile su sekvence PX873575, PX873574 i PX873576 koje su bile filogenetski najbliže sojevima iz divljih svinja u Rumuniji i soju iz domaće svinje u Mađarskoj, što ukazuje na njihovu pripadnost širem evropskom genetičkom fondu PPV2. Slično, sekvence PX873577 i PX873578 formirale su zaseban par sa visokom bootstrap podrškom i bile su najuže povezane sa sojem KC701294.1 iz domaće svinje poreklom iz Srbije, dok je širi ogranak uključivao i druge sekvence iz Srbije, kao i izolate iz Poljske i Rumunije. Dobijeni rezultati ukazuju na to da sojevi PPV2 detektovani kod divljih svinja u Srbiji pripadaju evropskoj filogenetskoj liniji, pri čemu pokazuju blisku srodnost sa prethodno opisanim sojevima iz domaćih i divljih svinja iz Srbije i susednih zemalja, ali bez formiranja posebne, geografski izdvojene linije.



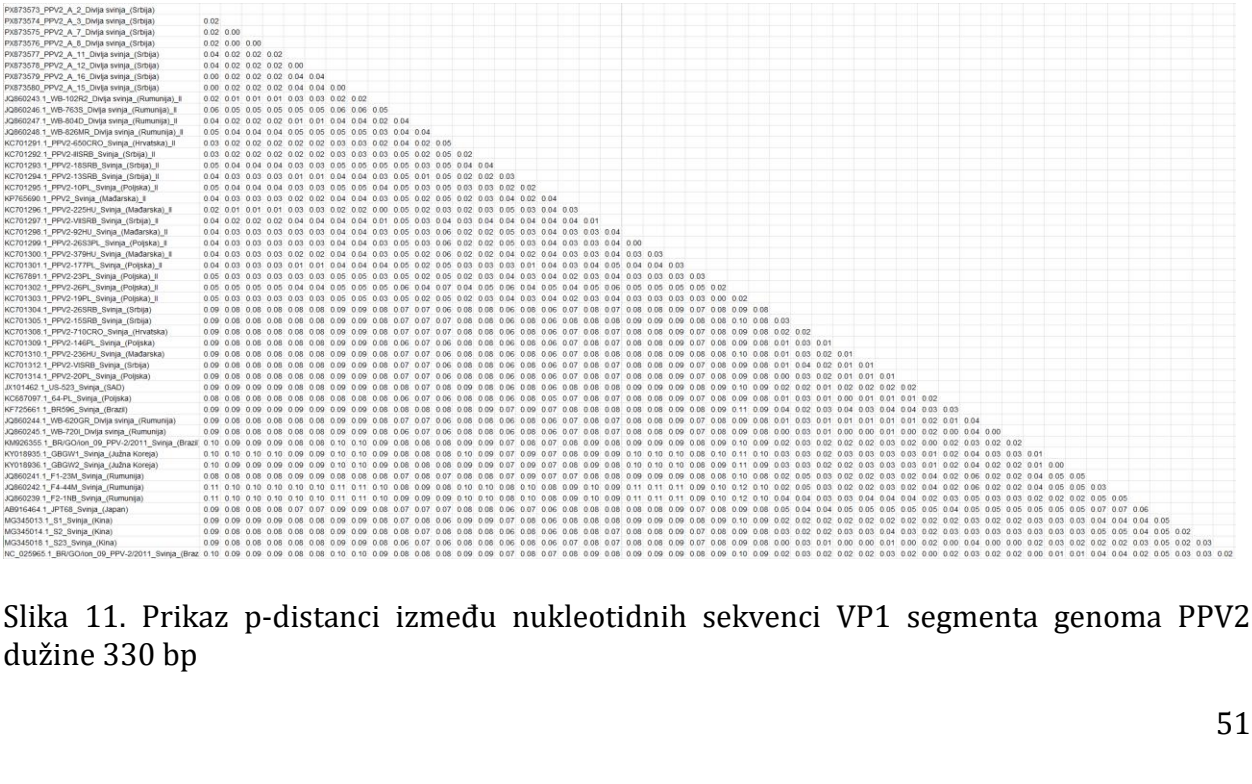
Slika 10. Filogenetsko stablo zasnovano na analizi kompletnog kapsidnog gena sojeva PPV2 iz Srbije (obeleženi crnim krugovima) i drugih sojeva predstavnika dve filogenetske grupe iz Banke gena. Analiza je izvedena u MEGA 11 primenom Neighbor-Joining metode sa Tamura–Nei (TN93) + G modelom supstitucije i pouzdanošću od 1.000 replikata (*eng*. bootstrap). Prikazane su samo bootstrap vrednosti ≥ 50.

Analiza divergentnosti sekvenci PPV2 zasnovana na kompletnom genu koji kodira kapsidni protein, uključujući VP1 i VP2 regione, pokazala je da su ispitivani sojevi iz divljih svinja međusobno srodni, sa vrednostima p-distanci u rasponu od 0,0022 do 0,0390, što odgovara nukleotidnoj sličnosti od 96,1 do 99,78%. U poređenju sa sekvencama svrstanim u grupu 2 izdvojenu na filogenetskom stablu, ispitivani sojevi pokazali su p-distance od 0,0161 do 0,0520 i sličnost od 94,8 do 98,39%, dok su u odnosu na sekvence iz grupe 1 utvrđene više vrednosti genetičke udaljenosti, u rasponu 0,0404 do 0,0687, uz nižu nukleotidnu sličnost od 93,13 do 95,96%. Na nivou cele grupe 2, vrednosti p-distanci

kretale su se od 0,0022 do 0,0578, uz sličnost od 94,22 do 99,78%, dok su između grupa 1 i 2 zabeležene vrednosti od 0,0374 do 0,0722, pri čemu je nukleotidna sličnost iznosila od 92,78 do 96,26%. Dobijeni nalazi ukazuju da ispitivani sojevi iz divljih svinja pripadaju genetičkom fondu grupe 2 i da su znatno bliži sekvencama unutar navedene grupe nego sekvencama iz grupe 1.

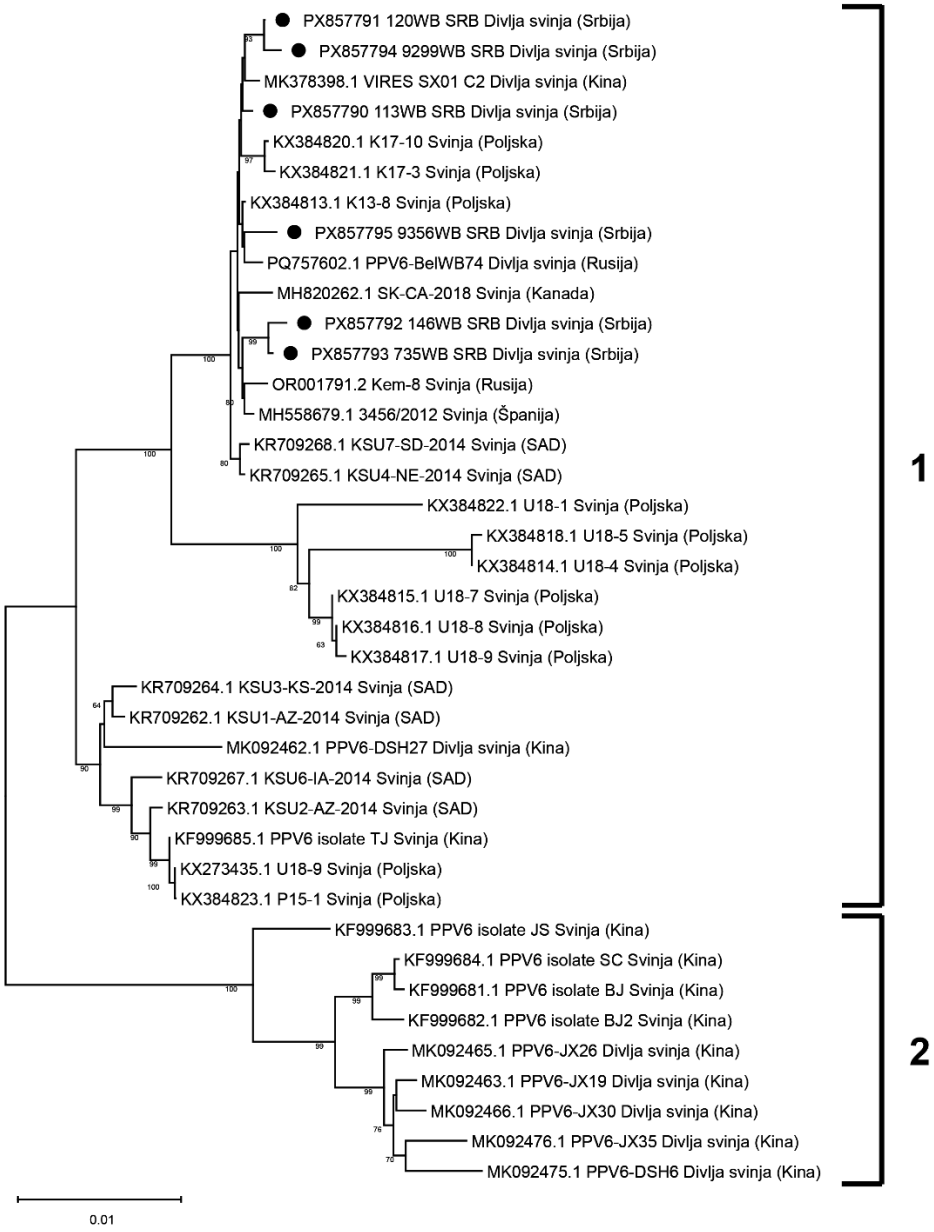
Dodatna analiza parcijalnog VP1 segmenta dužine 330 bp, koji je u prethodnim istraživanjima korišćen kao varijabilni region pogodan za filogenetsku diferencijaciju PPV2 sekvenci, potvrdila je isti obrazac grupisanja. U radu Lagan Tregaskis i sar. (2021) parcijalni VP1 region dužine 330 bp korišćen je za poređenje sa homolognim sekvencama dostupnim u Banci gena, pri čemu je pokazano da ovaj region omogućava jasno razdvajanje sekvenci PPV2 u dve glavne filogenetske grupe, a vrednosti p-distanci oko 0,04 se koriste kao granične u njihovom međusobnom razlikovanju. U našem istraživanju, ispitivani sojevi iz divljih svinja bili su međusobno veoma srodni, sa vrednostima p-distanci od 0,0000 do 0,0420 i nukleotidnom sličnošću od 95,8 do 100%. U poređenju sa sekvencama iz grupe 2, njihove p-distance kretale su se od 0,0090 do 0,0550, uz sličnost od 94,5 do 99,1%, dok su u odnosu na sekvence iz grupe 1 bile znatno divergentnije, sa p-distancama od 0,0760 do 0,1090 i nukleotidnom sličnošću od 89,1 do 92,4%. U okviru cele grupe 2 utvrđene su p-distance od 0 do 0,0697 i sličnost od 93,03 do 100%, dok su između grupa 1 i 2 zabeležene vrednosti od 0,0667 do 0,1152, uz sličnost od 88,48 do 93,33%. Ovi rezultati dodatno potvrđuju jasno genetičko razdvajanje dve filogenetske grupe PPV2 i dosledno svrstavanje ispitivanih sojeva poreklom od divljih svinja u grupu 2.

Analiza vrednosti p-distanci pokazala je da je parcijalni VP1 segment dužine 330 bp imao veću diskriminatornu vrednost za razdvajanje sekvenci PPV2 u dve glavne filogenetske grupe, pri čemu su vrednosti između grupa bile iznad praga od 0,04 (Slika 11). Nasuprot tome, u analizi kompletnog kapsidnog gena uočeno je delimično preklapanje graničnih vrednosti između grupa, iako je i u tom slučaju zadržan isti opšti obrazac genetičkog razdvajanja sekvenci.



Slika 11. Prikaz p-distanci između nukleotidnih sekvenci VP1 segmenta genoma PPV2 dužine 330 bp

Filogenetska analiza kompletnog kapsidnog gena PPV6, izvršena primenom Neighbor-Joining metode uz Kimura 2-parameter (K2) + G model supstitucije i 1.000 bootstrap replikata, pokazala je jasno razdvajanje analiziranih sekvenci u dve glavne filogenetske grupe (Slika 12). Svi sojevi iz Srbije obeleženi krugom grupisali su se isključivo unutar grupe 1, dok nijedan nije pripadao grupi 2, koja obuhvata isključivo kineske sekvence. Pored toga, ispitivane sekvence poreklom od divljih svinja nisu formirale kompaktan monofiletski klaster, već su raspoređene u više potklastera unutar grupe, što ukazuje na genetičku heterogenost sojeva PPV6 prisutnih u populaciji divljih svinja u Srbiji. Sekvence PX857791 i PX857794 su grupisane sa umereno visokom bootstrap podrškom (73) i nalaze se u neposrednoj filogenetskoj vezi sa kineskim sojem iz divlje svinje MK378398.1, dok je sekvenca PX857790 izdvojena u susednom ogranku, u bliskoj vezi sa poljskim sojevima KX384820.1 i KX384821.1. Sekvenca PX857795 se takođe nalazi u okviru istog šireg evroazijskog klastera, u blizini poljskog (KX384813.1) i ruskog soja PPV6 iz divlje svinje (PQ757602.1). Najizraženije grupisanje se zapaža kod sekvenci PX857792 i PX857793 koje formiraju dobro podržan par sa bootstrap vrednošću 99 i filogenetski su najbliže kanadskom soju MH820262.1. Ukupno posmatrano, rezultati ukazuju da sojevi PPV6 detektovani kod divljih svinja u Srbiji pripadaju široko rasprostranjenoj genskoj liniji i da su blisko povezani sa izolatima iz Evrope, Azije i Severne Amerike, bez jasnog grupisanja prema geografskoj pripadnosti u okviru analiziranog skupa sekvenci.



Slika 12. Filogenetsko stablo zasnovano na analizi kompletnog kapsidnog gena sojeva PPV6 iz Srbije (obeleženi crnim krugovima) i drugih sojeva predstavnika dve filogenetske grupe iz Banke gena. Analiza je izvedena u MEGA 11 primenom Neighbor-Joining metode sa Kimura 2-Parameter (K2) + G modelom supstitucije i pouzdanošću od 1.000 replikata (*eng*. bootstrap). Prikazane su samo bootstrap vrednosti ≥ 50.

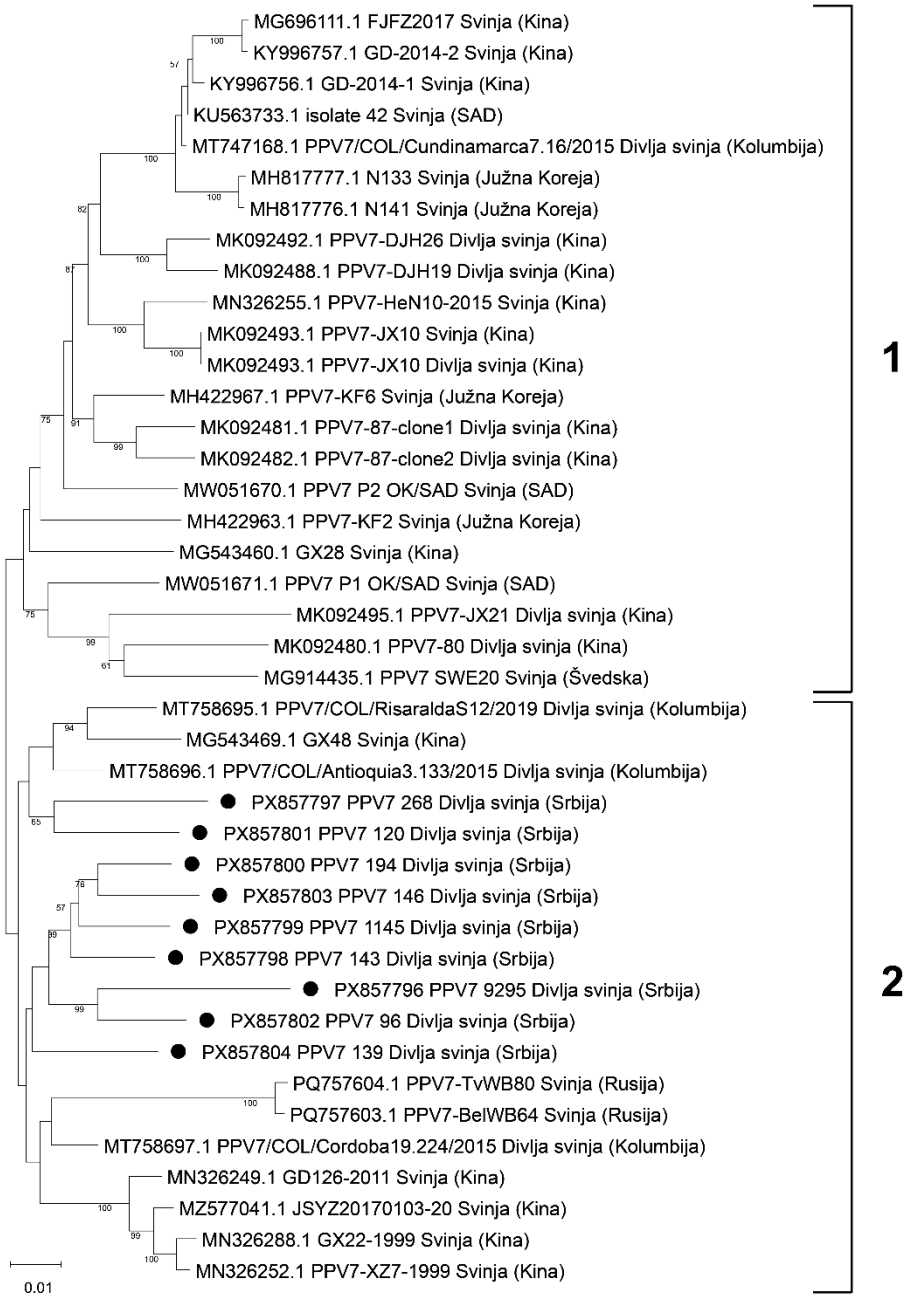
Analiza nukleotidne divergentnosti sekvenci PPV6, zasnovana na kompletnom fragmentu koji kodira kapsidni protein, uključujući VP1 i VP2 regione, pokazala je visok stepen međusobne srodnosti ispitivanih sojeva iz divljih svinja. Vrednosti p-distanci između ispitivanih sojeva kretale su se od 0,0011 do 0,0054, što odgovara nukleotidnoj sličnosti od 99,46 do 99,89% (Slika 13.). U poređenju sa sekvencama svrstanim u grupu 1 prethodno izdvojenu na analiziranom filogenetskom stablu, ispitivani sojevi pokazali su vrednosti p-distanci od 0,0015 do 0,0256, uz nukleotidnu sličnost od 97,44 do 99,85%, što potvrđuje njihovu blisku genetičku povezanost. Nasuprot tome, između grupe 1 i grupe 2 utvrđene su više vrednosti genetičke udaljenosti, sa p-distancama u rasponu od 0,0271 do 0,0532 i nukleotidnom sličnošću od 94,68 do 97,29%. Dobijeni rezultati ukazuju da su ispitivani sojevi PPV6 poreklom od divljih svinja genetički homogeni i da se jasno uklapaju u grupu 1, dok se u odnosu na sekvence grupe 2 uočava nešto veći stepen divergentnosti.

PX857792_PPV6_146WB_SRB_Divlja svinja_(Srbija)																																						
PX857791_PPV6_120WB_SRB_Divlja svinja_(Srbija)	0.00																																					
PX857790_PPV6_113WB_SRB_Divlja svinja_(Srbija)	0.00	0.00																																				
PX857794_PPV6_9299WB_SRB_Divlja svinja_(Srbija)	0.01	0.00	0.00																																			
PX857793_PPV6_735WB_SRB_Divlja svinja_(Srbija)	0.00	0.00	0.00	0.00																																		
PX857795_PPV6_9356WB_SRB_Divlja svinja_(Srbija)	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00																																	
PQ757602.1_PPV6-BelWB74_Divlja svinja_(Rusija)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00																																
KX384816.1_U18-8_Svinja_(Poljska)	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02																															
KX384817.1_U18-9_Svinja_(Poljska)	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00																														
KX384815.1_U18-7_Svinja_(Poljska)	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00																													
KX384818.1_U18-5_Svinja_(Poljska)	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01																												
KX384814.1_U18-4_Svinja_(Poljska)	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00																											
KX384822.1_U18-1_Svinja_(Poljska)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02																										
KX384813.1_K13-8_Svinja_(Poljska)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02																									
KX384820.1_K17-10_Svinja_(Poljska)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.00																								
KX384821.1_K17-3_Svinja_(Poljska)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00																							
KX273435.1_U18-9_Svinja_(Poljska)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02																						
KX384823.1_P15-1_Svinja_(Poljska)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00																					
MK378398.1_VIRES_SX01_C2_Divlja svinja_(Kina)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02																				
MK092462.1_PPV6-DSH27_Divlja svinja_(Kina)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02																			
KF999685.1_PPV6_isolate_TJ_Svinja_(Kina)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.02	0.01																		
KR709268.1_KSU7-SD-2014_Svinja_(SAD)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.00	0.02	0.02																	
KR709265.1_KSU4-NE-2014_Svinja_(SAD)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.00	0.02	0.02	0.00																
KR709264.1_KSU3-KS-2014_Svinja_(SAD)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01														
KR709262.1_KSU1-AZ-2014_Svinja_(SAD)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00													
KR709267.1_KSU6-IA-2014_Svinja_(SAD)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.02	0.01	0.00	0.02	0.02	0.01	0.00												
KR709263.1_KSU2-AZ-2014_Svinja_(SAD)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.02	0.01	0.00	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00											
KF999683.1_PPV6_isolate_JS_Svinja_(Kina)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03										
KF999682.1_PPV6_isolate_BJ2_Svinja_(Kina)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.01									
KF999684.1_PPV6_isolate_SC_Svinja_(Kina)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.01	0.00								
KF999681.1_PPV6_isolate_BJ_Svinja_(Kina)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.01	0.00	0.00							
MK092465.1_PPV6-JX26_Divlja svinja_(Kina)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01						
MK092463.1_PPV6-JX19_Divlja svinja_(Kina)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00					
MK092466.1_PPV6-JX30_Divlja svinja_(Kina)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00				
MK092476.1_PPV6-JX35_Divlja svinja_(Kina)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01				
MK092475.1_PPV6-DSH6_Divlja svinja_(Kina)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01		

Slika 13. Prikaz p-distanci između nukleotidnih sekvenci kompletnog segmenta genoma koji kodira sintezu kapsida PPV6 (VP1 i VP2)

Analiza nukleotidnih sekvenci kompletnog genoma PPV7, izvršena primenom Neighbor-Joining metode uz Tamura–Nei (TN93) + G model supstitucije i 1.000 bootstrap replikata, pokazala je jasno razdvajanje svih analiziranih sekvenci u dve glavne filogenetske grupe. Svi sojevi iz Srbije (obeleženi krugom) grupisali su se isključivo unutar grupe 2, dok nijedan nije pripadao grupi 1 (Slika 14). Unutar grupe 2 ispitivani sojevi iz ove studije raspoređeni su u više blisko povezanih ogranaka, što ukazuje na izvesnu genetičku heterogenost PPV7 sojeva prisutnih u populaciji divljih svinja u Srbiji. Sekvence PX857797 i PX857801 izdvojene su u blizini kolumbijskih izolata iz divljih svinja i kineskog soja GX48, pri čemu čvor koji povezuje širi ogranak ima umerenu bootstrap podršku. Osim toga, sekvence PX857800, PX857803, PX857799 i PX857798 formiraju grupu koja ukazuje na njihovu blisku filogenetsku srodnost. Najkompaktniji lokalni potklaster čine sekvence PX857796 i PX857802 koje su povezane bootstrap vrednošću 99, dok je sekvenca PX857804 uključena u isti širi ogranak, ali kao zasebno pozicioniran soj. Ovaj skup

sekvenci filogenetski je najbliži ruskim sojevima PQ757604.1 i PQ757603.1 kao i pojedinim kolumbijskim i kineskim sekvencama iz iste grupe, što ukazuje da PPV7 sojevi detektovani kod divljih svinja u Srbiji pripadaju široko rasprostranjenoj filogenetskoj liniji i da su blisko povezani sa pojedinim sojevima iz različitih geografskih područja.



Slika 14. Filogenetsko stablo zasnovano na analizi kompletnog genoma sojeva PPV7 iz Srbije (obeleženi crnim krugovima) i drugih sojeva predstavnika dve filogenetske grupe iz

Banke gena. Analiza je izvedena u MEGA 11 primenom Neighbor-Joining metode sa Tamura–Nei (TN93) + G modelom supstitucije i pouzdanošću od 1.000 replikata (*eng*. bootstrap). Prikazane su samo bootstrap vrednosti ≥ 50.

Analiza nukleotidne divergentnosti sekvenci PPV7 zasnovana na kompletnom genomu koji obuhvata regione VP1, VP2 i NS1, pokazala je izraženu, ali očekivanu genetičku varijabilnost među ispitivanim sojevima iz divljih svinja. P-distance između ispitivanih sojeva kretale su se od 0,0302 do 0,0782, što odgovara sličnosti od 92,18 do 96,98%. U poređenju sa sekvencama iz grupe 2, ispitivani sojevi pokazali su vrednosti p-distanci u istom rasponu, uz nukleotidnu sličnost od 92,12 do 96,51%, što potvrđuje njihovu pripadnost ovoj filogenetskoj grupi. Unutar cele grupe 2 utvrđene su p-distance od 0,0102 do 0,0788, pri čemu se nukleotidna sličnost kretala od 92,12 do 98,98%, što ukazuje na prisustvo izvesne unutrašnje genetičke heterogenosti. Između grupa 1 i 2 zabeležene su više vrednosti genetičke udaljenosti, sa p-distancama u rasponu od 0,0400 do 0,0926 i nukleotidnom sličnošću od 90,74 do 96,00%. Dobijeni rezultati ukazuju da se ispitivani sojevi PPV7 poreklom od divljih svinja uklapaju u grupu 2 i pokazuju stepen divergentnosti uporediv sa ostalim sekvencama unutar navedene grupe, dok su genetički udaljeniji u odnosu na sekvence grupe 1.

4. Otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina PCV2 i PCV3 u uzorcima poreklom od divljih svinja primenom metode real-time PCR

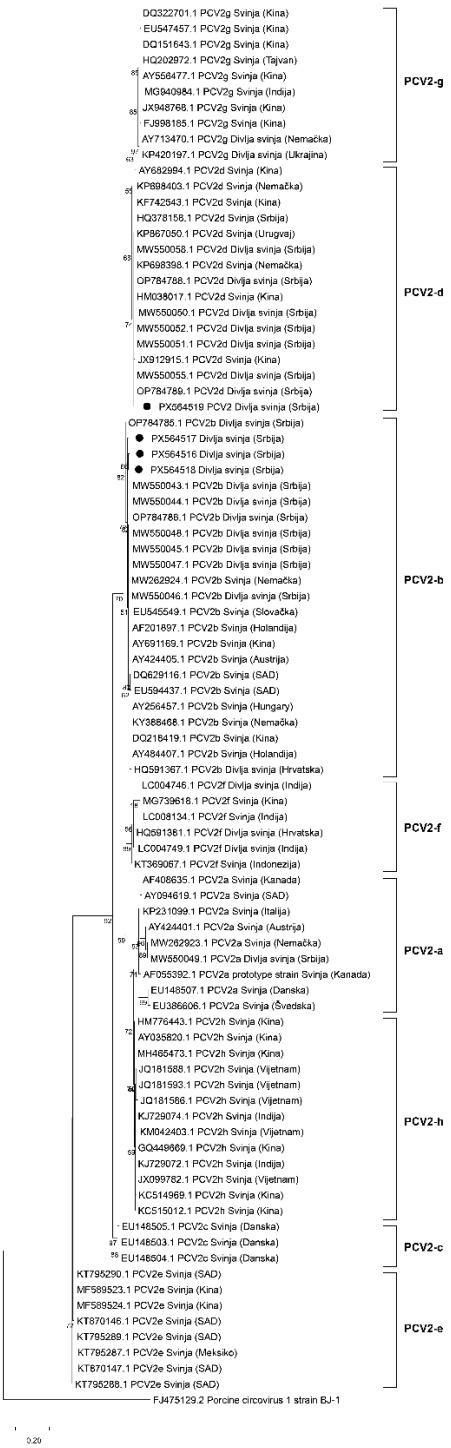
U ispitivanim uzorcima poreklom od 90 divljih svinja, real-time PCR analizom detektovana je nukleinska kiselina PCV2 u 17/90 (18,9%) uzoraka, dok je PCV3 detektovan u 12/90 (13,3%) uzoraka.

U okviru 55 uzoraka pozitivnih na svinjske parvoviruse, mešovite infekcije sa cirkovirusima su bile česte: PCV2 je detektovan u 9/55 (16,4%) PPV-pozitivnih uzoraka, i to u kombinacijama PPV2+PPV7+PCV2 (5/55; 9,1%), PPV2+PPV3+PPV7+PCV2 (4/55; 7,3%).

Osim toga, PCV3 je bio detektovan u 10/55 (18,2%) PPV-pozitivnih uzoraka, najčešće u kombinacijama PPV7+PCV3 (2/55; 3,6%) i PPV2+PCV3 (3/55; 5,5%), zatim PPV2+PPV7+PCV3 (3/55; 5,5%), kao i u ređim kombinacijama PPV2+PPV3+PCV3 (1/55; 1,8%) i PPV2+PPV6+PPV7+PCV3 (1/55; 1,8%). Ukupno posmatrano, cirkovirusi su bili uključeni u 19/55 (34,5%) PPV-pozitivnih uzoraka (PCV2 ili PCV3), pri čemu su najčešće mešovite infekcije uključivale PPV2, što je u skladu sa njegovom dominantnom učestalošću u ispitivanoj populaciji. Od ukupno 17 uzoraka pozitivnih na PCV2, 9 je istovremeno bilo PPV-pozitivno, dok je 8/90 (8,9%) isključivo PCV2-pozitivnih (bez infekcija drugim uzročnicima). Od ukupno 12 uzoraka pozitivnih na prisustvo PCV3, 10 je bilo PPV-pozitivno, dok je 2/90, odnosno 2,2% isključivo PCV3-pozitivnih. Istovremeno prisustvo PCV2 i PCV3 nije utvrđeno ni u jednom ispitivanom uzorku, pri čemu je bar jedan cirkovirus detektovan u ukupno 29/90 (32,2%) uzoraka poreklom od divljih svinja.

5. Analiza varijabilnog segmenta gena koji kodira sintezu kapsida PCV2 i filogenetska analiza dobijenih nukleotidnih sekvenci radi izvođenja genotipizacije virusa

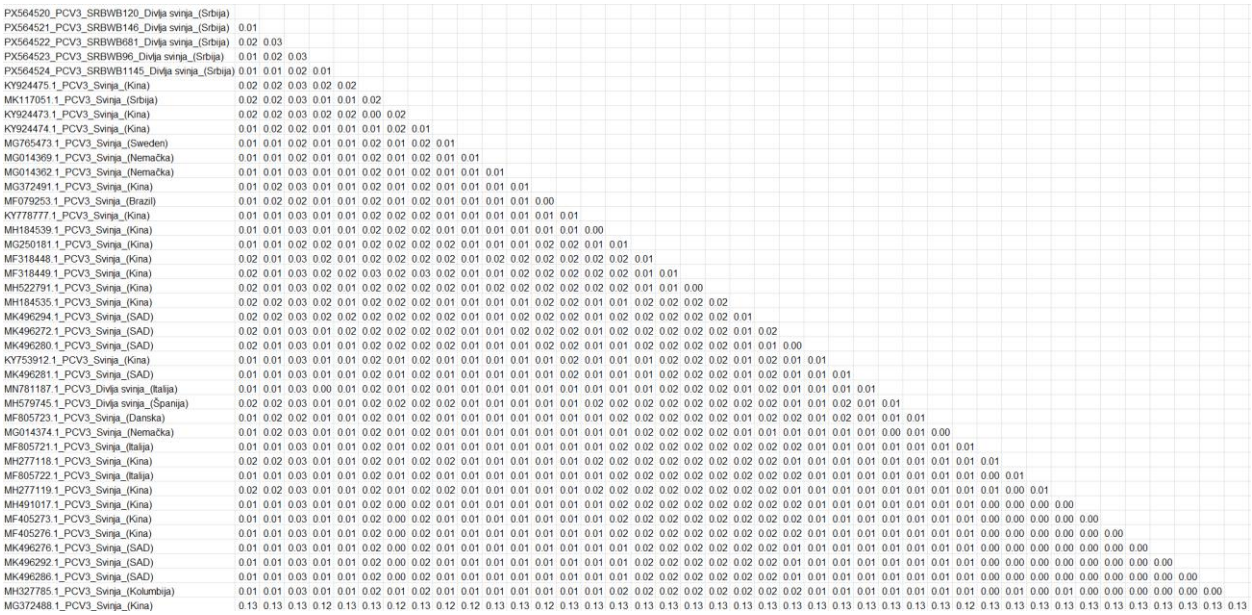
Nukleotidne sekvence PCV2 koje su ispunile kriterijume kvaliteta deponovane su u repozitorijum Banke gena (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) pod sledećim pristupnim brojevima: PX564516-PX564519. Filogenetska analiza dela kapsidnog gena (ORF2) PCV2 izvedena Maximum Likelihood metodom (HKY+G; 1.000 bootstrap replikata) pokazala je jasno grupisanje sekvenci u klastere koji odgovaraju genotipovima PCV2a–PCV2h (Slika 15). Sojevi poreklom od divljih svinja iz ovog ispitivanja nisu formirali zaseban klaster, već su uklopljeni u već definisane genotipove. Jedan soj (PX564519) pozicioniran je unutar PCV2d klastera, gde se grupiše sa drugim dostupnim sekvencama poreklom iz Srbije, dok su preostala tri soja (PX564516–PX564518) smeštena u okviru PCV2b genotipa, takođe u bliskoj vezi sa nekoliko sekvenci iz Srbije koje pripadaju istom genotipu. Prikazane bootstrap vrednosti (≥50) dodatno potkrepljuju stabilnost genotipskog razdvajanja i pripadnost obeleženih sojeva navedenim klasterima. U okviru analiziranog skupa podataka uočava se cirkulacija predstavnika dva dominantna genotipa u Srbiji (PCV2b i PCV2d). Pored navedenog, lokalizacija sekvence poreklom iz Srbije unutar klastera PCV2a (divlja svinja) ukazuje na mogućnost prisustva i drugih genotipova u populacijama divljih svinja u Srbiji. Uprkos tome, sojevi ispitivani u ovoj studiji pripadaju genotipovima PCV2b i PCV2d, pri čemu, na osnovu analiziranog fragmenta ORF2, nije uočeno izdvajanje zasebnih linija virusa specifičnih za Srbiju.



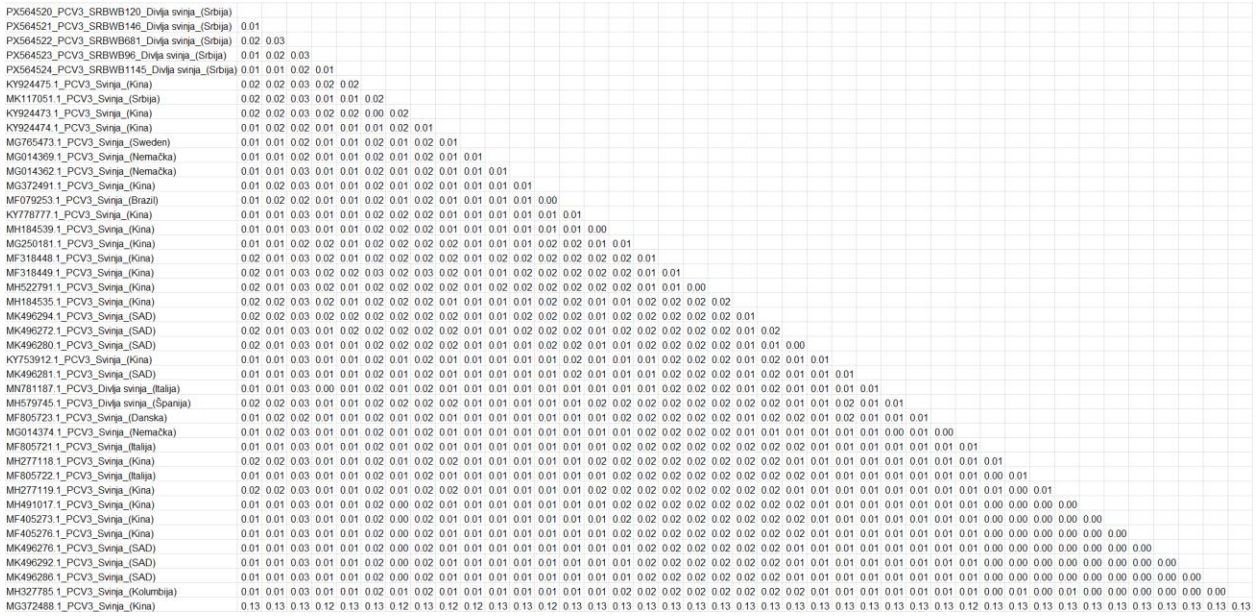
Slika 15. Filogenetsko stablo zasnovano na analizi dela kapsidnog gena sojeva PCV2 iz Srbije (obeleženi crnim krugovima) i drugih sojeva predstavnika genotipova (PCV2a-PCV2h) iz Banke gena. Analiza je izvedena u MEGA 11 primenom Maximum Likelihood metode sa HKY + G modelom supstitucije i pouzdanošću od 1.000 replikata (*eng*. bootstrap). Prikazane su samo bootstrap vrednosti ≥ 50. Nukleotidna sekvenca PCV1 (FJ745129.2) je dodata kao spoljašnja grupa.

6. Analiza kompletnog genoma detektovanih sojeva PCV3, upoređivanje dobijenih nukleotidnih sekvenci sa analognim sekvencama dostupnim u Banci gena i njihova filogenetska analiza u cilju izvođenja genotipizacije virusa

Nukleotidne sekvence koje su ispunile kriterijume kvaliteta deponovane su u repozitorijum Banke gena (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) pod sledećim pristupnim brojevima: PX564520-PX564524. Analiza p-distance na nivou kompletnog genoma pokazala je da, nakon izuzimanja divergentne sekvence MG372488.1, maksimalna p-distanca među preostalim sekvencama u ispitivanju iznosila je 0,0296 (divergencija od 2,96%), što je u skladu sa kriterijumom ≤3% za pripadnost jedinstvenoj genotipskoj grupi prema Franzo i sar. (2020) (Slika 16). Maksimalna razlika između pet ispitivanih sekvenci kompletnog genoma PCV3 dobijenih u ovom ispitivanju iznosila je 1,46%, što ukazuje na relativno ograničenu lokalnu genetičku varijabilnost u odnosu na ukupnu raznovrsnost svih sekvenci PCV3 uključenih u analizu. Maksimalna p-distanca između ORF2 sekvenci (nakon izuzimanja MG372488.1) iznosila je 0,0326 (divergencija od 3,26%), dok je maksimalna divergencija među srpskim sekvencama bila 2,79%, što je znatno ispod praga ≤6% koji je predložen za ORF2 (Slika 17).

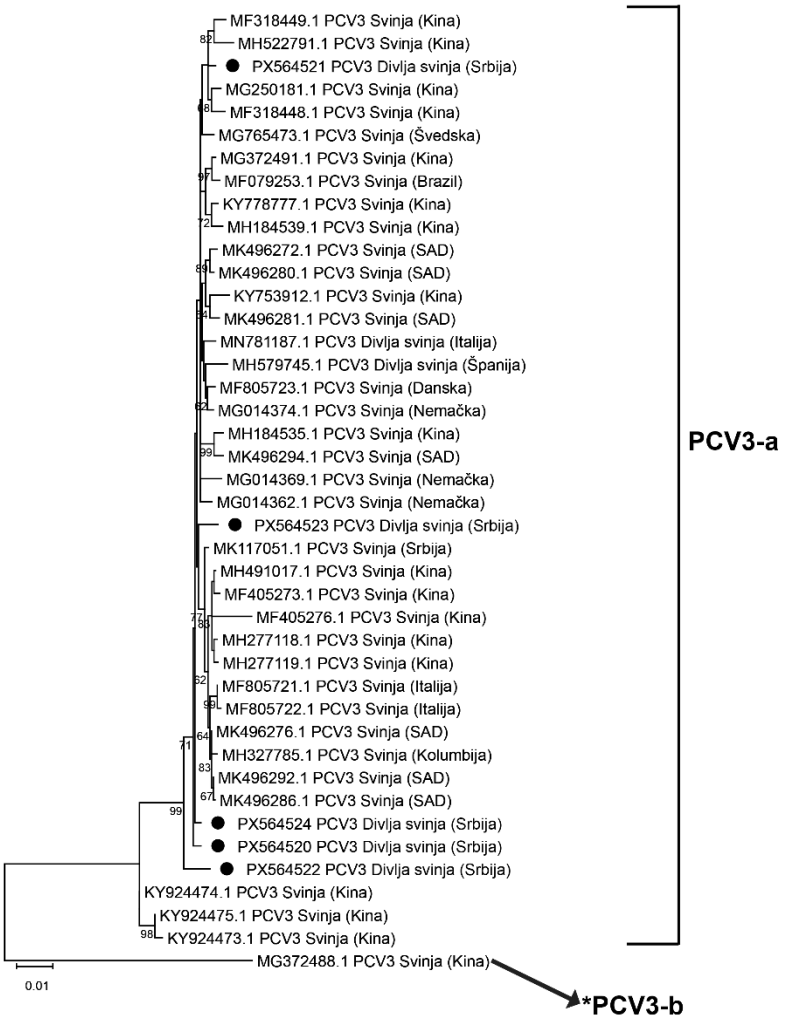


Slika 16. Prikaz p-distanci između nukleotidnih sekvenci kompletnog genoma PCV3

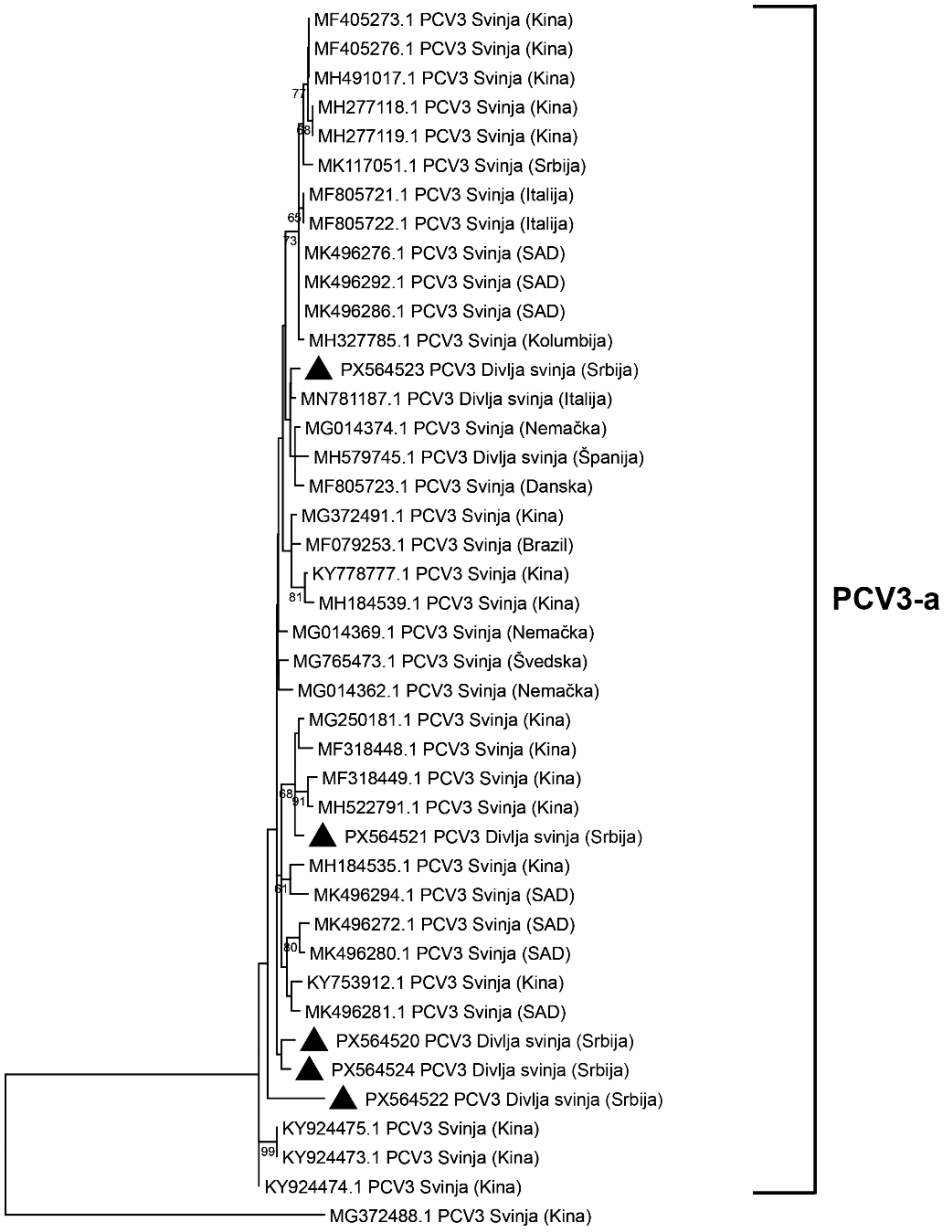


Slika 17. Prikaz p-distanci između nukleotidnih sekvenci ORF2 regiona genoma PCV3

Analize filogenetskih stabala kompletnog genoma i ORF2 PCV3 ukazale su da svih pet sekvenci poreklom od divljih svinja iz Srbije pripadaju dominantnom klasteru koji odgovara genotipu PCV3-a (Slika 18, Slika 19). Međutim, sekvence iz ove studije ne formiraju jedinstven, klaster, već su raspoređene u više unutrašnjih podlinija unutar PCV3-a genotipa. Sekvenca PX564523 grupiše se u blizini sekvence poreklom od domaće svinje iz Srbije (MK117051.1), dok su PX564521 i podskup PX564520/22/24 pozicionirani u drugim delovima stabla, ali unutar istog genotipa. Navedeni rezultati ukazuju na istovremenu cirkulaciju više linija PCV3 u Srbiji. Sekvenca MG372488.1 iz Kine se značajnije razlikuje u odnosu na ostale sekvence (7,43–9,49% na nivou genoma i 12,09–13,18% na nivou ORF2) i na filogenetskim stablima se pojavljuje kao duga, bazalna grana u odnosu na dominantni PCV3-a klaster. Navedena sekvenca je značena kao provizorni PCV3-b genotip imajući u vidu da se radi o samo jednoj sekvenci koja najverovatnije predstavlja visoko divergentnu liniju u odnosu na PCV3-a. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da svi sojevi PCV3 poreklom od divljih svinja iz ove studije pripadaju PCV3-a genotipu, pri čemu njihov raspored ukazuje na cirkulaciju najmanje dve ili više linija PCV3 u ispitivanoj populaciji.



Slika 18. Filogenetsko stablo zasnovano na analizi kompletnog genoma sojeva PCV3 iz Srbije (obeleženi crnim krugovima) i drugih sojeva iz Banke gena. Označeni su genotipovi PCV3-a i provizorni (*) PCV3-b. Analiza je izvedena u MEGA 11 primenom Maximum Likelihood metode sa Tamura–Nei+G modelom supstitucije i pouzdanošću od 1.000 replikata (*eng*. bootstrap). Prikazane su samo bootstrap vrednosti ≥ 60.



Slika 19. Filogenetsko stablo zasnovano na analizi ORF2 regiona genoma sojeva PCV3 iz Srbije (obeleženi crnim trouglovima) i drugih sojeva iz Banke gena. Analiza je izvedena u MEGA 11 primenom Maximum Likelihood metode sa HKY+G modelom supstitucije i pouzdanošću od 1.000 replikata (*eng*. bootstrap). Prikazane su samo bootstrap vrednosti ≥ 60.

7. Otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina parvovirusa mesojeda (CPV2 i FPV) u uzorcima poreklom od šakala i lisica primenom metode real-time PCR

U uzorcima poreklom od ukupno 98 divljih mesojeda, real-time PCR skriningom detektovano je prisustvo nukleinske kiseline parvovirusa mesojeda u 12/98 (12,2%) uzoraka. Budući da primenjeni real-time PCR predstavlja skrining koji ne omogućava pouzdanu diferencijaciju unutar vrste *Carnivore protoparvovirus 1*, razdvajanje na CPV2 i FPV izvršeno je naknadno sekvenciranjem fragmenta kapsidnog gena VP2. Sekvenciranje je potvrdilo CPV2 u 7/98 (7,1%) i FPV u 5/98 (5,1%) uzoraka; među CPV2 pozitivnim uzorcima 2/7 (28,6%) poticala su od crvenih lisica, a 5/7 (71,4%) od šakala, dok su među FPV pozitivnim uzorcima 4/5 (80,0%) bila poreklom od crvenih lisica, a 1/5 (20,0%) od šakala. Ukupna prevalencija parvovirusa bila je slična kod obe vrste domaćina (6/45; 13,3% kod šakala i 6/53; 11,3% kod crvenih lisica), ali je nakon tipizacije uočena jasna razlika u strukturi: CPV2 je bio češći kod šakala (5/45; 11,1%) nego kod lisica (2/53; 3,8%), dok je FPV pretežno detektovan kod crvenih lisica (4/53; 7,5%) u odnosu na šakale (1/45; 2,2%). Imajući u vidu relativno mali broj pozitivnih uzoraka, navedene razlike treba tumačiti kao opisne, a ne kao dokaz statistički potvrđene razlike između domaćina.

8. Analiza varijabilnog segmenta gena koji kodira sintezu kapsida detektovanih sojeva parvovirusa mesojeda i filogenetska analiza dobijenih nukleotidnih sekvenci u cilju genotipizacije virusa

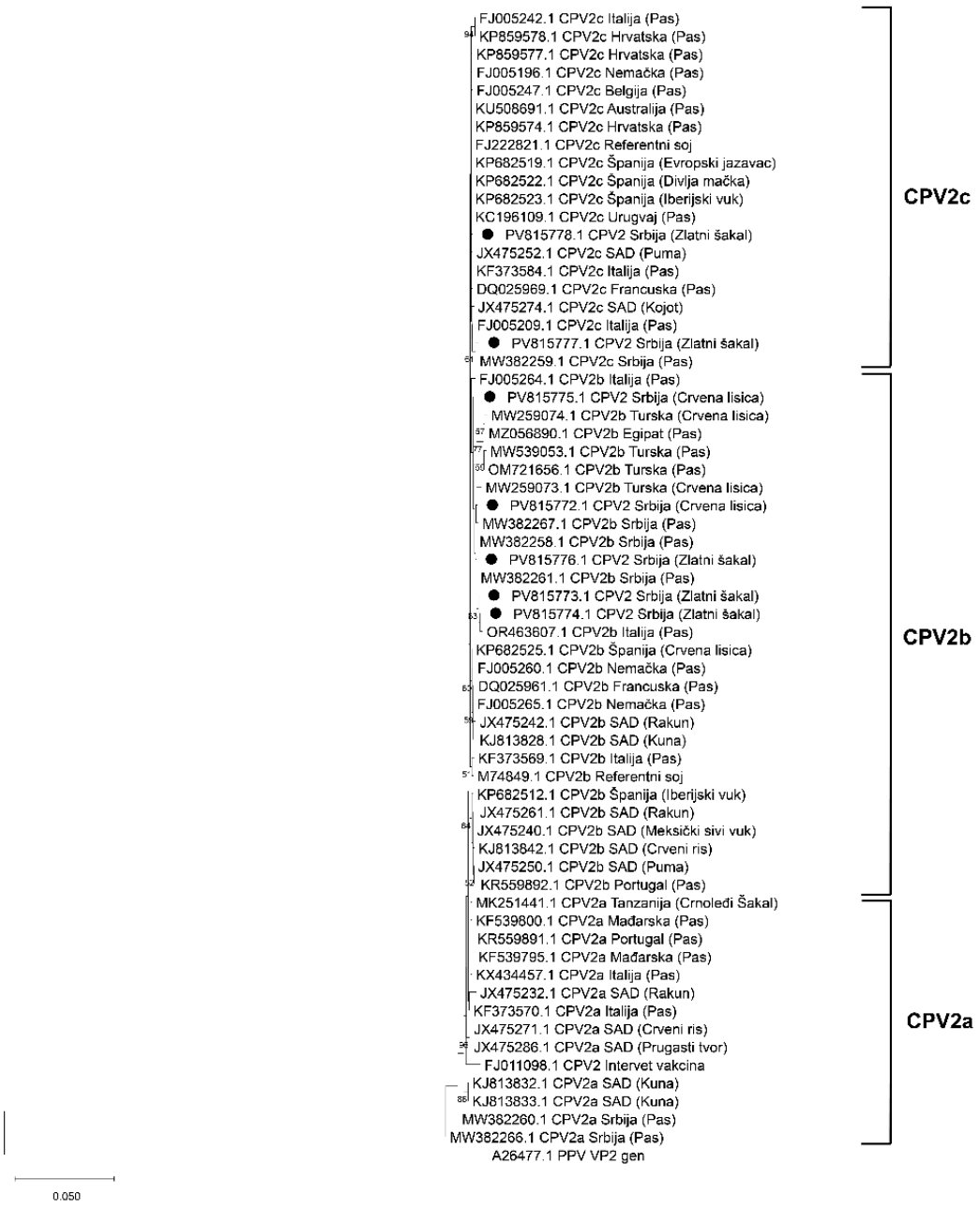
Nukleotidne sekvence koje su ispunile kriterijume kvaliteta deponovane su u repozitorijum Banke gena (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) pod sledećim pristupnim brojevima: PV815767-PV815778. Filogenetska analiza varijabilnog segmenta kapsidnog gena detektovanih sojeva parvovirusa divljih mesojeda iz Srbije pokazala je da se svi ispitivani sojevi pozicioniraju unutar genotipova CPV2b i CPV2c u okviru kojih su raspoređeni unutar više podgrana (Slika 20). U okviru CPV2c, sekvenca PV815777 (zlatni šakal) smeštena je blisko sekvenci MW382259.1 (pas, Srbija), uz umerenu bootstrap podršku, što ukazuje na blisku srodnost ovih izolata u okviru analiziranog genskog fragmenta. Druga sekvenca poreklom od zlatnog šakala koja pripada CPV2c (PV815778) dodatno potvrđuje prisustvo ovog genotipa u populaciji divljih mesojeda u Srbiji, a na filogenetskom stablu je smešten u okviru šire grupe sojeva iz većeg broja zemalja. U okviru genotipa CPV2b, sojevi iz Srbije poreklom od divljih mesojeda raspoređeni su u više grupa. Sekvenca PV815775 (crvena lisica) smeštena je u gornjem delu CPV2b klastera, u blizini podskupa koji uključuje sekvence iz drugih geografskih područja (Turska i Egipat), međutim umerena bootstrap podrška ne obezbeđuje dovoljan dokaz o eventualnom poreklu ili pravcu širenja virusa. Nasuprot tome, detaljniji uvid u topologiju otkriva da sekvence PV815772, PV815773, PV815774 i PV815776 čine najkompaktniju grupu među ispitivanim sojevima poreklom od divljih mesojeda. Navedene sekvence se u stablu grupišu veoma blisko unutar CPV2b klastera što je u skladu i sa analizom p-distanci između njih (p-distance 0,0013–0,0026, odnosno 0,13–0,26%). Pored toga, ove sekvence se nalaze u grupi sa pojedinim sekvencama CPV2b poreklom od pasa iz Srbije, što ukazuje da je najverovatnije reč o liniji virusa koja cirkuliše između domaćih i divljih mesojeda.

Sveukupno posmatrano, filogenetski položaj ispitivanih sojeva u okviru klastera CPV2b i CPV2c ukazuje na njihovu sličnost sa referentnim sekvencama u okviru ovih genotipova, uključujući sekvence virusa poreklom od pasa iz Srbije. Dobijeni rezultati se poklapaju sa pretpostavkom da sojevi CPV2 cirkulišu između populacija pasa i divljih mesojeda. Međutim, umerena bootstrap podrška pojedinih unutrašnjih čvorova filogenetskog stabla, kao i ograničen fragment kapsidnog gena koji je ispitivan ne omogućavaju pouzdano zaključivanje o poreklu ili smeru transmisije virusa.

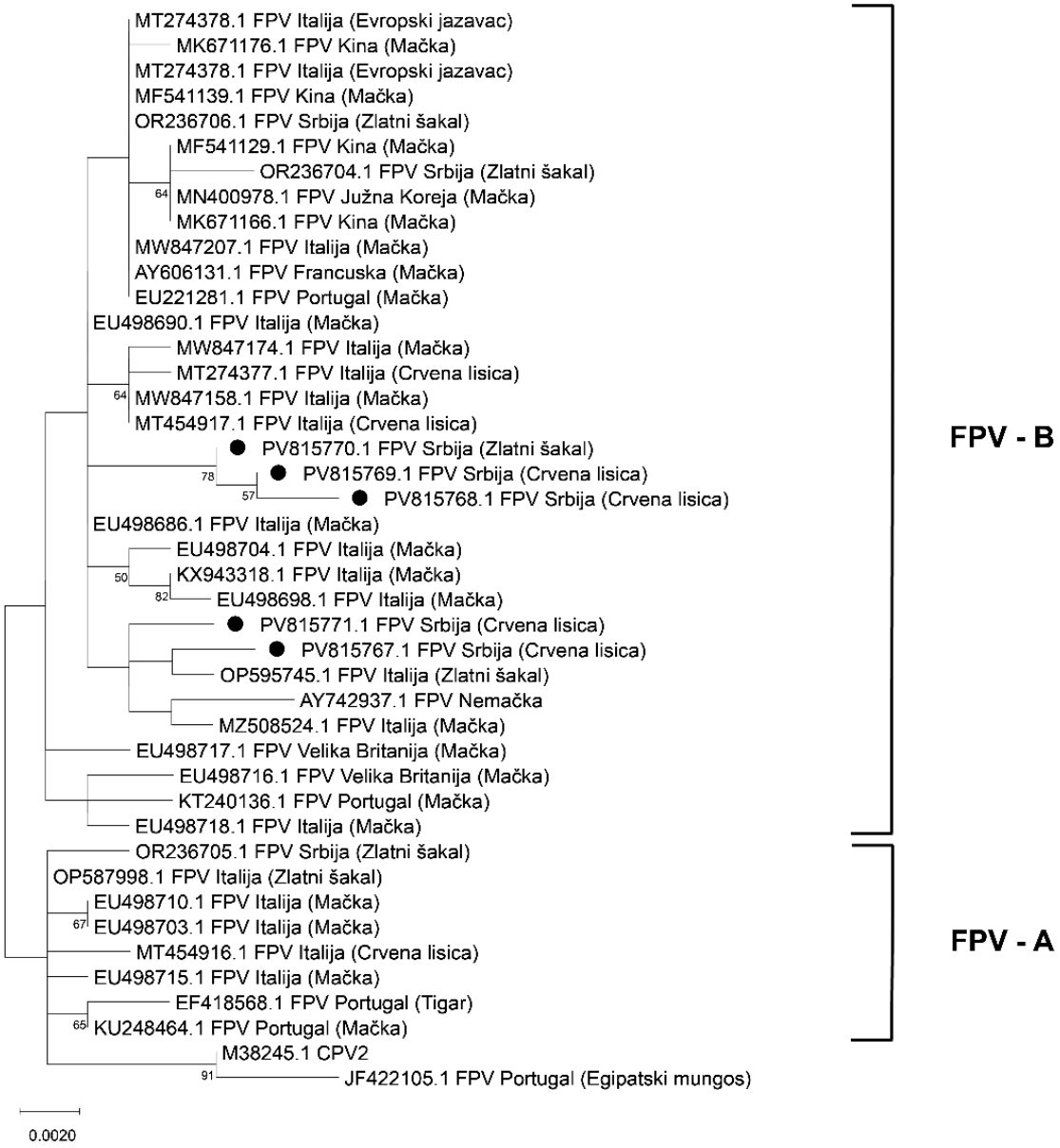
Analiza p-distanci ispitivanog fragmenta kapsidnog gena pokazala je da su sojevi CPV2 poreklom od divljih mesojeda iz ove studije unutar genotipova CPV2b/CPV2c genetički slabo divergentni. Naime, među CPV2b sojevima (PV815772–PV815776) p-distance su iznosile od 0,0013 do 0,0046 (0,13–0,46%, prosečno ≈0,0025, odnosno 0,25%), pri čemu razlike između sojeva najbliže pozicioniranih na filogenetskom stablu (PV815772, PV815773, PV815774 i PV815776) iznosile 0,13–0,33% (prosečno ≈0,20%). Više ispitivanih sekvenci od divljih mesojeda bilo je identično sekvencama poreklom od pasa iz Srbije (MW382258.1 i MW382261.1), što ukazuje da filogenetska bliskost sojeva CPV2 nije ograničena na vrstu domaćina. U okviru CPV2c, sojevi PV815777 i PV815778 razlikovali su se međusobno za 0,46% pri čemu je PV815778 pokazao minimalnu divergenciju u odnosu na više CPV2c sekvenci (najmanje ~0,07%), dok je PV815777 bio umerenije divergentan u odnosu na najbliže CPV2c sekvence (0,33–0,40%), ali u potpunosti identičan soju poreklom od psa iz Srbije (MW382259.1) što je u skladu sa njegovim položajem na filogenetskom stablu.

Filogenetsko stablo dobijeno analizom sojeva FPV poreklom od divljih mesojeda pokazuje da se ispitivane sekvence uklapaju u jednu od dve grupe koje odgovaraju podgrupama FPV-A i FPV-B, ranije opisanim kod sojeva poreklom od zlatnih šakala u Srbiji (Milićević i sar., 2024) (Slika 21). Sojevi iz ove studije su raspoređeni u okviru grupe FPV-B, međutim, sojevi iz Srbije su raspoređeni i u okviru FPV-A (ranije opisan OR236705), što ukazuje da u populaciji divljih mesojeda u Srbiji ne cirkuliše jedinstvena linija virusa. U okviru FPV-B ispitivani sojevi poreklom od divljih mesojeda (PV815767, PV815768, PV815769, PV815770 i PV815771) se nalaze u okviru različitih podgrupa zajedno sa evropskim sekvencama. Posebno se izdvaja grupa PV815768–PV815770 poreklom od zlatnog šakala i dve crvene lisice sa relativno visokom bootstrap podrškom, što sugeriše postojanje lokalne cirkulacije virusa. Soj PV815767 se pozicionira neposredno uz italijanski soj detektovan kod zlatnog šakala (OP595745), što ukazuje na cirkulaciju genetički srodnih sojeva FPV kod divljih mesojeda na tlu Evrope.

Analiza p-distanci potvrđuje da su ispitivani sojevi FPV iz ove studije visoko slični, uz ukupni raspon međusobnih distanci od 0,0013 do 0,0135 (divergencija 0,13–1,35%). Najniža stopa nukleotidne divergencije je uočena među sojevima koji u stablu formiraju zajedničku grupu: PV815769–PV815770=0,13%, PV815769–PV815768=0,26% i PV815770–PV815768 = 0,39%. Pored toga, uočena je i niska stopa divergencije između lisičijeg soja PV815767 i italijanskog soja poreklom od zlatnog šakala (OP595745) sa 0,26% razlike. Jedini soj poreklom iz Srbije u okviru FPV-A (OR236705) u poređenju sa FPV-B sojevima iz ovog ispitivanja pokazuje nešto veću stopu različitosti (0,81–1,21%), što uslovljava njihovo razdvajanje na filogenetskom stablu.



Slika 20. Filogenetsko stablo zasnovano na analizi varijabilnog regiona kapsidnog gena sojeva CPV2 iz Srbije (obeleženi crnim krugovima) i drugih sojeva predstavnika genotipova (CPV2a, CPV2b i CPV2c) iz Banke gena. Analiza je izvedena u MEGA 11 primenom Neighbor Joining metode i Tamura 3-parameter modela uz pouzdanost od 1.000 replikata (*eng*. bootstrap). Prikazane su samo bootstrap vrednosti ≥ 50.



Slika 21. Filogenetsko stablo zasnovano na analizi varijabilnog regiona kapsidnog gena sojeva FPV iz Srbije (obeleženi crnim krugovima) i drugih sojeva iz Banke gena. Uočava se razdvajanje sekvenci u dve grupe: FPV-A i FPV-B. Analiza je izvedena u MEGA 11 primenom Maximum Likelihood metode i Tamura–Nei+G+I modela supstitucije uz pouzdanost od 1.000 replikata (*eng*. bootstrap). Prikazane su samo bootstrap vrednosti ≥ 50.

9. Otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina cirkovirusa pasa (CanineCV) i lisica (FoxCV) u uzorcima poreklom od šakala i lisica primenom metode real-time PCR

U okviru real-time PCR ispitivanja, DNK cirkovirusa je detektovana u 31/98 (31,6%) uzoraka poreklom od divljih mesojeda. Među pozitivnim uzorcima najčešće je registrovan CanineCV genotip 5 (FoxCV) (16/31; 51,6%), a zatim CanineCV (11/31; 35,5%), dok su mešovite infekcije (CanineCV+FoxCV) utvrđene u 4/31 (12,9%) uzoraka. Posmatrano po vrstama domaćina (45 šakala i 53 crvene lisice), ukupna prevalencija cirkovirusa bila je viša kod šakala (19/45; 42,2%) nego kod lisica (12/53; 22,6%), pri čemu je kod šakala češće detektovan CanineCV (9/45; 20,0%) u odnosu na FoxCV (6/45; 13,3%), uz prisustvo mešovitih infekcija (4/45; 8,9%), dok je kod crvenih lisica dominantno registrovan FoxCV (10/53; 18,9%) uz znatno ređu detekciju CanineCV (2/53; 3,8%) i bez mešovitih infekcija (0/53; 0,0%). Rezultati pokazuju da je kod šakala CanineCV učestaliji (9/19; 47,4%) od FoxCV (6/19; 31,6%), uz 4/19 (21,0%) mešovitih infekcija, dok je kod crvenih lisica FoxCV dominantan (10/12; 83,3%) u odnosu na CanineCV (2/12; 16,7%). Dodatno, jedan uzorak poreklom od šakala bio je istovremeno pozitivan na CPV2 i FoxCV (1/98; ≈1,0%), što ukazuje na mogućnost mešovitih infekcija cirkovirusima i parvovirusima u istoj populaciji.

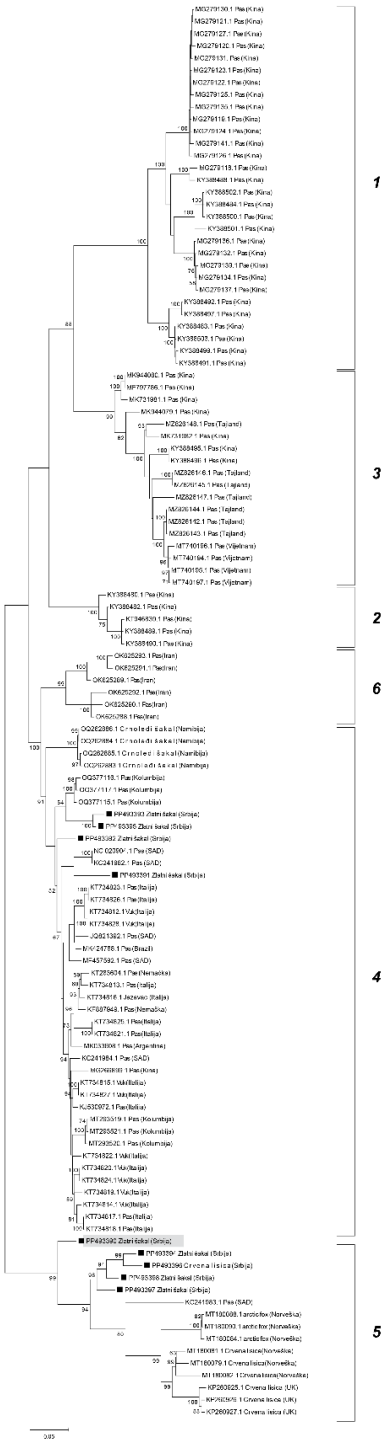
10. Analiza kompletnog genoma detektovanih sojeva cirkovirusa mesojeda, upoređivanje dobijenih nukleotidnih sekvenci sa analognim sekvencama dostupnim u Banci gena i njihova filogenetska analiza

Nukleotidne sekvence koje su ispunile kriterijume kvaliteta deponovane su u repozitorijum Banke gena (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) pod sledećim pristupnim brojevima: PP493390-PP493398. Između svih sekvenci obuhvaćenih ovom studijom p-distance su se kretale od 0,0170 do 0,1620 (divergencija od 1,7% do 16,2%). Razlike između ispitivanih sekvenci poreklom od zlatnih šakala u okviru genotipa 4 iznosile su 1,7–7,9%, dok je unutar genotipa 5 utvrđena divergencija od 3,7% do 8,4%. U poređenju sa sekvencama dostupnim u Banci gena, ispitivane sekvence genotipa 4 pokazale su divergenciju od 3,3% do 15,7%, pri čemu su najmanje razlike uočene u odnosu na sekvence iz Italije, Nemačke, Sjedinjenih Američkih Država i Južne Amerike, dok su izraženija odstupanja registrovana u odnosu na sojeve poreklom iz Azije. Sekvence sojeva genotipa 5 odstupale su od referentnih sekvenci dostupnih u Banci gena za 6,8–12,9%. Najbliže podudaranje registrovano je sa sojevima poreklom od crvenih lisica iz Norveške, dok su najveće nukleotidne razlike uočene u poređenju sa sojevima poreklom od crvenih i arktičkih lisica iz Ujedinjenog Kraljevstva, odnosno sa Svalbarda.

Rezultati filogenetske analize sojeva CanineCV iz ovog ispitivanja prikazuju da se oni razvrstavaju u prethodno definisane genotipove (1–6), pri čemu se uočava izraženo grupisanje sekvenci po geografskom poreklu i domaćinima. Genotipovi 1, 2 i 3 gotovo u potpunosti obuhvataju sekvence azijskog porekla (pretežno iz Kine, uz prisustvo sekvenci iz Tajlanda i Vijetnama), dok genotip 6 čini zasebna grupa sastavljena od sekvenci poreklom iz Irana. Nasuprot tome, genotip 4 okuplja sojeve široke geografske distribucije, uključujući Evropu, Sjedinjene Američke Države, Južnu Ameriku i Afriku (genotip 1 prema numeraciji Urbani i sar., 2021; videti napomenu u poglavlju Pregled literature). Sekvence

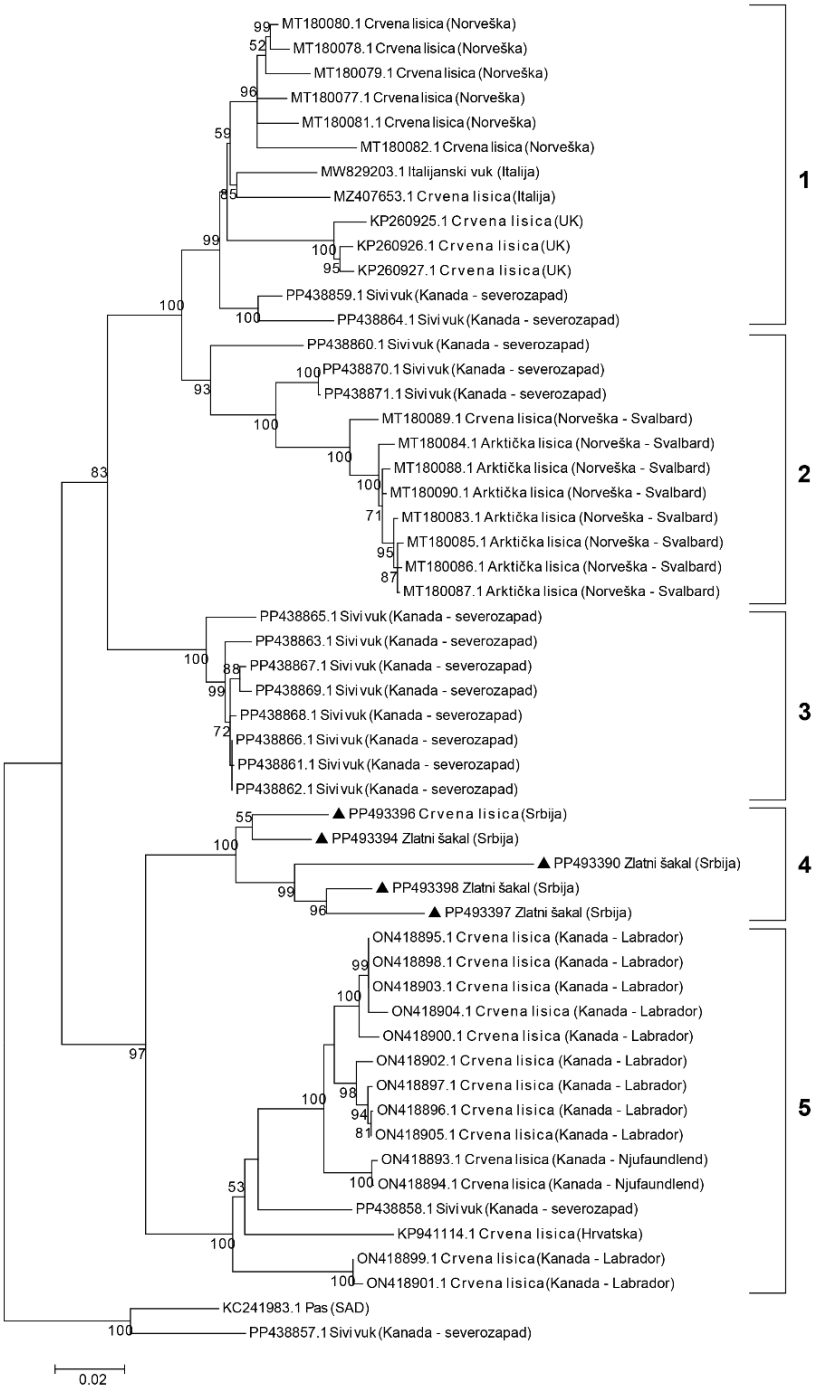
poreklom iz ove studije raspoređene su u dva genotipa (Slika 22). Četiri soja CanineCV poreklom od zlatnih šakala (PP493391-3 i PP493395) grupisane su u okviru genotipa 4 (genotip 1 prema numeraciji Urbani i sar., 2021). Preostalih pet sekvenci iz ove studije (PP493390, PP493394, PP493397-8 poreklom od šakala i PP493396 poreklom od lisice) pozicionirano je u okviru genotipa 5, poznatog i kao FoxCV, odnosno linije koja je pretežno povezana sa sojevima poreklom od divljih životinja. Ispitivane sekvence svrstane u genotip 5 formirale su jasno izdvojen klaster, pri čemu je PP493390 izdvojena u odnosu na preostale sekvence, što ukazuje na veću gensku diferencijaciju ili rekombinantno poreklo tog soja. Prikazani rezultati ukazuju na istovremenu cirkulaciju dva genotipa (genotipovi 4 i 5) u ispitivanoj populaciji divljih mesojeda u Srbiji.

Sekvence genotipa 5 (FoxCV) na filogenetskom stablu dodatno su razdvojene u pet klastera (1–5), pri čemu je uočeno njihovo grupisanje po geografskom poreklu (Slika 23). Sekvence iz Srbije poreklom od zlatnih šakala i lisice koje pripadaju genotipu 5 grupisale su se u okviru klastera 4 (PP493390, PP493394, PP493396-8). U ostalim klasterima dominiraju sekvence iz određenih regiona: klaster 1 je uglavnom sastavljen od izolata iz Norveške, Italije i Ujedinjenog Kraljevstva, dok klaster 2 obuhvata sekvence sa Svalbarda. Klaster 5 uključuje pretežno sekvence iz Kanade (Labrador i Njufaundlend), uz jedan soj iz Hrvatske, dok sekvence sa severozapada Kanade formiraju zaseban klaster 3, ali su pojedinačno prisutne i u svim ostalim klasterima osim klastera 4.



Slika 22. Filogenetsko stablo zasnovano na analizi Rep i Cap regiona genoma sojeva CanineCV iz Srbije (obeleženi crnim kvadratima) i drugih sojeva predstavnika genotipova (1-6) iz Banke gena. Rekombinantna sekvenca poreklom od zlatnog šakala (PP493390) je označena sivom bojom. Analiza je izvedena u MEGA 11 primenom Maximum Likelihood metode sa GTR+G+I modelom supstitucije i pouzdanošću od 1.000 replikata (*eng*. bootstrap). Prikazane su samo bootstrap vrednosti ≥ 50. Numeracija genotipova

primenjena je prema Benković i sar. (2025). Videti napomenu o razlikama u numeraciji u poglavlju Pregled literature.



Slika 23. Filogenetsko stablo zasnovano na analizi Rep i Cap regiona genoma sojeva genotipa 5 CanineCV (FoxCV) iz Srbije (obeleženi crnim trouglovima) i drugih sojeva genotipa 5 iz Banke gena izdvojenih u klastere označene brojevima. Analiza je izvedena u MEGA 11 primenom Maximum Likelihood metode sa GTR+G+I modelom supstitucije i

pouzdanošću od 1.000 replikata (*eng*. bootstrap). Prikazane su samo bootstrap vrednosti ≥ 50.

11. Analiza prisustva genskih rekombinacija u dobijenim nukleotidnim sekvencama parvovirusa i cirkovirusa divljih svinja i mesojeda

Svinjski parvovirus 2 (PPV2)

Analiza prisustva genskih rekombinacija u okviru kompletnog kapsidnog gena detektovanih sojeva PPV2 ukazala je na njihovo moguće prisustvo u sekvencama PX873578 i PX873577. Od ta dva nalaza, signal zabeležen analizom sekvence PX873578 bio je izraženiji budući da je bio podržan rezultatima algoritama RDP, BootScan, MaxChi, Chimaera i 3Seq, pri čemu su p-vrednosti bile niže od 0,001. Pregledom poravnanja sekvenci PPV2 utvrđen je izmenjen poredak nukleotida u regionu oko pozicije 772, pri čemu je početni deo sekvence pokazivao veću sličnost sa jednom, a ostatak gena sa drugom roditeljskom sekvencom. Kao glavna roditeljska sekvenca izdvaja se rumunski soj poreklom od divlje svinje JQ802046.1, dok drugi roditeljski soj nije mogao biti pouzdano definisan. Uprkos tome, zbog nejasno definisanih početnih i završnih tačaka rekombinacije u okviru sekvence kao i nepotpuno razjašnjenih roditeljskih odnosa, navedeni nalaz ukazuje na verodostojan rekombinacioni signal, ali ne omogućava potpuno pouzdano izvođenje zaključaka. Pored toga, u sekvenci PX873577 detektovan je dodatni potencijalni rekombinacioni signal u centralnom regionu genoma, približno između pozicija 940 i 1562, koji je pokazivao veću sličnost sa sekvencom KC701303.1, a distalni deo sa sekvencom KC701295.1 (obe poreklom od svinja sa teritorije Poljske). Navedeni nalaz je podržan rezultatima algoritama RDP, BootScan, MaxChi i SiScan. Ipak, zbog nejasno definisane početne, odnosno završne tačke, kao i mogućnosti nepotpunog skupa stvarnih roditeljskih sekvenci u poravnanju, ovaj nalaz ukazuje na moguću, ali ne i nedvosmisleno potvrđenu rekombinaciju.

U skupu sekvenci PPV2, koji je obuhvatao kompletan kapsidni gen, GARD analiza ukazala je na prisustvo jedne dominantne potencijalne prekidne tačke koja je poravnanje podelila na dva fragmenta koji se filogenetski ne podudaraju, pri čemu je signal koji ukazuje na rekombinaciju bio lokalizovan u 5′ delu regiona kapsidnog gena. Takav raspored ukazuje da su kod PPV2 rekombinantne sekvence pretežno u proksimalnom delu navedenog gena.

Svinjski parvovirus 7 (PPV7)

Ispitivanje prisustva rekombinacija u sekvencama kompletnog genoma sojeva PPV7 iz ove studije ukazalo je na prisustvo većeg broja potencijalnih rekombinantnih sekvenci raspoređenih duž nestrukturnog (NS1) i strukturnog (VP) dela genoma, pri čemu su detektovani signali pokazivali različit stepen pouzdanosti (Tabela 1).

Tabela 1. Genske rekombinacije detektovane među sekvencama PPV7 poreklom od divljih svinja iz Srbije

Rekombinantna sekvenca	Potencijalna glavna roditeljska sekvenca	Potencijalna sporedna roditeljska sekvenca	Rekombinantni region (nt) i lokalizacija u genomu	Metode koje su podržale događaj
PX857796	MW051671.1	PX857800	~1347–3360 (NS1+VP)	RDP, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq
PX857797	PX857799	PX857804	~673-833 (NS1) i ~1927-3643 (kraj NS1 + VP)	RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq
PX857798	KU563733.1	MN326252.1	~2019–3590 (VP)	RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq
	MN326252.1	MT758695.1	~1288–2018 (terminalni deo NS1)	RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan
PX857799	PX857800	PX857803	~888–1926 (NS1)	RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq
PX857800	PX857803	PX857796	~2258–2738 (VP)	RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq
PX857801	PX857803	KU563733	~2819-3539 (VP)	RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq
	MN326252.1	MT758695.1	~1404–2558 (NS1+početak VP)	RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan
	PX857798	MN326252.1	~736–1082 (NS1)	RDP, BootScan, MaxChi, SiScan i 3Seq
	MG543469.1	MT758696.1	~2559–2745 (VP)	RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, SiScan i 3Seq
PX857802	PX857796	PX857799	~2798–3641 (VP)	RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq
	MW051671.1	PX857801	~2559–2795 (početak VP)	RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq
PX857803	PX857800	MN326252.1	~3016–3276 (VP)	RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq
	MW051670.1	MN326249.1	~718–3015 (NS1+VP)	MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq
PX857804	MG543469.1	PX857798	~2438–3579 (VP)	RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq

Rekombinacije detektovane u ispitivanim sekvencama PPV7 primenom više metoda u programu RDP5. Prikazani su rekombinantni sojevi, potencijalni roditeljski sojevi, procenjeni intervali rekombinantnih regiona, lokalizacija događaja u genomu i metode koje potvrđuju prisustvo rekombinacije. U tumačenju rezultata uzeto je u obzir da region do pozicije 2016 odgovara genu NS1, dok region od 2195 do 3619 obuhvata region VP.

Najpouzdaniji rekombinacioni signali registrovani su kod sekvenci PX857802, PX857804 i PX857798. Kod sekvence PX857802, prisutsvo rekombinacija zabeleženo je unutar terminalnog dela kapsidnog regiona (približne pozicije 2798 do 3641) (Slika 24A).

Navedeni nalaz podržan je rezultatima svih primenjenih algoritama, odnosno metodama: RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan i 3Seq. Kao glavna i sporedna roditeljska sekvenca označene su PX857796 i PX857799 poreklom od divljih svinja iz ove studije. Sekvenca PX857802 je označena kao potencijalno rekombinantna, ali i u nešto užem segmentu VP gena približno između pozicija 2559 i 2795, koji je takođe bio podržan istom kompletnom kombinacijom metoda. Glavna i sporedna roditeljska sekvenca su označene kao MW051671.1 i PX857801.

U analizi rekombinacije sekvenci PPV7 detektovan je još jedan snažan rekombinacioni signal kod soja PX857804, lokalizovan približno između pozicija 2438 i 3579, koji je takođe bio potvrđen svim primenjenim metodama (RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan i 3Seq) i predstavlja jedan od najpouzdanijih rekombinacionih signala u analiziranom skupu (Slika 24B). Kao potencijalni glavni roditeljski soj izdvojen je MG543469.1 (svinja, Kina), a kao sporedni soj PX857798 iz ove studije. Filogenetska analiza regiona sa obe strane početne, odnosno završne tačke rekombinacije pokazala je promenu položaja rekombinantnog soja, koji se izvan navedenog segmenta grupiše sa kineskim sojem, a unutar njega sa srpskim sojem, što dodatno potvrđuje rekombinantno poreklo ove sekvence.

Kod soja PX857798 detektovan je rekombinacioni signal potvrđen primenom sedam metoda (RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan i 3Seq), sa početnom tačkom oko pozicije 2019 i regionom koji se proteže ka 3' kraju genoma, približno do pozicije 3590 kapsidnog gena (Slika 24C). Kao mogući roditeljski sojevi identifikovani su KU563733 (svinja, SAD) i MN326252 (svinja, Kina). Osim toga, u okviru sekvence soja PX857798, zabeleženo je postojanje rekombinacije pretežno u segmentu NS1 gena između pozicija ~1288-2018 i to pomoću svih navedeniih metoda izuzev 3Seq. Roditeljske sekvence koje se izdvajaju u ovom segmentu su MN326252.1 i MT758695.1.

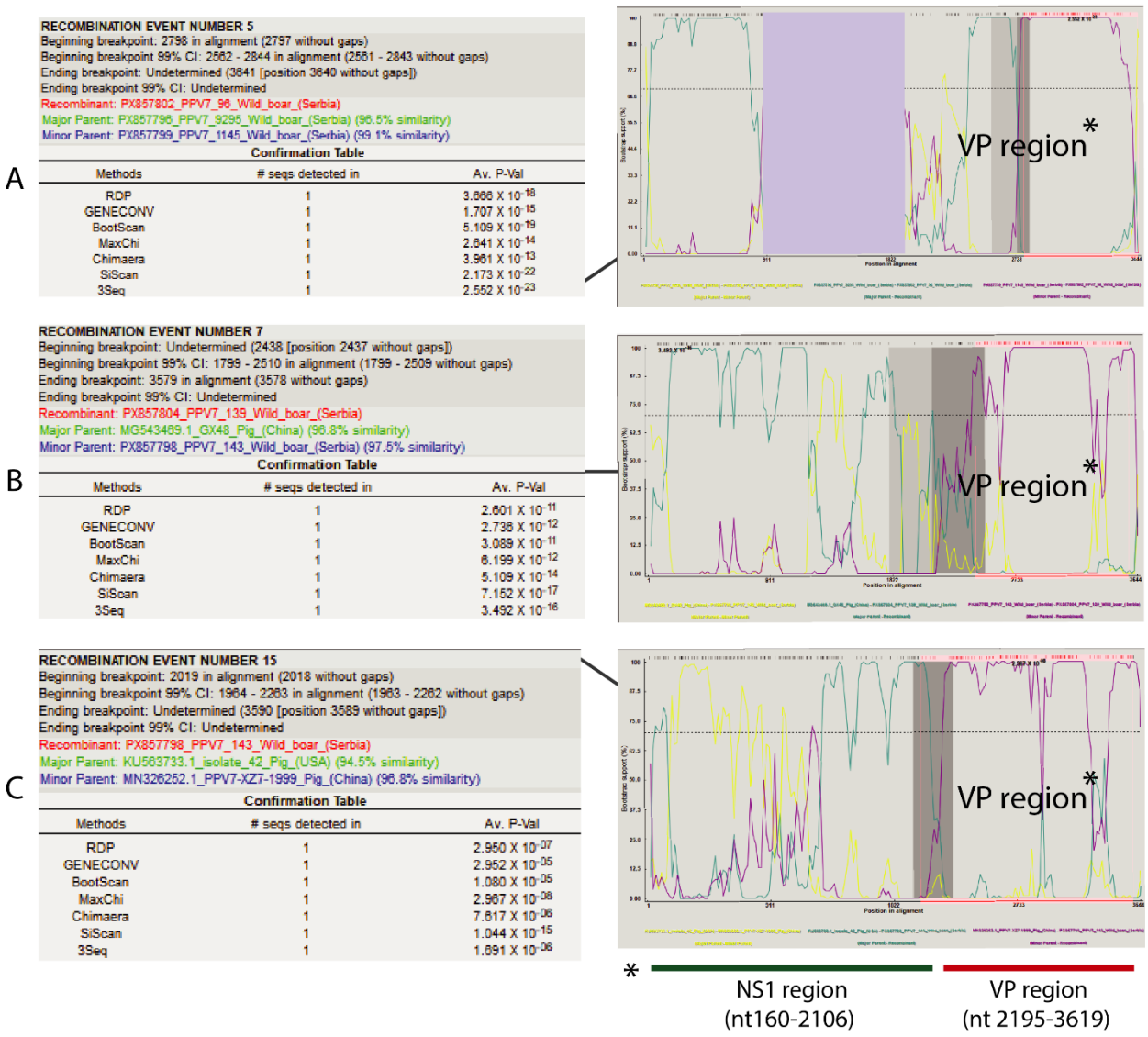
Analiza genskih rekombinacija sekvenci PPV7 ukazala je na prisustvo rekombinacionog signala u sekvenci soja PX857801 koji je podržan rezultatima algoritama RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan i 3Seq, pri čemu su sve odgovarajuće p-vrednosti bile niže od 0,001. Suspektni region lokalizovan je u VP genu, od pozicije 2819 do terminalnog dela poravnanja, odnosno približno do pozicije 3539. Manuelnim pregledom poravnanja potvrđeno je da veći deo genoma pokazuje sličnost sa sojem PX857803, dok je region od 2819. do približno 3539. pozicije pokazivao homologiju sa sekvencom KU563733.1 iz SAD. Iako tačna završna tačka rekombinantnog segmenta nije mogla biti precizno definisana, ukupni rezultati jasno ukazuju na prisustvo snažnog rekombinacionog signala. Osim toga, u okviru iste sekvence registrovan je rekombinantni segment koji obuhvata i NS1 i VP fragmente, približno između pozicija 1404 i 2558, i to na osnovu metoda RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera i SiScan, ali ne i metodom 3Seq. Kao potencijalne roditeljske sekvence navode se MN326252.1 i MT758695.1 poreklom od domaće, odnosno divlje svinje. Još jedan slabiji signal u okviru NS1 regiona genoma PX857801 potvrđen je metodama RDP, BootScan, MaxChi, SiScan i 3Seq na pozicijama ~736-1082 pri čemu su kao roditeljske sekvence označene PX857798 i MN326252.1 iz Kine. Pored toga, u okviru navedene sekvence izdvaja se još jedan rekombinantni segment u užem fragmentu VP gena (~2559–2745) podržan metodama RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, SiScan i 3Seq, dok potpora metode Chimaera nije registrovana.

Prisustvo rekombinacije zabeleženo je i u sekvenci soja PX857799 na osnovu rezultata algoritama RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan i 3Seq, pri čemu su sve odgovarajuće p-vrednosti bile niže od 0,001. Suspektni region je lokalizovan u centralnom delu genoma, u okviru NS1 gena, a približno između pozicija 888 i 1926. Najbliže roditeljske sekvence u analiziranom skupu predstavljaju PX857800 i PX857803, obe poreklom iz ove studije. Iako početna i prekidna tačka nisu mogle biti potpuno precizno definisane, rezultati ukazuju na prisustvo snažnog rekombinacionog signala.

U sekvenci soja PX857797 detektovano je prisustvo rekombinacije u NS1 i VP regionima (pozicije ~673-833 i ~1927-3643), što je podržano rezultatima algoritama RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan i 3Seq, pri čemu su odgovarajuće p-vrednosti bile niže od 0,001. Najverovatnije roditeljske sekvence su PX857799 (glavna) i PX857804 (sporedna), poreklom iz ove studije. Rezultati ukazuju na mozaičnu strukturu genoma soja PX857797 i na prisustvo kompleksnijih odnosa između sojeva PPV7 poreklom od divljih svinja iz ove studije.

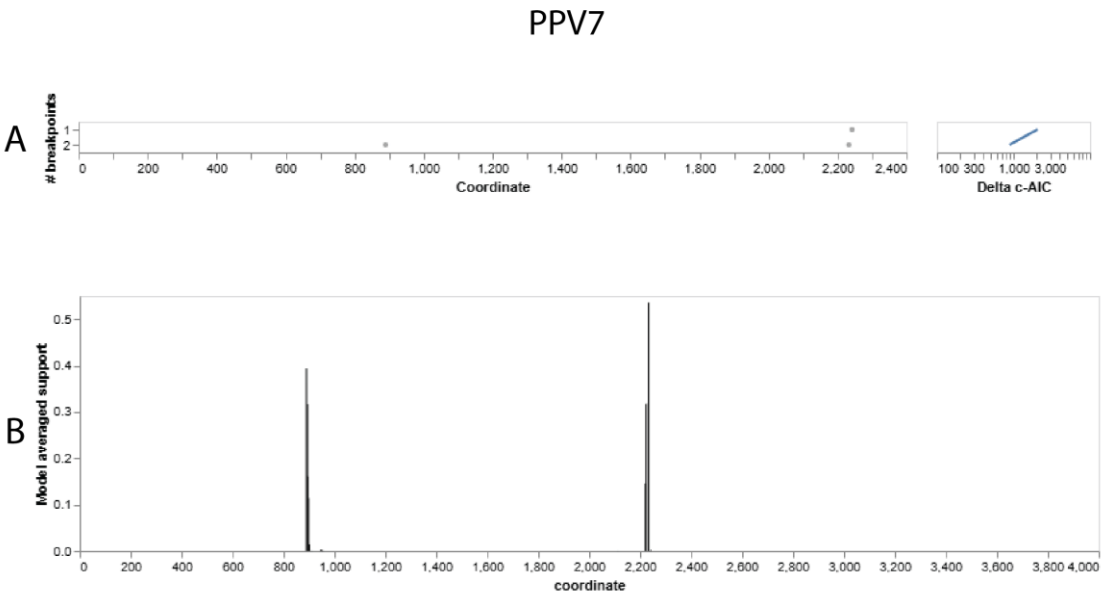
Kod sekvence PX857803, rekombinantna sekvenca je identifikovana u regionu približno između pozicija 3016 i 3276 u okviru kapsidnog dela genoma, a bio je podržan svim primenjenim metodama (RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan i 3Seq). Roditeljski sojevi su označeni kao PX857800 iz ove studije i MN326252.1 poreklom od svinje iz Kine. U okviru iste sekvence detektovan je još jedan signal koji ukazuje na prisustvo rekombinacije, i to u okviru većeg fragmenta genoma koji obuhvata i NS1 i VP segmente (~718-3015), što je podržano rezultatima MaxChi, Chimaera, SiScan i 3Seq. Roditeljske sekvence su određene kao MW051670.1 (SAD) i MN326249.1 (Kina), obe poreklom od domaćih svinja.

Kod sekvence PX857800 prisustvo rekombinacije lokalizovano je približno između pozicija 2258 i 2738 u poravnanju nukleotidnih sekvenci VP fragmenta, pri čemu je podržan svim primenjenim metodama (RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan i 3Seq). Posebno je važan BootScan, gde je prosečna bootstrap podrška iznosila približno 91,0%, što dodatno potvrđuje dobijeni rezultat. Kao glavni roditeljski soj označen je PX857803 iz ove studije, dok je kao najverovatniji sporedni roditeljski soj označen PX857796. Rezultati ispitivanja sekvence soja PX857796 ukazuju na prisustvo rekombinacije koja obuhvata širok region (pozicije ~1347–3360), a što je potvrđeno metodama RDP, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan i 3Seq, dok potpora metode GENECONV nije registrovana. Glavni roditeljski soj je označen kao MW051671.1 (svinja, SAD), dok je najverovatniji sporedni roditeljski soj PX857800 poreklom iz ove studije.



Slika 24. Reprezentativni primeri genskih rekombinacija detektovani u sekvencama kompletnog genoma PPV7 divljih svinja iz Srbije primenom RDP5. Levo su prikazani osnovni parametri događaja i potvrda primenom razlčitih metoda, a desno odgovarajući BootScan profili. (A): rekombinacije u okviru sekvence PX857802 (pozicije 2798–3641); (B): rekombinacije u okviru sekvence PX857804 (pozicije 2438–3579); (C): rekombinacije u okviru sekvence PX857798 (pozicije 2019–3590). U ispitivanim genomima NS1 region obuhvata pozicije do 2016, dok kapsidni (VP) region obuhvata pozicije 2195–3619. Svi prikazani primeri dominantno zahvataju kapsidni deo genoma.

Ispitivanjem sekvenci kompletnog genoma PPV7 primenom GARD analize potvrđeno je prisustvo izraženog filogenetskog nepodudaranja. U navedenoj analizi definisane su dve prekidne tačke, približno na pozicijama nukleotida 890 i 2233, čime je poravnanje sekvenci podeljeno na tri segmenta: 1–890, 891–2233 i 2234–3644 (Slika 25). Prva tačka nalazi se unutar NS1 regiona, dok je druga smeštena na prelazu između nestrukturnog i kapsidnog dela genoma, odnosno neposredno pre VP regiona. Ovakav nalaz ukazuje na to da prisustvo genskih rekombinacija PPV7 nije ograničeno na jedan uzak fragment, već odražava promenu topološkog odnosa između većih segmenata genoma. Istovremeno, položaj druge tačke ukazuje na to da je filogenetsko nepodudaranje posebno izraženo u delu genoma koji obuhvata početak kapsidnog regiona, što je u skladu sa rezultatima RDP analize, koja ukazuje na pretežno prisustvo rekombinantnih sekvenci u okviru VP delu genoma.



Slika 25. Rezultati GARD analize poravnatih sekvenci PPV7. (A): Pozicije prekidnih tačaka i promena (povećanje vrednosti) Δc-AIC između modela sa uzastopnim brojem prekidnih tačaka. (B): Položaj prekidnih tačaka podržan primenjenim modelima. Uočena su dva glavna signalna regiona, približno oko pozicija 900 i 2200, pri čemu je drugi lociran u području prelaza iz nestrukturnog NS1 regiona ka kapsidnom (VP) regionu.

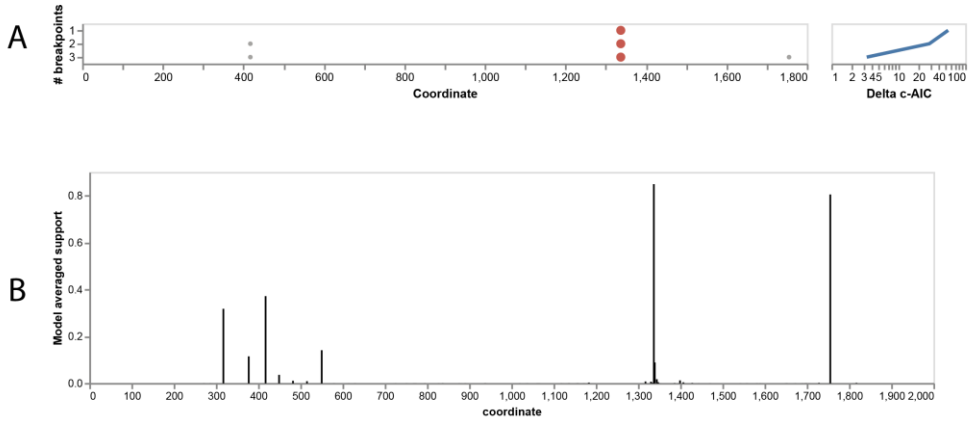
Svinjski cirkovirus 3 (PCV3)

Analiza rekombinacije sekvenci PCV3 je ukazala na postojanje dva rekombinaciona signala, pri čemu nijedan od njih nije zadovoljio kriterijume primenjene u ovom ispitivanju. Prvi signal je označio soj PX564522 kao moguću rekombinantnu sekvencu i bio je podržan rezultatima šest metoda (RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, 3Seq), a lokalizovan je približno između pozicija 630 i 1336. Glavna roditeljska sekvenca je KY924474.1 (svinja, Kina), a sporedna PX564523 iz ove studije. Drugi signal je označio soj

PX564521 kao moguću rekombinantnu sekvencu, uz podršku pet metoda (SiScan, 3Seq, Chimaera, BootScan, MaxChi), u segmentu približno između pozicija 384 i 1527. Glavna roditeljska sekvenca je MG014369.1 (svinja, Nemačka), a sporedna ponovo PX564523. Ni u jednom slučaju nije postignut zahtevani nivo verovatnoće u tri ili više nezavisnih metoda.

Oba signala su označena kao moguća posledica procesa različitog od rekombinacije, kao i kao moguća pogrešna identifikacija rekombinantne sekvence, pri čemu je u oba slučaja sekvenca PX564523 navedena kao verovatniji nosilac rekombinacije. Manuelni pregled poravnanja je ukazao da se sojevi PX564522 i PX564523 razlikuju na samo tri nukleotidne pozicije duž Rep gena i da su od pozicije 581 do kraja gena identični, iz čega sledi da se pozicije koje ih razlikuju nalaze izvan identifikovanog segmenta. U regionu do pozicije 309 sve sekvence iz ove studije su pokazale izraženu sličnost sa referentnim genomima, uz izuzetak sekvence PX564523, kod koje je većina razlika u tom regionu predstavljala jedinstvene supstitucije. Kvalitet hromatograma navedenog regiona bio je zadovoljavajući, čime je mogućnost artefakta u sekvenciranju isključena.

U skupu sekvenci PCV3, analiziranih na nivou kompletnog genoma, nakon izuzimanja divergentne sekvence MG372488.1 i sekvenci KY924473.1, KY924474.1 i KY924475.1, GARD je ukazao na prisustvo dve prekidne tačke sa najvišom podrškom, na pozicijama 1337 i 1755 (Slika 26). Navedene sekvence izuzete su iz GARD analize zbog izražene divergencije, koja je mogla uticati na procenu položaja prekidnih tačaka. Kako Rep gen obuhvata nukleotide 216–1106, a Cap gen počinje od pozicije 1336, prva navedena tačka odgovara prelazu iz Rep u Cap region genoma. Navedeni nalazi ukazuju na to da je rekombinacija bila prisutna u evolutivnoj istoriji analiziranih sekvenci PCV3, ali ne omogućavaju pripisivanje pojedinačnog rekombinacionog događaja sekvencama dobijenim u ovom ispitivanju.



Slika 26. Detekcija prekidnih tačaka rekombinacije u poravnanju kompletnih genoma PCV3 primenom programa GARD, nakon izuzimanja divergentnih sekvenci MG372488.1 i KY924473.1, KY924474.1 i KY924475.1; (A): Pozicije prekidnih tačaka i promena (povećanje vrednosti) Δc-AIC između modela sa uzastopnim brojem prekidnih tačaka. (B): Položaj prekidnih tačaka podržan primenjenim modelima. Uočena su dva glavna signalna regiona, na pozicijama 1337 i 1755, pri čemu je prvi lociran na prelazu iz Rep u Cap region genoma.

Cirkovirus pasa (CanineCV)

Analiza sekvenci CanineCV ukazala je na prisustvo rekombinacija kod ukupno sedam ispitivanih sojeva, i to kod sojeva, PP493393 i PP493395, koji pripadaju genotipu 4, kao i kod sojeva PP493390, PP493394, PP493396–PP493398, svrstanih u genotip 5, odnosno FoxCV grupu. Rekombinacioni signali detektovani su u dva segmenta genoma navedenih sojeva, a njihovo prisustvo potvrđeno je primenom više nezavisnih metoda uključenih u RDP5 analizu, pre svega BootScan, RDP i GENECONV metodama. Najveći broj rekombinantnih sojeva poticao je od zlatnih šakala, dok je samo jedan soj, PP493396, bio poreklom od crvene lisice. Na osnovu rezultata analize, kao najverovatnije roditeljske sekvence identifikovani su sojevi detektovani u okviru ove studije. Procenjene početne i završne tačke rekombinacije nalazile su se približno oko nukleotidnih pozicija 900 i 1400, odnosno u regionu prelaza između Rep i Cap gena i duž dela Cap gena. Ovakva lokalizacija ukazuje na to da rekombinantni fragmenti zahvataju funkcionalno značajan deo genoma, koji obuhvata granicu između replikaznog i kapsidnog regiona. Posebno se izdvaja soj PP493390, poreklom od zlatnog šakala, kod koga je utvrđena insercija između približno 500. i 1000. nukleotidne pozicije. Ovaj region obuhvata završni deo Rep gena i proksimalni deo Cap gena. Kao najverovatnije roditeljske sekvence identifikovani su predstavnici CanineCV genotipa 5 detektovani u okviru ove studije, što ukazuje na moguću razmenu genetičkog materijala između filogenetski bliskih varijanti cirkovirusa prisutnih kod divljih mesojeda.

Rezultati GARD analize dodatno su podržali nalaze dobijene RDP5 analizom, ukazujući na prisustvo potencijalne rekombinacione prekidne tačke približno oko nukleotidne pozicije 900. Ova pozicija odgovara regionu između Rep i Cap gena, odnosno prelazu između dva funkcionalno različita dela genoma. Za razliku od PCV3, kod koga je rekombinacioni signal bio lokalizovan unutar Rep regiona, kod CanineCV je potencijalna početna tačka rekombinacije bila povezana upravo sa zonom između replikaznog i kapsidnog segmenta. Takav nalaz može ukazivati na to da granica između funkcionalno različitih regiona genoma predstavlja potencijalno povoljno mesto za nastanak ili detekciju rekombinacionih događaja kod cirkovirusa divljih mesojeda.

Svinjski parvovirus 6 (PPV6), svinjski cirkovirus 2 (PCV2) i parvovirusi mesojeda (CPV2 i FPV)

Analiza prisustva rekombinacija u okviru sekvenci kompletnog kapsidnog gena PPV6 nije ukazala na njihovo prisustvo u sekvencama iz ovog istraživanja. Nijedna od primenjenih metoda (RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan i 3Seq) nije detektovala signal koji bi ispunio kriterijume interpretacije.

Analiza poravnatih sekvenci varijabilnog segmenta kapsida sojeva PCV2 nije ukazala na prisustvo genetičkih rekombinacija primenom metoda RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan i 3Seq. Dodatno, GARD analiza nije ukazala na prisustvo rekombinacija u ispitivanim sekvencama PPV6 i PCV2.

Analizom poravnatih sekvenci CPV2 i FPV nije utvrđeno prisustvo rekombinacija primenom zadatih metoda, odnosno RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan i 3Seq. U skupovima sekvenci CPV2 i FPV, koji su obuhvatali parcijalni VP2 gen, GARD je izdvojio po jednu potencijalnu prekidnu tačku, ali ti nalazi nisu bili potvrđeni RDP

analizom, te nisu interpretirani kao verodostojni dokazi rekombinacije. Kod CPV2 signal je bio lokalizovan u samom 5′ delu analiziranog VP2 fragmenta, dok je kod FPV prekidna tačka bila smeštena u 5′ polovini parcijalnog VP2 regiona. Ovi nalazi ukazuju na postojanje ograničene topološke neujednačenosti u okviru parcijalnih kapsidnih sekvenci, ali bez dovoljne metodološke potpore za zaključak o prisustvu genske rekombinacije.

DISKUSIJA

Parvovirusi i cirkovirusi divljih svinja

Rezultati ove disertacije ukazuju na to da populacija divljih svinja u Zapadnoj Bačkoj predstavlja značajan rezervoar više svinjskih parvovirusa i cirkovirusa. Posebno se ističe visok udeo jedinki pozitivnih na prisustvo PPV (61,1%), kao i izražena dominacija PPV2, koji je detektovan u 92,7% pozitivnih uzoraka. Pored PPV2, značajno je i prisustvo PPV7, što potvrđuje složenu strukturu cirkulacije parvovirusa u ispitivanoj populaciji. Ovi nalazi su delimično u skladu sa prethodnim istraživanjima sprovedenim na populacijama divljih svinja u Srbiji, ali istovremeno ukazuju i na primetne razlike u vrstama cirkulišućih virusa (Nišavić i sar., 2021; Jezdimirović i sar., 2024). U studiji Nišavića i sar. (2021), PPV3 i PPV1 bili su najzastupljeniji parvovirusi, dok je PPV2 bio ređe detektovan. Nasuprot tome, izrazita dominacija PPV2 u populaciji divljih svinja iz Zapadne Bačke ukazuje na regionalna odstupanja, koja mogu biti posledica razlika u gustini populacije divljih svinja, intenzitetu kontakta sa domaćim svinjama, kao i tipu i broju analiziranih uzoraka. Poseban značaj ima potpuno odsustvo PPV1 u ispitivanoj populaciji, s obzirom na to da su prethodna istraživanja u Srbiji ovaj virus dokazala kod 28,8% do 63,8% pozitivnih jedinki (Nišavić i sar., 2021; Jezdimirović i sar., 2024; Glišić i sar., 2025). Nalaz je potvrđen dvema nezavisnim metodama, real-time PCR-om na svim uzorcima i konvencionalnim multiplex PCR-om na svim pozitivnim uzorcima, pri čemu su korišćeni različiti setovi prajmera, čime se smanjuje verovatnoća metodološkog artefakta. Ipak, ne može se u potpunosti isključiti ni mogućnost nepodudaranja prajmera sa lokalnim varijantama PPV1, kao ni uticaj tipa uzorka i sezone uzorkovanja. Alternativno objašnjenje je da razlike odražavaju stvarne regionalne razlike u cirkulaciji, budući da se navedena istraživanja odnose na istočnu, jugoistočnu i zapadnu Srbiju, a ne na područje Bačke. Pored toga, poređenje dve primenjene metode pokazalo je da je konvencionalni multiplex PCR potvrdio 82,2% real-time PCR nalaza, pri čemu je stopa potvrde opadala sa opadanjem učestalosti pojedinih vrsta, od 92,2% za PPV2 do 60,0% za PPV6. Ovakav obrazac odgovara očekivanoj razlici u analitičkoj osetljivosti dveju metoda i objašnjava zašto se u literaturi prevalencije zasnovane na konvencionalnom PCR-u sistematski nalaze niže od onih dobijenih real-time PCR-om, što je i jedan od navedenih razloga varijabilnosti prevalencija između studija

Visoka učestalost mešovitih infekcija svinjskim parvovirusima (76,4%), sa preovlađujućim kombinacijama PPV2+PPV7 i PPV2+PPV3, uklapa se u koncept novih vrsta PPV kao virusa širokog tropizma, koji često cirkulišu zajedno izazivajući mešovite infekcije. Posebno je značajan nalaz da su sve utvrđene mešovite infekcije obuhvatale PPV2, koji je izostao u svega četiri uzorka i to isključivo kod pojedinačnih infekcija. Ovakav obrazac ukazuje na PPV2 kao dominantnu vrstu oko koje se formiraju mešovite infekcije u ispitivanoj populaciji, što je u skladu sa podacima o njegovom širokom tkivnom tropizmu i visokoj učestalosti u plućnom i limfoidnom tkivu. Pored toga, upravo su PPV2 i PPV7 u više radova identifikovani kao vrste sa izraženim potencijalom za rekombinaciju i genetičku varijabilnost (Vargas-Bermudez i sar., 2023; Komina i sar., 2025). U poređenju sa studijom Jezdimirović i sar. (2024), u kojoj je PPV1 detektovan u 56% ispitanih uzoraka poreklom od divljih svinja iz Južnobanatskog, Borskog i Zaječarskog okruga u Srbiji, ukupna prevalencija

PPV u ovoj disertaciji bila je slična. Međutim, detektovane su druge vrste parvovirusa, budući da su dominantno identifikovani PPV2 i PPV7. Ovakav nalaz sugeriše da su nove vrste parvovirusa u ekspanziji, ali i da njihovo prisustvo nije dovoljno ispitano u prethodnim istraživanjima sprovedenim u našoj zemlji.

U ovoj disertaciji prevalencija PCV2 u populaciji divljih svinja u Zapadnoj Bačkoj iznosila je 18,9%, dok je prevalencija PCV3 bila 13,3%, pri čemu nije utvrđena nijedna mešovita infekcija ovim virusima. Ovakav nalaz ukazuje na umerenu cirkulaciju oba cirkovirusa u ispitivanoj populaciji, ali i na znatno niži nivo njihove zastupljenosti u odnosu na istočnu Srbiju, gde su prevalencije procenjene na 59,2% za PCV2 i 49,0% za PCV3, uz visok udeo mešovitih infekcija (31,0%) (Šolaja i sar., 2025). S druge strane, rezultati ove disertacije bliži su novijim nalazima iz Južnog Banata, u kojima su zabeležene prevalencije PCV2 od 17,5% i PCV3 od 15,5%, uz vrlo nisku učestalost mešovitih infekcija (2,9%), nego ranijem istraživanju iz iste oblasti, u kojem je PCV2 bio detektovan kod 40,3% ispitanih jedinki, dok PCV3 nije bio potvrđen (Nišavić i sar., 2022; Nišavić i sar., 2024). Izostanak mešovitih infekcija PCV2 i PCV3 razlikuje se od nalaza iz drugih područja, gde se njihove stope kod divljih svinja kreću od 2,0% u Japanu (Kaneko i sar., 2023), preko 13,3–16% u Rusiji (Krasnikov i sar., 2024; Rykova i sar., 2026) i 22,3% u Kampanji (Amoroso i sar., 2021), do 29% u centralnoj Italiji (Melegari i sar., 2025), a najverovatnije odražava relativno nisku prevalenciju oba virusa u ispitivanoj populaciji, uz ograničenje koje proizlazi iz malog broja pozitivnih uzoraka. Odsustvo kliničkih i patoanatomskih promena kod divljih svinja pozitivnih na PCV u prethodnim istraživanjima iz Srbije, zajedno sa zaključkom da navedene infekcije u ovoj populaciji najčešće imaju subklinički tok, pruža osnov za opreznu interpretaciju nalaza iz Zapadne Bačke. U tom smislu, mešovite infekcije izazvane PPV2/PPV7 i PCV2/PCV3 utvrđene u ovoj disertaciji ne moraju nužno biti povezane sa vidljivom kliničkom patologijom, već najverovatnije odražavaju stabilnu enzootsku cirkulaciju ovih virusa u populaciji divljih svinja (Nišavić i sar., 2022; Nišavić i sar., 2024). Međutim, nalaz da su PCV2 i PCV3 detektovani u približno trećini uzoraka pozitivnih na prisustvo PPV značajan je u kontekstu studija sprovedenih na domaćim svinjama. U tim istraživanjima PPV2 je statistički povezan sa slučajevima PRDC i PCVAD kod jedinki pozitivnih na prisustvo PCV2, dok su PPV2, PPV3 i PPV7 često utvrđivani u okviru mešovitih infekcija sa PCV2, PCV3 i PRRSV (Lagan Tregaskis i sar., 2021; Kim i sar., 2022; Vargas-Bermudez i sar., 2023). Ovakvi nalazi ukazuju na mogućnost da se u populacijama divljih svinja održavaju kompleksne kombinacije virusa koji, nakon potencijalnog prenosa na domaće svinje i u uslovima farmskog stresa, mogu doprineti razvoju težih kliničkih sindroma.

Kada se rezultati ove disertacije uporede sa podacima iz Italije, Portugala, Rusije i Kine, gde su PCV2 i PCV3 kod divljih svinja često detektovani sa visokim prevalencijama, uz dominaciju genotipa PCV2d i prisustvo različitih klastera PCV3, uočava se da divlje svinje u različitim geografskim područjima predstavljaju značajan rezervoar cirkovirusa (Klaumann i sar., 2018a; Dei Giudici i sar., 2019; Amoroso i sar., 2021; Hu i sar., 2022; Krasnikov i sar., 2024; Yang i sar., 2024b; Faustini i sar., 2024; Almeida i sar., 2025a; Melegari i sar., 2025). Iako su prevalencije PCV2 i PCV3 u Zapadnoj Bačkoj niže od vrednosti zabeleženih u pojedinim navedenim zemljama, filogenetska povezanost detektovanih sojeva sa sojevima poreklom od domaćih svinja ukazuje na mogućnost transmisije sojeva između divlje i domaće populacije.

Podaci dobijeni u ovom istraživanju ne omogućavaju direktnu procenu kliničkog značaja otkrivenih mešovitih infekcija. Međutim, njihovo poređenje sa prethodnim istraživanjima ukazuje na visok stepen cirkulacije PPV2 i PPV7, uz manju učestanost nalaza PCV2 i PCV3 u populaciji divljih svinja Zapadne Bačke, što može predstavljati važnu kariku u regionalnoj cirkulaciji ovih virusa. Navedeni podatak je posebno značajan sa aspekta postojanja ekstenzivnih i dvorišnih sistema gajenja svinja, u kojima je nivo biosigurnosti često nezadovoljavajuć.

Filogenetska analiza kompletnog kapsidnog regiona PPV2, koji obuhvata gene za VP1 i VP2 proteine, pokazala je jasno razdvajanje analiziranih sekvenci u dve glavne filogenetske grupe. Svi sojevi poreklom od divljih svinja iz Srbije grupisani su isključivo unutar grupe 2, što podržava njihovu pripadnost evropskoj filogenetskoj liniji PPV2 i ukazuje na odsustvo posebne, geografski izdvojene linije u populaciji divljih svinja iz ispitivanog regiona (Nišavić i sar., 2021). Ovakav rezultat je u skladu sa nalazima iz drugih evropskih zemalja, gde su sojevi PPV2 poreklom od divljih i domaćih svinja često filogenetski bliski i grupisani zajedno sa sekvencama iz susednih država, uključujući Hrvatsku, Mađarsku, Poljsku i Rumuniju. Osim toga, evropski sojevi se jasno odvajaju od sojeva poreklom iz Azije, Afrike i Amerike (Cadar i sar., 2013a; Vargas-Bermudez i sar., 2023; Komina i sar., 2025). U ovom istraživanju nije zabeleženo formiranje zasebnog monofiletskog klastera koji bi obuhvatio isključivo sojeve poreklom iz Srbije. Naprotiv, analizirane sekvence bile su raspoređene u više manjih potklastera unutar grupe 2, zajedno sa sekvencama poreklom iz drugih evropskih zemalja. Navedeni nalaz potvrđuje genetičku heterogenost sojeva PPV2 u Srbiji i može ukazivati na kontinuiranu transmisiju virusa između populacija divljih i domaćih svinja na Balkanu i širom Evrope (Nišavić i sar., 2021; Komina i sar., 2025). Slični rezultati zabeleženi su u Rusiji, gde su sojevi PPV2 iz različitih regiona bili grupisani zajedno sa poljskim, rumunskim i kineskim sojevima poreklom od divljih ili domaćih svinja. Posebno je značajno da su pojedini ruski izolati pokazali najviši stepen sličnosti upravo sa srpskim sojem KC701306, što dodatno potvrđuje uključenost sojeva sa ovih prostora u širu evroazijsku grupu (Komina i sar., 2025). Analiza divergentnosti sekvenci PPV2 na osnovu kompletnog kapsidnog gena pokazala je da su ispitivani sojevi međusobno veoma srodni, sa p-distancama u rasponu od 0,0022 do 0,0390 i nukleotidnom sličnošću od 96,1 do 99,78%. Nasuprot tome, genetička udaljenost u odnosu na sekvence iz grupe 1 bila je veća, sa p-distancama do 0,0687 i nukleotidnom sličnošću do približno 93%. Ovakav nalaz je u skladu sa globalnim podacima o postojanju dve glavne filogenetske grupe PPV2, koje se na nivou VP1/VP2 regiona razlikuju za približno 4–8% (Saekhow i Ikeda, 2015; Lagan Tregaskis i sar., 2021; Vargas-Bermudez i sar., 2023). Dodatna analiza parcijalnog VP1 segmenta dužine 330 bp pokazala je isti obrazac grupisanja čime se dodatno potvrđuje visoka diskriminatorna vrednost VP1 regiona za razdvajanje glavnih filogenetskih grupa PPV2 (Saekhow i Ikeda, 2015; Lagan Tregaskis i sar., 2021). Slična filogenetska struktura opisana je kod domaćih i divljih svinja širom Evrope, uključujući Mađarsku, Poljsku i Italiju, gde se evropski sojevi uglavnom nalaze u grupi 2. Ova filogenetska grupa obuhvata sekvence iz više zemalja, bez jasne geografske segregacije, što ukazuje na široku rasprostranjenost i međusobnu povezanost evropskih sojeva PPV2 (Dei Giudici i sar., 2019; Igriczi i sar., 2024). Slično tome, studije iz Kine ukazuju na postojanje dve glavne linije PPV2, uz visok stepen rekombinacije između pojedinih regiona i klastera, što dodatno doprinosi genetičkoj raznolikosti ovog virusa na globalnom nivou (Sun i sar., 2015). U poređenju sa rezultatima drugih autora iz Srbije, koji

su tokom prethodnih godina analizirali parcijalne VP1 sekvence sojeva PPV2 detektovanih kod divljih svinja, rezultati ove disertacije dodatno ukazuju na odsustvo izolovane evolutivne linije karakteristične isključivo za Srbiju. Prethodna istraživanja pokazala su visok stepen sličnosti između sojeva poreklom od domaćih i divljih svinja iz Srbije, Hrvatske, Mađarske i Rumunije, sa vrednostima od približno 98 do 100%, ali i prisustvo više varijabilnih mesta koja ukazuju na regionalnu dinamiku cirkulacije virusa (Cadar i sar., 2013b; Nišavić i sar., 2021). U tom pogledu, nalazi ove disertacije su u skladu sa pretpostavkom da se sojevi PPV2 iz Srbije ne razvijaju kao zasebna, geografski izolovana linija što može biti posledica kretanja divljih svinja, kontakta između divljih i domaćih populacija, kao i prometa domaćih svinja ili proizvoda poreklom od svinja. S druge strane, istraživanja sprovedena u Južnoj Africi i Aziji pokazala su niže vrednosti sličnosti između lokalnih i evropskih sojeva PPV2, najčešće u rasponu od približno 94 do 97%, uz jasnije filogenetsko razdvajanje između kontinenata (Xiao i sar., 2013a; Afolabi i sar., 2019). Takvi nalazi podržavaju pretpostavku da se evolutivna dinamika PPV2 odvija pod uticajem regionalnih populacionih i epizootioloških faktora, uz mogućnost povremenog unošenja novih varijanti virusa posredstvom međunarodnog prometa životinja ili proizvoda životinjskog porekla. Evolutivnu plastičnost PPV2 dodatno potvrđuju podaci o visokoj stopi mutacija, uporedivoj sa pojedinim RNK virusima, čestim rekombinacijama unutar VP regiona i pozitivnoj selekciji na pojedinim mestima kapsidnog proteina. Ovi procesi mogu doprineti bržoj adaptaciji virusa na nove uslove, uključujući promene u strukturi populacija domaćina i imunološki pritisak (Cadar i sar., 2012; Cadar i sar., 2013b; Streck i sar., 2015).

Analiza prisustva genskih rekombinacija u okviru kompletnog kapsidnog gena detektovanih sojeva PPV2 nadovezuje se na prethodna istraživanja koja ukazuju na izraženu sklonost ovog virusa ka razmeni genetičkog materijala u VP regionu. Autori iz centralne Evrope pokazali su da evropski sojevi PPV2 često nose rekombinacione signale pri čemu su takvi obrasci zabeleženi unutar i između filogenetskih grupa, između geografskih područja, kao i između sojeva poreklom od domaćih i divljih svinja (Cadar i sar., 2012; Cadar i sar., 2013b; Vargas-Bermudez i sar., 2023). U tom smislu, nalaz da sekvenca PX873578 pokazuje izražen mozaik rasporeda nukleotida, pri čemu je proksimalni deo VP gena sličniji rumunskom soju JQ802046.1 poreklom od divlje svinje, u skladu je sa pretpostavkom o značaju navedenog regiona genoma (Cadar i sar., 2012; Cadar i sar., 2013b). Podudarnost ovog nalaza sa prekidnom tačkom detektovanom GARD metodom u 5′ delu kapsidnog gena, takođe podržava značaj proksimalnog segmenta VP regiona kao moguće zone učestale rekombinacije kod PPV2. Slični obrasci već su opisani u evropskim ispitivanjima, ali bez detaljnije analize sojeva poreklom iz Srbije i neposrednog okruženja (Cadar i sar., 2013a; Vargas-Bermudez i sar., 2023). Osim toga, nalaz jedne dominantne prekidne tačke, detektovane na nivou celog ispitivanog skupa sekvenci PPV2, važan je jer sugeriše da rekombinantni fragmenti kod ovog virusa nisu nužno nasumično raspoređeni duž genske sekvence, već da se mogu ponavljati u određenim delovima kapsidnog gena. Ovakav nalaz je u skladu sa tvrdnjama pojedinih autora da PPV2 pokazuje evolutivnu dinamiku sličnu RNK virusima, uključujući i česte rekombinacije u VP regionu (Cadar i sar., 2012; Cadar i sar., 2013a). Iako dobijeni rezultati ne omogućavaju uvek potpunu rekonstrukciju roditeljskih linija, činjenica da je jedan od potencijalnih roditeljskih sojeva sekvence PX873578 filogenetski najbliži rumunskom soju poreklom od divlje svinje, dok sekvenca PX873577 pokazuje značajnu srodnost sa poljskim sojevima poreklom od domaćih svinja, dodatno podržava pretpostavku o regionalnoj povezanosti sojeva PPV2 iz

domaćih i divljih populacija svinja, naročito na prostoru centralne Evrope i zapadnog Balkana (Cadar i sar., 2013b; Dei Giudici i sar., 2019; Vargas-Bermudez i sar., 2023). Slična pojava opisana je i kod drugih svinjskih virusa, kao što su PRRSV-2 i PEDV, kod kojih se rekombinantni fragmenti često lokalizuju u funkcionalno značajnim regionima genoma. Kod PRRSV-2 su navedena mesta najčešće povezana sa genima NSP2 i GP5, dok su kod PEDV prekidne tačke opisane u S genu i na spoju ORF1 i S fragmenata (Guo i sar., 2021; Vargas-Bermudez i sar., 2023; Zhang i sar., 2023; Zhang i sar., 2024; Guo i sar., 2024). U analiziranom skupu sekvenci PPV2, ovaj nalaz se prvenstveno odnosi na 5′ deo kapsidnog gena, što može biti značajno za antigensku raznovrsnost i adaptivni potencijal virusa. Promene u kapsidnim proteinima parvovirusa, naročito u VP2 regionu, mogu značajno uticati na vezivanje antitela, odnosno prepoznavanje epitopa i imunski odgovor domaćina. Kod CPV2, koji je srodan drugim parvovirusima sisara, pokazano je da mali broj mutacija u VP2 genu može dovesti do neuspešne neutralizacije monoklonskim antitelima (López-Astacio i sar., 2023). Uprkos tome, nema direktnih podataka o antigenskim svojstvima rekombinantnih sojeva PPV2 i može se zaključiti samo da rekombinacije u kapsidnom regionu potencijalno mogu menjati antigenska svojstva ovog virusa, međutim konkretan efekat zavisi od položaja prekidnih tačaka i zahvaćenih fragmenata kapsidnih domena.

Filogenetska analiza kompletnog kapsidnog gena PPV6 u ovoj studiji pokazala je razdvajanje sekvenci u dve glavne grupe. Svi srpski sojevi poreklom od divljih svinja pripadali su grupi 1, zajedno sa evropskim, ruskim i severnoameričkim izolatima, dok je grupa 2 obuhvatala isključivo kineske sekvence. Ovakav raspored ukazuje na razdvajanje evroazijsko-severnoameričke i istočnoazijske linije PPV6, međutim bez jasne geografske segregacije unutar grupe 1 (Park i sar., 2021; Komina i sar., 2025). Detektovani sojevi PPV6 iz Srbije nisu formirali zaseban monofiletski klaster, već su bili raspoređeni u više manjih potklastera, blisko povezanih sa izolatom iz ruske divlje svinje, poljskim sojevima poreklom od domaćih svinja i sojevima divljih svinja iz Kanade. Ovakav rezultat ukazuje na to da PPV6 cirkuliše u filogenetski blisko povezanim linijama koje obuhvataju sojeve poreklom od divljih i domaćih svinja iz različitih geografskih područja, što je već sugerisano u rezultatima analiza VP1/VP2 gena PPV6 iz Poljske, Rusije i Severne Amerike (Cui i sar., 2017b; Komina i sar., 2025). Posmatrano uz veoma niske vrednosti p-distanci unutar grupe, ovakav nalaz ukazuje da su sojevi PPV6 genetički konzervirani u okviru navedenog fragmenta, što se uklapa u prethodne nalaze iz Rusije i Južne Koreje. Prema tim istraživanjima, PPV6 pokazuje visoku homogenost nukleotidnih sekvenci unutar vrste, ali istovremeno cirkuliše kroz više užih filogenetskih grana koje obuhvataju sojeve iz različitih geografskih područja i populacija domaćina (Park i sar., 2021; Komina i sar., 2025). Ključan nalaz ove analize je izostanak rekombinacionih signala u kompletnom kapsidnom genu PPV6, budući da nijedan od primenjenih algoritama, nije detektovao događaje koji bi zadovoljili kriterijume za potvrdu prisustva rekombinacije. Ovakav rezultat razlikuje PPV6 od PPV2 i pojedinih drugih jednolančanih DNK virusa, kod kojih je rekombinacija češća i predstavlja važan mehanizam evolutivne dinamike (Cadar i sar., 2013b; Vargas-Bermudez i sar., 2023). Istovremeno, ovaj nalaz je u skladu sa raspoloživim podacima da kod PPV6, za razliku od PPV7 u Koreji, do sada nisu zabeleženi konzistentno rekombinantni sojevi. Umesto toga, na evoluciju PPV6 najverovatnije utiče akumulacija tačkastih mutacija i relativno sporo razdvajanje na dve glavne filogenetske grupe (Park i sar., 2021; Komina i sar., 2025). Uprkos tome, ovaj rezultat treba tumačiti uz određena metodološka ograničenja. Broj dostupnih kompletnih kapsidnih sekvenci PPV6 na globalnom nivou i

dalje je nedovoljan, a većina potiče iz manjeg broja zemalja, pre svega Rusije, Kine, Poljske i Kanade. Zbog toga referentni panel sekvenci može biti nedovoljan za otkrivanje kompleksnih, starih ili slabo zastupljenih rekombinacionih događaja. Prema tome, odsustvo rekombinacionih signala u sprovedenoj analizi ne isključuje u potpunosti mogućnost rekombinacije kod PPV6, već sugeriše da ona nije česta ili da nije detektabilna u regionima i sekvencama obuhvaćenim trenutnim skupom podataka (Cui i sar., 2017a; Komina i sar., 2025). Rezultati ove disertacije proširuju postojeća saznanja uključivanjem sojeva PPV6 iz Srbije u isti široko rasprostranjeni filogenetski klaster (Park i sar., 2021; Komina i sar., 2025). Time se pokazuje da Zapadni Balkan učestvuje u cirkulaciji globalno zastupljene linije PPV6, bez vidljivog formiranja lokalno ograničenih sojeva virusa.

Bioinformatička analiza kompletnog genoma sojeva PPV7 poreklom od divljih svinja u Srbiji pokazala je da se svi analizirani sojevi nalaze unutar grupe 2, zajedno sa ruskim, kolumbijskim i kineskim izolatima. Ovakav raspored ukazuje na široku filogenetsku povezanost sojeva ovog virusa različitog geografskog porekla. Istovremeno, izražene razlike u poretku nukleotidnih sekvenci potvrđene p-distancama u skladu su sa nalazima iz drugih evropskih i azijskih populacija divljih i domaćih svinja (Vargas-Bermudez i sar., 2023; Igriczi i sar., 2024; Komina i sar., 2025). Slične rezultate pokazuju i rezultati ispitivanja sojeva poreklom od divljih i domaćih svinja iz Italije, Mađarske, Rusije, Kine i Kolumbije, gde su sojevi PPV7 iz različitih regiona često blisko povezani bez obzira na poreklo domaćina (Park i sar., 2021; Vargas-Bermudez i sar., 2023; Dei Giudici i sar., 2024). Posebno je značajan nalaz brojnih sojeva iz Srbije kod kojih su rekombinacije zabeležene duž kompletnog genoma PPV7, kako u nestrukturnom NS1 regionu, tako i u strukturnom VP, odnosno kapsidnom genu. Pojedini sojevi iz ove studije pokazuju složenu mozaičnu strukturu što je potvrđeno primenom više metoda za detekciju, što ujedno smanjuje verovatnoću greške (Park i sar., 2021; Wen i sar., 2022; Dei Giudici i sar., 2024). Prisustvo učestalih rekombinacija opisano je i u italijanskim populacijama, gde je do 80% sekvenci NS1 regiona pokazalo rekombinantno poreklo, kao i u studijama iz Kine, Koreje i Kolumbije, u kojima su identifikovane brojne rekombinantne varijante sa roditeljskim sekvencama iz različitih geografskih područja ili populacija domaćina (Park i sar., 2021; Vargas-Bermudez i sar., 2023; Lyu i sar., 2023; Dei Giudici i sar., 2024). Dobijeni rezultati GARD analize dodatno ukazuju na prisustvo izraženog filogenetskog nepodudaranja, sa dve prekidne tačke koje dele genom PPV7 na tri segmenta. Prva prekidna tačka nalazi se unutar NS1 regiona, dok je druga pozicionirana na prelazu ka VP genu, što ukazuje na to da rekombinacioni događaji kod PPV7 nisu ograničeni na uzak fragment, već mogu zahvatiti veće delove genoma, uključujući i početak kapsidnog regiona. Navedeni deo genoma može biti značajan za antigenska svojstva virusa, budući da kapsidni proteini imaju ključnu ulogu u interakciji virusa sa ćelijama domaćina, odnosno sa imunskim sistemom (Wen i sar., 2022; Dei Giudici i sar., 2024). Mozaična struktura genoma sojeva PPV7 pokazuje da evolucija ovog virusa nije rezultat samo lokalne cirkulacije, već verovatno uključuje i regionalno mešanje virusnih linija poreklom iz populacija divljih i domaćih svinja. Pored toga, filogenetska bliskost pojedinih srpskih sojeva sa ruskim ili kineskim izolatima ukazuje na mogućnost postojanja širih filogeografskih veza, koje mogu doprineti nastanku novih varijanti kroz rekombinaciju (Vargas-Bermudez i sar., 2023; Komina i sar., 2025). Slični obrasci filogenetskog preklapanja opisani su i kod sojeva PPV7 iz Mađarske, Italije i Koreje, gde je detektovano više podtipova, uz visok stepen međusobne razmene genetičkog materijala (Park i sar., 2021; Igriczi i sar., 2024; Dei Giudici i sar., 2024). Posebno je

značajno prisustvo insercija i delecija u kapsidnom genu PPV7, koje mogu dovesti do promena u dužini Cap proteina za nekoliko aminokiselina. Ovakve promene opisane su kod sojeva iz Kine, Koreje i Kolumbije, a njihovo prisustvo u različitim geografskim područjima ukazuje na to da predstavljaju šire rasprostranjen oblik varijabilnosti PPV7 (Wang i sar., 2019b; Vargas-Bermudez i sar., 2023). Evolutivna dinamika PPV7 odlikuje se visokim stopama mutacija, koje se ubrajaju među najviše opisane kod novih vrsta PPV, a osim toga, kapsidni protein pokazuje izraženu varijabilnost, što može imati uticaj na antigenska svojstva virusa i potencijalno doprineti izbegavanju imunskog odgovora domaćina (Wang i sar., 2019b; Wang i sar., 2020). U poređenju sa drugim novim vrstama PPV, kod kojih je rekombinacija ređa ili ograničenija na pojedine genske regione, kod PPV7 ona predstavlja jedan od važnih mehanizama evolutivne dinamike, zahvatajući i NS1 i VP gene. Tome u prilog govore nalazi iz Italije, gde je više od tri četvrtine analiziranih sekvenci pokazalo rekombinantno poreklo (Dei Giudici i sar., 2024). Slično tome, studije iz Kine pokazuju da se genska rekombinacija kod PPV7 najčešće odvija između različitih podtipova unutar istog regiona, ali da povremeno može uključivati i roditeljske linije iz udaljenih geografskih područja, čime se dodatno povećava diverzitet virusa (Zhang i sar., 2022b; Lyu i sar., 2023). Sojevi PPV7 iz Srbije pripadaju širem evroazijsko-američkom filogenetskom klasteru, bez jasnog formiranja lokalno ograničene linije. Ovakav nalaz može ukazivati na povezanost cirkulacije PPV7 u populacijama divljih i domaćih svinja, kao i na mogućnost unošenja i razmene virusnih linija putem prirodnog kretanja životinja ili prometa domaćih svinja. Slični obrasci opisani su i kod PCV2 i PCV3, kod kojih se dominantni genotipovi mogu prenositi između divljih i domaćih populacija bez jasnih geografskih barijera (Faustini i sar., 2024; Komina i sar., 2025; Šolaja i sar., 2025). Pored toga, nalazi u ovoj studiji o čestim mešovitim infekcijama PPV7 sa PCV2 i PCV3, dokumentovani su i u Italiji, Kini i Rusiji i dodatno ukazuju na postojanje kompleksnih odnosa među različitim virusima u različitim populacijama svinja (Dei Giudici i sar., 2024; Komina i sar., 2025). Iako prisustvo mešovitih infekcija ukazuje na mogućnost međusobnog uticaja virusa na patogenezu, širenje ili održavanje infekcije u populaciji, njihov klinički značaj za sada ne može biti direktno procenjen bez dodatnih eksperimentalnih i terenskih istraživanja. Sve navedeno ukazuje na to da divlje svinje ne treba posmatrati samo kao pasivni rezervoar PPV7, već kao potencijalno važne domaćine u kojima se održavaju različite linije virusa uz povećanu mogućnost genskih rekombinacija. Takve varijante mogu imati epizootiološki značaj za svinjarstvo, međutim njihova uloga u kliničkoj patologiji svinja mora biti dodatno ispitana.

U okviru ove studije, analiza varijabilnog segmenta ORF2 kapsidnog gena PCV2 nije ukazala na prisustvo genskih rekombinacija, imajući u vidu da nijedna od metoda primenjenih u okviru RDP softvera nije detektovala signal koji bi ispunio unapred definisane kriterijume interpretacije. Ovakav nalaz ukazuje na to da se detektovane razlike među sekvencama ispitivanih sojeva poreklom od divljih svinja iz Srbije pre svega mogu pripisati akumulaciji tačkastih mutacija i razdvajanju na genotipove PCV2b i PCV2d, a ne skorijim rekombinacionim događajima u analiziranom regionu ORF2. Ovakav rezultat je u skladu sa podacima iz dostupnih studija u kojima se rekombinantne sekvence PCV2 sistematski identifikuju i uklanjaju iz skupova podataka pre rekonstrukcije filogenetskih stabala. Pri tome se rekombinacioni događaji prihvataju samo kada ih potvrdi više nezavisnih metoda, uz stroge pragove značajnosti, kako bi se smanjila mogućnost lažno pozitivnih nalaza (Franzo i sar., 2020; Melegari i sar., 2025). Istovremeno, odsustvo rekombinacionog signala u ograničenom segmentu ORF2 ne može se tumačiti kao dokaz da

rekombinacija nema ulogu u evoluciji PCV2 u Srbiji. Ovaj nalaz ukazuje na to da u posmatranom skupu sekvenci ograničene dužine nema jasno detektabilnih rekombinantnih varijanti virusa. To se razlikuje od studija koje su, na većim skupovima sekvenci i analizom celog ORF2 regiona ili kompletnog genoma, pokazale učestale rekombinacije kako unutar, tako i između genotipova navedenog virusa, uključujući događaje između sojeva poreklom od divljih i domaćih svinja (Cadar i sar., 2012; Franzo i sar., 2020). Važno je napomenuti da je u rumunskoj populaciji divljih svinja, upravo na osnovu analize ORF2 segmenta genoma PCV2, detektovano više prirodnih rekombinacija između PCV2a i PCV2b. Prekidne tačke u sekvencama rekombinantnih sojeva obuhvatale su regione kapsida koji učestvuju u formiranju epitopa, ali bez značajnih promena u sastavu i rasporedu aminokiselina. Iz navedenog se može zaključiti da rekombinacija može doprineti genetičkoj raznovrsnosti i premeštanju postojećih varijanti između utvrđenih genotipova, čak i kada neposredan efekat na strukturu epitopa nije izražen (Cadar i sar., 2012). Nasuprot tome, u novijim italijanskim studijama, koje su obuhvatile veliki broj kompletnih ORF2 sekvenci poreklom od domaćih i divljih svinja, rekombinacije su takođe proveravane primenom RDP softvera, pri čemu su detektovani rekombinantni događaji uklanjani iz daljih filogenetskih analiza. Kod populacija u kojima izrazito dominira PCV2d, kao što su sojevi iz Sardinije, u analiziranim skupovima sekvenci nije pronađen dokaz postojanju rekombinantnih sojeva. Takav nalaz sugeriše da se u određenim prirodnim uslovima evolucija PCV2 može odvijati pretežno kroz divergenciju i održavanje linija u okviru genotipa, bez izraženih rekombinacionih događaja (Dei Giudici i sar., 2019; Dei Giudici i sar., 2023). Činjenica da su sekvence iz ovog ispitivanja jasno razdvojene u PCV2b i PCV2d klastere, uz visoke bootstrap vrednosti i bez detektovanih rekombinacionih signala u analiziranom segmentu kapsidnog gena, ukazuje na to da posmatrana genetička raznovrsnost najverovatnije odražava cirkulaciju već formiranih genotipskih linija. Ovaj nalaz je u skladu sa prethodnim podacima o prisustvu PCV2b i naročito PCV2d u populacijama divljih i domaćih svinja u Srbiji i regionu (Nišavić i sar., 2022; Nišavić i sar., 2024). Budući da su u drugim evropskim studijama primenom istog ORF2 markera uspešno detektovani različiti genotipovi PCV2 u populacijama divljih i domaćih svinja, kao i rekombinantne varijante kada su one bile zastupljene u analiziranom skupu, negativan nalaz prisustva rekombinacija u ovoj analizi najverovatnije ukazuje na odsustvo jasno detektabilnih rekombinantnih signala u ispitivanom fragmentu ORF2 regiona (Cadar i sar., 2012; Rudova i sar., 2022). Naime, analiziran je samo varijabilni deo ORF2, broj sekvenci dobijenih u ovoj studiji je mali, a referentni skup iz Banke gena, iako reprezentativan za genotipove PCV2a–PCV2h, ne mora obuhvatati sve potencijalne roditeljske linije, posebno lokalne varijante virusa. Stoga se ne može isključiti mogućnost da rekombinacioni događaji izvan analiziranog regiona, uključujući ORF1 ili nepotpuno obuhvaćene delove kapsidnog gena, ostanu neotkriveni (Franzo i sar., 2020; Melegari i sar., 2025). Dobijeni rezultati ukazuju na cirkulaciju već formiranih varijanti virusa u okviru postojećih genotipova, što je opisano i u Italiji, Rusiji i drugim zemljama, gde se sekvence poreklom od divljih svinja filogenetski uklapaju u klastere domaćih sojeva, bez formiranja jasno izdvojenih rekombinantnih linija (Franzo i sar., 2020; Hu i sar., 2022; Krasnikov i sar., 2024). Navedeni nalazi su u skladu sa činjenicom da rekombinacija predstavlja važan, ali ne i dominantan mehanizam evolucije PCV2.

Analiza sekvenci sojeva PCV3 detektovanih u populaciji divljih svinja iz Srbije pokazuje da iste pripadaju jasno definisanom PCV3-a genotipu, pri čemu maksimalna p-

distanca na nivou kompletnog genoma (2,96%) i ORF2 regiona (3,26%) ostaje ispod predloženih pragova za varijabilnost unutar genotipa (Franzo i sar., 2020), a što je u skladu sa nalazima iz drugih evropskih i svetskih studija (Fux i sar., 2018; Franzo i sar., 2018; Igriczi i sar., 2022). Osim toga, filogenetska analiza potvrđuje da analizirane sekvence iz Srbije ne formiraju zaseban lokalni klaster već da su raspoređene u više skupova unutar PCV3-a, što ukazuje na istovremenu cirkulaciju više linija virusa u populaciji divljih svinja, kao što je opisano i u Italiji, Mađarskoj, Poljskoj i drugim evropskim zemljama gde se sojevi iz divljih i domaćih svinja često filogenetski preklapaju bez jasnih razdvajanja prema poreklu (Fanelli i sar., 2022; Igriczi i sar., 2022; Frant i sar., 2024). Visoko divergentna kineska sekvenca MG372488.1 koja se na filogenetskim stablima pojavljuje kao duga bazalna grana podržava koncept postojanja genotipa PCV3-b, ali s obzirom na to da je reč o jednoj sekvenci, trenutni podaci ukazuju da je PCV3-a jedini globalno potvrđen genotip (Fux i sar., 2018; Franzo i sar., 2020). Nizak nivo varijabilnosti među sekvencama iz Srbije dodatno potvrđuje stabilnost ovog virusa u okviru lokalnih populacija divljih svinja. Analiza prisustva genskih rekombinacija ukazala je na dva potencijalna rekombinaciona signala, od kojih nijedan nije zadovoljio kriterijume prihvatanja primenjene u ovom ispitivanju. Oba signala su označena kao moguća posledica procesa različitog od rekombinacije, kao i kao moguća pogrešna identifikacija rekombinantne sekvence, pri čemu je u oba slučaja ista sekvenca iz ove studije navedena kao sporedni roditelj sa potpunom sličnošću. Navedeno je očekivano u skupovima sa malim brojem blisko srodnih sekvenci, u kojima visok stepen međusobne sličnosti otežava razlikovanje stvarnih rekombinacionih događaja od filogenetskog šuma. Dobijeni rezultati stoga ukazuju na prisustvo rekombinacije u evolutivnoj istoriji analiziranih sekvenci PCV3, ali ne omogućavaju pripisivanje pojedinačnog rekombinacionog događaja sojevima detektovanim u ovom ispitivanju. Odsustvo signala koji zadovoljavaju kriterijume prihvatanja ukazuje na to da rekombinacija kod PCV3 u analiziranom skupu nije dominantan mehanizam oblikovanja ukupne populacione strukture virusa. Navedeni rezultati su u skladu sa većinom evropskih studija, u kojima nisu detektovane česte niti stabilno održavane rekombinantne linije PCV3 (Dei Giudici i sar., 2020; Almeida i sar., 2025b). GARD analiza dodatno je ukazala na prisustvo potencijalne dve prekidne tačke sa najvišom podrškom, na pozicijama 1337 i 1755, pri čemu prva odgovara prelazu iz Rep u Cap region genoma, što sugeriše da se rekombinacioni signal u analiziranom skupu sekvenci pretežno vezuje za granicu između dva glavna otvorena okvira čitanja. Slični nalazi opisani su u analizama iz Italije, Kine i SAD, gde su retki rekombinacioni događaji kod PCV3 uglavnom lokalizovani van glavnih epitopskih domena kapsidnog proteina (Li i sar., 2018; Wang Y. i sar., 2020). Smatra se da evoluciju PCV3 u prijemčivoj populaciji dominantno oblikuju tačkaste mutacije, uz povremenu pojavu genskih rekombinacija (Cui i sar., 2022; Almeida i sar., 2025b). Za sada nije jasno da li genske rekombinacije kod PCV3 doprinose adaptaciji virusa ili predstavljaju evolutivno prolazne događaje bez uticaja na patogenost sojeva. Tome u prilog govori činjenica da nijedna od do sada opisanih rekombinantnih varijanti nije postala dominantna, niti je pouzdano povezana sa klinički značajnim sojevima (Li i sar., 2018; Franzo i sar., 2020). Rezultati sprovedene analize su ograničeni imajući u vidu da je dostupan mali broj kompletnih sekvenci genoma PCV3 iz Srbije, Balkana i ostatka Evrope kao i činjenicu da pojedine metode detekcije mogu imati različitu osetljivost za starije ili kompleksnije rekombinantne događaje. Stoga se zaključak o retkosti rekombinacija prvenstveno odnosi na analizirane regione i genome, a ne nužno na celokupan spektar evolutivnih procesa kod

PCV3. Rekombinacije na granici Rep i Cap regiona mogu imati značajnu ulogu u očuvanju replikativne sposobnosti cirkovirusa, naročito u uslovima promenjenog selekcionog pritiska, smanjene efektivne veličine virusne populacije ili adaptacije na novog domaćina (Kazlauskas i sar., 2018). U tom smislu, nalazi rekombinacije na granici Rep i Cap regiona ne moraju nužno ukazivati na neposrednu promenu bioloških osobina virusa, ali mogu predstavljati mehanizam kojim se održava ili modifikuje efikasnost replikacije u različitim epizootiološkim i ekološkim uslovima. Položaj druge prekidne tačke, unutar Cap regiona, koji je direktnije povezan sa antigenskom strukturom i interakcijom sa imunskim odgovorom domaćina, ukazuje na to da rekombinacija kod PCV3 nije ograničena isključivo na replikativni deo genoma (Cui i sar., 2024).

Parvovirusi i cirkovirusi divljih mesojeda

Dostupna literatura koja se odnosi na slična ispitivanja uzoraka poreklom od divljih mesojeda iz Evrope doprinosi interpretaciji dobijenih rezultata o prisustvu CPV2, FPV i CanineCV/FoxCV kod zlatnih šakala i crvenih lisica u Srbiji. Naime, ukupna prevalencija virusa vrste *Carnivore protoparvovirus 1* u ovom istraživanju iznosila je 12,2%, uz sličan broj pozitivnih uzoraka poreklom od šakala i lisica. Ovakav nalaz uklapa se u rezultate ispitivanja dobijene u Italiji, Španiji i Slovačkoj, gde je kod različitih vrsta divljih mesojeda zabeleženo približno 10–20% pozitivnih jedinki, uz više vrednosti u pojedinim populacijama (Calatayud i sar., 2020; Ndiana i sar., 2021; Petroušková i sar., 2025). Nakon tipizacije, uočeno je da je CPV2 učestalije prisutan kod šakala, dok je kod lisica dominantan nalaz FPV. Ovakva raspodela razlikuje se od nalaza iz severoistočne Italije, gde su zlatni šakali i jazavci pretežno bili inficirani FPV, dok je CPV2 ređe detektovan (Leopardi i sar., 2022), kao i od dosadašnjih podataka iz Srbije, gde je kod zlatnih šakala utvrđen isključivo FPV (Milićević i sar., 2024). Nalaz CPV2 kao dominantnog kod šakala u Zapadnoj Bačkoj stoga predstavlja novi podatak za ovu populaciju i može odražavati intenzivniji kontakt šakala sa psima u ispitivanom području, uz napomenu da se poređenje zasniva na malom broju pozitivnih uzoraka. Noviji podaci iz Hrvatske takođe ukazuju na ulogu šakala u ekologiji FPV, budući da su identifikovani genetički klasteri FPV zajednički za domaće mačke i šakale (Ćorić i sar., 2026). U kombinaciji sa nalazima ove studije, prethodno navedeni podaci ukazuju da zlatni šakali i crvene lisice mogu učestvovati u održavanju i razmeni sojeva parvovirusa mesojeda sa psima i mačkama. Istovremena cirkulacija CPV2 i FPV u različitim vrstama divljih mesojeda, uz filogenetsku bliskost sa sojevima poreklom od pasa i mačaka, već je opisana u Španiji i Italiji (Calatayud i sar., 2020; Ndiana i sar., 2021). Slični nalazi zabeleženi su i u Turskoj, gde su CPV2b sojevi poreklom od lisica pokazali veliku sličnost sa izolatima iz pasa (Kurucay i sar., 2023). U tom smislu, slična ukupna prevalencija parvovirusa kod šakala i lisica u Srbiji, ali uz različit odnos CPV2 i FPV, može odražavati različite obrasce kontakta ovih vrsta sa psima i mačkama. Šakali su u literaturi prepoznati kao domaćini i potencijalni prenosioci virusa pasa, što pokazuju i novije studije iz Mađarske i Afrike (de Villiers i sar., 2023; Fehér i sar., 2025). Crvene lisice u ovom istraživanju pokazuju veću povezanost sa FPV, ali uz prisustvo CPV2, što je u skladu sa nalazima iz Italije, Španije i Slovačke koji potvrđuju da se u populaciji ovih životinja mogu održavati i FPV i CPV2, ali da uloga pojedinih sojeva varira u zavisnosti od lokacije (Calatayud i sar., 2020; Ndiana i sar., 2021; Petroušková i sar., 2025). Verovatno je da se

FPV održava u populaciji divljih i domaćih mačaka, ali i drugih mesojeda sa oportunističkim načinom ishrane, dok je CPV2 češće prisutan u populaciji šakala kao posledica direktnog ili indirektnog kontakta sa psima. Ipak, zbog malog broja pozitivnih uzoraka u ovoj studiji i nedostatka podataka za domaću populaciju životinja, ovakvo tumačenje ostaje na nivou pretpostavke.

Filogenetska analiza varijabilnog segmenta kapsidnog gena sojeva CPV2 i FPV pokazala je da su svi analizirani sojevi CPV2 svrstani unutar genotipova CPV2b i CPV2c, pri čemu su raspoređeni u više podgrana. Ovakav nalaz je u skladu sa rezultatima dostupnih studija koje ukazuju na cirkulaciju i filogenetsku raznovrsnost ovih genotipova među domaćim i divljim mesojedima (Battilani i sar., 2019; Calatayud i sar., 2020; Leopardi i sar., 2022). U Srbiji posebno je važna retrospektivna analiza CPV2 kod pasa sa dijarejom, kojom su u periodu od 2008. do 2020. godine potvrđena sva tri podtipa CPV2. U toj studiji CPV2a je bio dominantan u ranijem periodu, dok su CPV2b i CPV2c detektovani u novijim uzorcima, odnosno 2019. i 2020. godine (Milićević i sar., 2023). Time je pokazano da su CPV2b i CPV2c već cirkulisali u populaciji pasa u Srbiji pre njihove detekcije kod divljih mesojeda u ovom ispitivanju. Međutim, prema dostupnim podacima, CPV2c prethodno nije potvrđen kod divljih životinja u Srbiji i njegov nalaz kod zlatnog šakala u ovoj disertaciji ima poseban epizootiološki značaj. Bliska filogenetska povezanost sekvence PV815777, poreklom od zlatnog šakala, sa sekvencom MW382259.1 detektovanom u studiji Milićević i sar. (2023) kod psa u Srbiji 2020. godine ukazuje na moguću povezanost divljih mesojeda sa lokalnim ciklusom CPV2c koji je prethodno dokumentovan u populaciji pasa. Ipak, ovaj nalaz ne omogućava postavljanje preciznih zaključaka i može se govoriti samo o filogenetskoj bliskosti i mogućoj zajedničkoj cirkulaciji linija virusa, a ne o direktnom dokazu transmisije sa pasa na šakale ili obrnuto. Sličan obrazac filogenetske bliskosti između sojeva iz različitih domaćina zabeležen je u više evropskih studija, uključujući Španiju, Portugal i Italiju, gde su identične ili gotovo identične VP2 sekvence detektovane kod pasa, lisica, vukova i drugih mesojeda (Battilani i sar., 2019; Calatayud i sar., 2020; Balboni i sar., 2021c; Ndiana i sar., 2021), što potvrđuje da mutacije u VP2 genu nisu nužno potrebne za prelazak između simpatričnih vrsta. U okviru CPV2b klastera, sojevi iz Srbije poreklom od crvene lisice, uključujući PV815775, grupišu se sa sekvencama iz Turske i Egipta, ali bez dovoljno jake bootstrap podrške za pouzdano tumačenje porekla ili pravca širenja virusa. Nasuprot tome, kompaktna grupa sekvenci PV815772–PV815776 pokazuje nisku genetičku divergenciju, dok se pojedine sekvence divljih mesojeda poklapaju ili veoma blisko grupišu sa sekvencama pasa iz Srbije, naročito MW382258.1 i MW382261.1. Ovakav rezultat ukazuje na cirkulaciju istih ili veoma srodnih CPV2b linija u domaćoj i divljoj populaciji mesojeda na lokalnom nivou. To je u skladu sa nalazima Milićević i sar. (2023), prema kojima su srpski CPV2b sojevi poreklom od pasa bili međusobno blisko povezani, što podržava pretpostavku o stabilnoj lokalnoj cirkulaciji ovog podtipa nakon njegovog pojavljivanja u populaciji pasa. Dakle, ovakva topologija stabla podržava hipotezu o zajedničkoj cirkulaciji sojeva CPV2 između populacija pasa i divljih mesojeda, ali ne omogućava izvođenje pouzdanih zaključaka o smeru transmisije ili poreklu virusa. Sličan problem interpretacije opisan je i u drugim studijama, jer parcijalni VP2 region često omogućava pouzdanu genotipizaciju, ali ne i precizno određivanje porekla virusa (Battilani i sar., 2019; Mira i sar., 2019; Milićević i sar., 2023). Iz navedenog razloga, identične ili gotovo identične sekvence kod pasa, šakala i lisica treba tumačiti kao dokaz preklapanja

virusnih linija u istom epizootiološkom prostoru, a ne kao potvrdu puteva transmisije virusa.

Slično tome, sojevi FPV iz ovog ispitivanja grupisani su unutar FPV-B klastera zajedno sa evropskim sekvencama, dok prisustvo FPV-A linije kod ranije opisanog soja iz Srbije ukazuje na to da među divljim mesojedima u zemlji cirkuliše više linija ovog virusa. Osim toga, nalaz iz ove studije je u skladu sa prethodnim ispitivanjem Milićević i sar. (2024), u kojem pozitivne životinje nisu imale makroskopski uočljive lezije i bile su u dobroj kondiciji, što podržava tumačenje da infekcija FPV kod šakala može imati subklinički tok i da molekularna detekcija virusa ne mora podrazumevati klinički značajnu bolest. Najnovija studija iz Hrvatske pokazuje prisustvo FPV kod 40% ispitanih uzoraka poreklom od zlatnih šakala (Ćorić i sar., 2026). Za razliku od studija iz Srbije, u navedenoj studiji je izvršena analiza kompletne sekvence VP2, što je verovatno doprinelo preciznijoj filogenetskoj karakterizaciji virusa. U istom istraživanju identifikovana je i posebna FPV grupa zajednička za domaće mačke i zlatne šakale iz Hrvatske, dok su pojedine mutacije bile pozicionirane na površini VP2 proteina, u regionima značajnim za vezivanje antitela. Ovi nalazi ukazuju na to da zlatni šakali mogu imati aktivniju ulogu u ekologiji FPV nego što se ranije pretpostavljalo, posebno u područjima u kojima dolazi do preklapanja domaćih i divljih mesojeda (Ćorić i sar., 2026). U tom smislu, grupisanje FPV sojeva iz Srbije poreklom od zlatnih šakala i crvenih lisica na filogenetskom stablu, uz visoku bootstrap podršku i nisku nukleotidnu divergenciju ukazuje na aktivnu cirkulaciju sojeva FPV među divljim mesojedima na Balkanu. Takav nalaz ukazuje na nedavnu zajedničku evoluciju ili ograničenu introdukciju novih varijanti virusa, što je saglasno rezultatima iz Italije, Španije i Turske (Tucciarone i sar., 2021; Hasircioglu i sar., 2023). Nalaz iz ove studije je konceptualno blizak rezultatima Ćorić i sar. (2026), u kojima su pojedine FPV linije bile zajedničke za domaće mačke i šakale. Ukupno gledano, oba skupa podataka ukazuju na postojanje lokalnih ili regionalnih linija FPV koje mogu cirkulisati u populacijama različitih vrsta domaćina, naročito u uslovima preklapanja staništa šakala, lisica, domaćih mačaka i pasa. Osim toga, jedan soj FPV iz ove studije poreklom od lisice filogenetski je pozicioniran neposredno uz italijanski soj detektovan kod zlatnog šakala, što ukazuje i na postojanje cirkulacije genetički srodnih FPV linija širom Evrope (Tucciarone i sar., 2021).

Analiza prisustva genskih rekombinacija primenom više metoda nije detektovala verodostojne rekombinantne događaje u okviru parcijalnih VP2 sekvenci ni kod CPV2 ni kod FPV. GARD analiza jeste izdvojila po jednu potencijalnu prekidnu tačku u oba skupa podataka, ali ti nalazi nisu potvrđeni drugim metodama i zato nisu interpretirani kao dokaz rekombinacije. Ovakav rezultat je u skladu sa većinom studija u kojima se parcijalni VP2 fragmenti smatraju korisnim za genotipizaciju i filogenetsko poređenje, ali nedovoljnim za pouzdano dokazivanje rekombinacionih događaja (Pérez i sar., 2014; Tucciarone i sar., 2021; Tang i sar., 2022; Li i sar., 2024). Nasuprot tome, slučajevi prirodne rekombinacije između parvovirusa mesojeda obično su opisivani na osnovu većih fragmenata gena, kompletnih genoma ili uz snažnu podršku više metoda (Mochizuki i sar., 2008; Pérez i sar., 2014; Li i sar., 2024).

Sveukupno posmatrano, rezultati bioinformatičke analize pokazuju da CPV2 i FPV kod divljih mesojeda u Srbiji imaju različite, ali povezane obrasce cirkulacije. Kod CPV2, posebno je značajno prisustvo genotipova CPV2b i CPV2c, jer su ove varijante prethodno potvrđene kod pasa u Srbiji, dok detekcija CPV2c kod zlatnog šakala predstavlja važan

nalaz koji ukazuje na uključivanje divljih mesojeda u širu lokalnu cirkulaciju ove varijante. U slučaju FPV, ukupno posmatrano sa drugim rezultatima iz Srbije i regiona, može se zaključiti da zlatni šakali i crvene lisice mogu učestvovati u održavanju lokalnih i regionalnih linija FPV, uključujući linije koje se filogenetski približavaju sojevima domaćih mačaka. Ograničenja ove analize ogledaju se pre svega u korišćenju parcijalnih VP2 sekvenci, koje izuzev filogenetske analize u cilju diferencijacije genotipova virusa, ne omogućavaju detekciju svih mogućih rekombinacionih događaja niti precizno mapiranje prekidnih tačaka. Dodatno ograničenje predstavlja relativno mali broj pozitivnih uzoraka, kao i ograničena dostupnost referentnih sekvenci iz regiona Zapadnog Balkana u Banci gena. Takođe treba istaći da razlike između metoda za detekciju rekombinacije mogu dovesti do lažno pozitivnih ili negativnih rezultata kada se analiziraju kratki fragmenti gena ili skupovi sekvenci sa malim brojem varijabilnih mesta (Li i sar., 2024). Bolje razumevanje ovih procesa zahtevalo bi analizu celih genoma ili većih fragmenata gena većeg broja izolata iz Srbije i susednih zemalja, uz uključivanje uzoraka iz populacija pasa, mačaka, šakala i lisica (Milićević i sar., 2023; Milićević i sar., 2024; Ćorić i sar., 2026).

Podaci dobijeni ispitivanjem prisustva cirkovirusa u populaciji divljih mesojeda pokazuju da je ukupna prevalencija CanineCV/FoxCV od 31,6% znatno viša od prijavljenih u većini prethodnih evropskih studija u kojima se za pojedine vrste beleže stope od nekoliko procenata do oko 20% (Zaccaria i sar., 2016; Franzo i sar., 2021; Ndiana i sar., 2022), što ukazuje na to da šakali i lisice u severozapadnoj Srbiji predstavljaju važne rezervoare cirkovirusa. Visoka prevalencija CanineCV, odnosno FoxCV u ovoj studiji (31,6%), uz izraženu razliku između šakala (42,2%) i lisica (22,6%), ukazuje na intenzivnu cirkulaciju virusa u populacijama divljih mesojeda severozapadne Srbije. U poređenju sa nalazima iz Italije, gde je CanineCV detektovan kod 15,9–20% lisica i 18–50% drugih mesojeda, kao i sa studijama iz Hrvatske i Ujedinjenog Kraljevstva koje opisuju FoxCV kod lisica sa ili bez kliničkih znakova, dobijene vrednosti ukazuju na aktivnu cirkulaciju kako CanineCV, tako i FoxCV (genotipa 5 CanineCV) u regionu (Lojkić i sar., 2016; Ndiana i sar., 2022; Magliocca i sar., 2024). Nalaz koji pokazuje da je kod šakala učestaliji CanineCV nego FoxCV, uz relativno visok udeo mešovitih CanineCV/FoxCV infekcija, dok je kod lisica dominantno prisustvo FoxCV, u skladu je sa detaljnom genetičkom karakterizacijom CanineCV u istoj populaciji, objavljenom u radu Benković i sar. (2025), kao sastavnom delu ove disertacije. Pored toga, mešovite infekcije genotipovima 4 i 5 CanineCV detektovane su isključivo kod šakala, što ukazuje na njihovu moguću ulogu u transmisiji virusa između divljih i domaćih populacija mesojeda (Benković i sar., 2025). Zajedno sa nalazima iz Namibije, gde su opisani visoka prevalencija i višestruki rekombinacioni događaji između sojeva poreklom od pasa i šakala, ovi podaci podržavaju pretpostavku da šakali mogu imati ulogu važnih domaćina kod kojih je povećana mogućnost za stvaranje rekombinantnih sojeva virusa (de Villiers i sar., 2023). Prisustvo FoxCV (genotipa 5) kao dominantnog kod lisica u Srbiji uklapa se sa rezultatima mnogobrojnih studija iz regiona i Evrope. Metagenomske analize fecesa lisica iz Hrvatske pokazale su prisustvo FoxCV blisko srodnog sojevima iz SAD, Italije i Velike Britanije, dok noviji radovi iz Italije potvrđuju česte mešovite infekcije sa drugim enteričnim virusima kod lisica i vukova (Lojkić i sar., 2016; Magliocca i sar., 2024; Sarchese i sar., 2025).

Rezultati bioinformatičke analize rekombinacija genoma sojeva CanineCV u populaciji divljih mesojeda u ovoj studiji otkrivaju izraženu genetičku raznovrsnost i kompleksnu filogenetsku strukturu, što je u skladu sa nalazima iz drugih evropskih i

svetskih studija koje ukazuju na postojanje većeg broja linija virusa i njegovu dinamičnu cirkulaciju među različitim domaćinima (Franzo i sar., 2021; Beikpour i sar., 2022; de Villiers i sar., 2023; Fehér i sar., 2025; Benković i sar., 2025). Analiza sekvenci iz ove studije ukazuje na visok stepen genetičke varijabilnosti sojeva CanineCV kod divljih mesojeda u Srbiji, što je u skladu sa nalazima iz Kanade i Italije (Ndiana i sar., 2022; Canuti i sar., 2024). Filogenetska analiza jasno razvrstava ispitivane sojeve u prethodno definisane genotipove CanineCV (1–6), a zabeleženo je izraženo grupisanje po geografskom poreklu i vrsti domaćina. Naime, sojevi pretežno detektovani kod divljih mesojeda pripadaju genotipu 5 (FoxCV), dok su sojevi iz Irana izdvojeni kao genotip 6 (Beikpour i sar., 2022). Prema numeraciji primenjenoj u ovom radu, prve tri oznake odgovaraju azijskim sojevima, a genotip 4 grupi evropskih, američkih i afričkih sojeva (Benković i sar., 2025). Posebno je značajno što su sekvence iz Srbije raspoređene u dva genotipa i to: četiri soja poreklom od šakala u genotipu 4 i pet sekvenci (četiri šakala i jedna lisica) u okviru genotipa 5 (FoxCV). Genetička heterogenost utvrđena unutar genotipa 5 u ovom istraživanju (do 8,4%) u skladu je sa opsegom nukleotidne sličnosti od 91,9 do 99,8% opisanim unutar iste grupe od strane Urbani i sar. (2021), što potvrđuje da genotip 5 obuhvata genetički raznovrsne sojeve i da utvrđena divergencija ne dovodi u pitanje njihovo svrstavanje u ovaj genotip. Osim toga, sekvence iz genotipa 5 formiraju izdvojen klaster koji ukazuje na lokalnu evoluciju ili potencijalno rekombinantno poreklo pojedinih sojeva. Ovakva topologija stabla potvrđuje istovremenu cirkulaciju više linija CanineCV među divljim mesojedima iz ove studije, a što je ranije dokumentovano za populacije vukova i lisica u drugim zemljama (Canuti i sar., 2024; Benković i sar., 2025; Fehér i sar., 2025).

Analiza rekombinacija identifikovala je sedam rekombinantnih sojeva sa signalima detektovanim u dva segmenta genoma lociranih na prelazu između Rep i Cap gena čije je prisustvo potvrđeno višestrukim metodama u okviru RDP5 softvera, što značajno povećava pouzdanost ovih nalaza s obzirom na poznate metodološke probleme pouzdane detekcije rekombinacije (Martin i sar., 2020; Jaya i sar., 2023). Lokalizacija prekidnih tačaka ukazuje da funkcionalna razdvojenost Rep i Cap segmenata može predstavljati povoljnu zonu za nastanak rekombinantnih varijanti virusa, slično rezultatima iz Mađarske, Kine i Afrike gde su prekidne tačke registrovane u približno istim segmentima genoma CanineCV (Niu i sar., 2020; de Villiers i sar., 2023; Fehér i sar., 2025). Najverovatnije roditeljske sekvence su uglavnom identifikovane unutar skupa sekvenci iz ove studije što ukazuje na lokalnu razmenu genetičkog materijala između bliskih linija virusa. Slični obrasci su kod sojeva CanineCV u Namibiji kao i za PCV2 kod svinja širom Evrope (Olvera i sar., 2007; de Villiers i sar., 2023). GARD analiza dodatno je potvrdila postojanje prekidne tačke oko pozicije 900 u nukleotidnoj sekvenci na granici Rep i Cap gena (Niu i sar., 2020; Fehér i sar., 2025). Biološki posmatrano, ovakva lokalizacija može imati uticaj na kombinovanje kapaciteta za replikaciju jednog soja sa osobinama kapsida drugog soja bez narušavanja osnovnih funkcija virusa. Najveći broj rekombinantnih sojeva potiče iz uzoraka poreklom od zlatnih šakala što podržava hipotezu da ove životinje mogu predstavljati pogodne domaćine za nastanak novih varijanti virusa kao posledica mešovitih infekcija različitim linijama virusa (Benković i sar., 2025). Sličan nalaz potvrđen je i za populaciju vukova u ispitivanju Canuti i sar. (2024) gde su ove životinje zabeležene kao rezervoari raznovrsnih sojeva CanineCV, odnosno FoxCV (Canuti i sar., 2024). Prisustvo samo jednog rekombinantnog soja poreklom od crvene lisice u ovom ispitivanju ukazuje na potencijalno manji epizootiološki značaj ove vrste za nastanak novih varijanti virusa u datom ekosistemu. Uporedna analiza

sa radovima iz regiona Zapadnog Balkana pokazuje da postoji određena geografska segregacija linija virusa čak unutar relativno bliskih lokaliteta zbog istorijskih migracija ili barijera kao što su reke ili planinski masivi (Benković i sar., 2025; Fehér i sar., 2025). Pored toga, nalaz jedne mešovite infekcije CPV2 i FoxCV kod jednog šakala u ovoj studiji ukazuje na mogućnost da isti domaćin istovremeno nosi genetički i biološki različite DNK viruse. Slični nalazi opisani su kod vukova u Italiji, kod kojih su CPV2c i CanineCV detektovani u uzorcima poreklom od iste jedinke, kao i kod lisica i šakala u Mađarskoj, gde su istovremeno identifikovani CanineCV, CCoV i CDV (Fehér i sar., 2025; Sarchese i sar., 2025). Iako podaci ove studije ne uključuju histopatološka ili klinička ispitivanja koja bi omogućila procenu uticaja potencijalnog sinergističkog efekta parvovirusa i cirkovirusa, skorije studije iz Srbije ukazuju da je većina nalaza kod divljih mesojeda povezana sa subkliničkim infekcijama (Benković i sar., 2025; Kureljušić i sar., 2026). Ograničenja ove analize ogledaju se pre svega u neujednačenoj zastupljenosti sekvenci iz pojedinih geografskih područja Evrope i Balkana kao i prijavljenim parcijalnim delovima genoma u Banci gena. Ukupno posmatrano, rezultati ove analize doprinose boljem razumevanju evolutivne dinamike CanineCV na Balkanu, ali ističu potrebu za analizom većeg broja uzoraka kompletnih genoma poreklom od različitih domaćina kako bi se preciznije detektovali međusobni odnosi između sojeva poreklom od divljih i domaćih mesojeda.

ZAKLJUČCI

1. Real-time PCR metodom nukleinska kiselina svinjskih parvovirusa utvrđena je u 61,1% uzoraka divljih svinja. Među pozitivnim uzorcima najčešći je bio PPV2 (92,7%), zatim PPV7 (70,9%), PPV3 (32,7%) i PPV6 (18,2%). Konvencionalni multiplex PCR, primenjen na svim real-time pozitivnim uzorcima, potvrdio je 82,2% nalaza, sa stopom potvrde od 92,2% za PPV2 do 60,0% za PPV6.
2. Pojedinačna infekcija svinjskim parvovirusima utvrđena je u 23,6%, a mešovita infekcija u 76,4% pozitivnih uzoraka. Najčešće je registrovano istovremeno prisustvo PPV2 i PPV7 (67,3%), zatim PPV2 i PPV3 (30,9%).
3. Sekvenciranjem metodom po Sangeru dobijene su 23 sekvence svinjskih parvovirusa: 8 sekvenci kompletnog kapsidnog gena PPV2, 6 kompletnog kapsidnog gena PPV6 i 9 kompletnog genoma PPV7. Filogenetskom analizom svi sojevi PPV2 svrstani su u grupu 2, odnosno evropski ogranak, sojevi PPV6 u grupu 1 zajedno sa sekvencama iz Evrope, Rusije i Severne Amerike, a sojevi PPV7 u grupu 2 zajedno sa sekvencama iz Rusije, Kine i Kolumbije, uz izraženiju genetičku heterogenost nego kod PPV2 i PPV6. Nijedna vrsta nije formirala liniju izdvojenu po geografskom poreklu.
4. Real-time PCR metodom PCV2 je detektovan u 18,9%, a PCV3 u 13,3% uzoraka divljih svinja, bez mešovite infekcije ova dva virusa, tako da je bar jedan cirkovirus utvrđen kod 32,2% ispitanih jedinki. Cirkovirusi su utvrđeni u 34,5% uzoraka pozitivnih na parvoviruse, najčešće u kombinaciji sa PPV2.
5. Analizom varijabilnog segmenta ORF2 četiri sekvence PCV2 utvrđeno je da detektovani sojevi pripadaju genotipovima PCV2b i PCV2d, bez formiranja zasebne linije specifične za divlje svinje i uz blisku srodnost sa ranije opisanim sojevima poreklom iz Srbije.
6. Analizom pet sekvenci kompletnog genoma i ORF2 segmenta utvrđeno je da svi detektovani sojevi PCV3 pripadaju genotipu PCV3-a. Sojevi nisu formirali geografski izdvojen klaster, već su bili blisko povezani sa sojevima poreklom od domaćih i divljih svinja iz Evrope i drugih područja, što ukazuje na relativno očuvanu genetičku strukturu ovog virusa u ispitivanoj populaciji.
7. Real-time PCR metodom nukleinska kiselina parvovirusa mesojeda utvrđena je u 12,2% uzoraka, sa sličnom učestalošću kod šakala (13,3%) i lisica (11,3%). Naknadnom tipizacijom metodom sekvenciranja potvrđeno je prisustvo CPV2 u 7,1% i FPV u 5,1% uzoraka, pri čemu je CPV2 bio češći kod zlatnih šakala, a FPV kod crvenih lisica.
8. Filogenetskom analizom 12 sekvenci varijabilnog segmenta kapsidnog gena (7 CPV2 i 5 FPV) utvrđeno je da sojevi CPV2 pripadaju genotipovima CPV2b i CPV2c. Jedan od dva soja CPV2c, oba poreklom od zlatnih šakala, bio je u analiziranom fragmentu identičan soju poreklom od psa iz Srbije, dok su četiri međusobno najsrodnija soja CPV2b grupisana zajedno sa sojevima CPV2b poreklom od pasa iz Srbije. Ovi nalazi ukazuju na cirkulaciju srodnih sojeva CPV2 između pasa i divljih mesojeda, ali ne omogućavaju zaključivanje o smeru transmisije. Svi sojevi FPV svrstani su u grupu FPV-B zajedno sa evropskim sekvencama, za razliku od ranije opisanog soja iz Srbije koji pripada grupi FPV-A. U okviru grupe FPV-B tri soja (jedan poreklom od zlatnog

šakala i dva od crvenih lisica) formirala su zasebnu podgrupu, što ukazuje na moguću lokalnu cirkulaciju virusa, dok je jedan soj poreklom od crvene lisice bio najsrodniji italijanskom soju detektovanom kod zlatnog šakala.

9. Real-time PCR metodom nukleinska kiselina cirkovirusa detektovana je u 31,6% uzoraka divljih mesojeda, i to CanineCV genotip 5 (FoxCV) u 51,6%, CanineCV u 35,5%, a mešovite infekcije u 12,9% pozitivnih uzoraka. Prevalencija je bila viša kod šakala (42,2%) nego kod lisica (22,6%), pri čemu je kod šakala češći bio CanineCV uz prisustvo mešovitih infekcija, a kod lisica FoxCV bez mešovitih infekcija. Kod jednog zlatnog šakala utvrđena je istovremena infekcija CPV2 i FoxCV.
10. Analizom devet sekvenci kompletnog genoma utvrđeno je da detektovani sojevi cirkovirusa mesojeda pripadaju genotipovima 4 i 5 (FoxCV). Genotip 4 detektovan je kod zlatnih šakala i grupisao se sa sekvencama iz Evrope, Severne i Južne Amerike i Afrike, dok je FoxCV potvrđen kod obe vrste i formirao jasno izdvojen klaster, što ukazuje na lokalnu cirkulaciju genetički srodnih sojeva.
11. Verodostojni rekombinacioni signali u sekvencama virusa poreklom od divljih svinja utvrđeni su kod PPV2 i PPV7, ali ne i kod PPV6 i PCV2. Kod PPV2 verodostojan signal utvrđen je kod jednog soja, sa prekidnom tačkom u 5′ delu kapsidnog gena, dok su kod PPV7 signali utvrđeni kod svih devet sekvenci kompletnog genoma, u NS1 i VP regionima, uz dve prekidne tačke, što ukazuje na mozaičnu strukturu genoma ovog virusa. Nijedan od sojeva PCV3 iz ovog ispitivanja nije potvrđen kao rekombinantan. Dve prekidne tačke utvrđene GARD analizom ukazuju na učešće rekombinacije u ranijoj evoluciji PCV3, ali se ne mogu povezati ni sa jednim pojedinačnim sojem iz ovog ispitivanja.
12. Kod CanineCV/FoxCV rekombinacija je utvrđena kod sedam od devet sojeva, od kojih je šest poreklom od zlatnih šakala, sa prekidnom tačkom na prelazu između Rep i Cap gena. Kod CPV2 i FPV verodostojni rekombinacioni signali nisu utvrđeni.
13. Uspostavljeni real-time PCR i konvencionalni PCR protokoli omogućili su detekciju i molekularnu karakterizaciju svih ispitivanih vrsta parvovirusa i cirkovirusa, uključujući i novootkrivene viruse koji nisu obuhvaćeni standardnim dijagnostičkim panelima, te mogu poslužiti kao osnova za dalju molekularnu dijagnostiku ovih infekcija.
14. Utvrđena filogenetska bliskost pojedinih sojeva sa sojevima ranije opisanim kod pasa, mačaka i domaćih svinja ukazuje na moguću cirkulaciju srodnih linija virusa između divljih i domaćih populacija, čime se potvrđuje epizootiološki značaj divljih svinja, zlatnih šakala i crvenih lisica kao potencijalnih rezervoara ovih patogena, iako dobijeni podaci ne omogućavaju pouzdano utvrđivanje smera transmisije.

LITERATURA

1.Abrahams, R., & Majumder, K. (2025). Small Genomes, Big Disruptions: Parvoviruses and the DNA Damage Response. Viruses, 17. https://doi.org/10.3390/v17040494

2.Afolabi, K. O., Iweriebor, B. C., Obi, L. C., & Okoh, A. I. (2019). Prevalence of porcine parvoviruses in some South African swine herds with background of porcine circovirus type 2 infection. Acta Tropica, 190, 37-44. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.10.010

3.Allison, A. B., Kohler, D. J., Fox, K. A., Brown, J. D., Gerhold, R. W., Shearn-Bochsler, V. I., Dubovi, E. J., Parrish, C. R., & Holmes, E. C. (2013). Frequent cross-species transmission of parvoviruses among diverse carnivore hosts. Journal of virology, 87(4), 2342–2347. https://doi.org/10.1128/JVI.02428-12

4.Allison, A. B., Kohler, D. J., Ortega, A., Hoover, E. A., Grove, D. M., Holmes, E. C., & Parrish, C. R. (2014). Host-specific parvovirus evolution in nature is recapitulated by in vitro adaptation to different carnivore species. PLoS Pathogens, 10(11), e1004475. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004475

5.Almeida, B., Duarte, M. D., Duarte, A., Barros, S. C., Abade Dos Santos, F., & Henriques, A. M. (2025b). Evidence of Spillover and Recombination Between Domestic Pigs and Wild Boars Provides New Insights into Porcine Circoviruses. Pathogens (Basel, Switzerland, 14(12), 1283. https://doi.org/10.3390/pathogens14121283

6.Almeida, B., Duarte, M. D., Duarte, A., Fagulha, T., Ramos, F., Luís, T., Caetano, I., Barros, S. C., Abade dos Santos, F., & Henriques, A. M. (2025a). Comprehensive survey of PCV2 and PCV3 in domestic pigs and wild boars across Portugal: Prevalence, geographical distribution and genetic diversity. Pathogens, 14(7), 675. https://doi.org/10.3390/pathogens14070675

7.Alvisi, G., Manaresi, E., Cross, E., Hoad, M., Akbari, N., Pavan, S., Ariawan, D., Bua, G., Petersen, G., Forwood, J., & Gallinella, G. (2023). Importin α/β-dependent nuclear transport of human parvovirus B19 nonstructural protein 1 is essential for viral replication. Antiviral Research, 105588. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2023.105588

8.Amoroso, M. G., Cerutti, F., D'Alessio, N., Lucibelli, M. G., Cerrone, A., Acutis, P. L., Galiero, G., Fusco, G., & Peletto, S. (2019). First identification of porcine parvovirus 3 in a wild boar in Italy by viral metagenomics – short communication. Acta Veterinaria Hungarica, 67(1), 135–139. https://doi.org/10.1556/004.2019.015

9.Amoroso, M. G., Serra, F., Esposito, C., D'Alessio, N., Ferrara, G., Cioffi, B., Anzalone, A., Pagnini, U., Carlo, E., Fusco, G., & Montagnaro, S. (2021). Prevalence of Infection with Porcine Circovirus Types 2 and 3 in the Wild Boar Population in the Campania Region (Southern Italy. Animals : An Open Access Journal from MDPI, 11(11), 3215. https://doi.org/10.3390/ani11113215

10.An, D.-J., Jeong, W., Jeoung, H.-Y., Yoon, S. H., Kim, H.-J., Park, J.-Y., & Park, B.-K. (2011). Phylogenetic analysis of feline panleukopenia virus (FPLV) strains in Korean cats. Research in Veterinary Science, 90(1), 163–167. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.05.010

11. Anderson, A., Hartmann, K., Leutenegger, C. M., Proksch, A. L., Mueller, R. S., & Unterer, S. (2017). Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea. The Veterinary record, 180(22), 542. https://doi.org/10.1136/vr.103926
12. Anoyatbekova, A., Komina, A., Vlasova, N., Kononova, E., Gulyukin, A., Krasnikov, N., & Yuzhakov, A. (2025). Molecular Detection of Porcine Parvovirus 5 in Domestic Pigs in Russia and Propagation of Field Isolates in Primary Porcine Testicular Cells. Veterinary sciences, 12(6), 535. https://doi.org/10.3390/vetsci12060535
13. Arkel, A., Kelman, M., West, P., & Ward, M. (2019). The relationship between reported domestic canine parvovirus cases and wild canid distribution. Heliyon, 5. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02511
14. Arnold, J., Humer, A., Heltai, M., Murariu, D., Spassov, N. i Hackländer, K. (2012). Current status and distribution of golden jackals Canis aureus in Europe. Mammal Review, 42(1), 1–11. https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2011.00185.x.
15. Arora, R., Malla, W., Tyagi, A., Mahajan, S., Sajjanar, B., & Tiwari, A. (2021). Canine Parvovirus and Its Non-Structural Gene 1 as Oncolytic Agents: Mechanism of Action and Induction of Anti-Tumor Immune Response. Frontiers in Oncology, 11. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.648873
16. Balboni, A., Niculae, M., Vito, S., Urbani, L., Terrusi, A., Mureşan, C., & Battilani, M. (2021a). The detection of canine parvovirus type 2c of Asian origin in dogs in Romania evidenced its progressive worldwide diffusion. BMC Veterinary Research, 17. https://doi.org/10.1186/s12917-021-02918-6
17. Balboni, A., Terrusi, A., Urbani, L., Troia, R., Stefanelli, S. A. M., Giunti, M., & Battilani, M. (2021b). Canine circovirus and Canine adenovirus type 1 and 2 in dogs with parvoviral enteritis. Veterinary Research Communications, 46, 481–489. https://doi.org/10.1007/s11259-021-09850-y
18. Balboni, A., Urbani, L., Delogu, M., Musto, C., Fontana, M. C., Merialdi, G., Lucifora, G., Terrusi, A., Dondi, F., & Battilani, M. (2021c). Integrated Use of Molecular Techniques to Detect and Genetically Characterise DNA Viruses in Italian Wolves (Canis lupus italicus. Animals, 11(8), 2198. https://doi.org/10.3390/ani11082198
19. Balboni, A., Urbani, L., Niculae, M., Muresan, C., Magliocca, M., Facile, V., Esposito, E., Terrusi, A., Gallina, L., & Battilani, M. (2025). Molecular epidemiology of highly diffusive DNA viruses in dogs and cats from Romania. Animals, 15(24), 3620. https://doi.org/10.3390/ani15243620
20. Balić, D., Marucci, G., Krajina, M., Benić, M., Mihaljević, Ž., Andreanszky, T., Sukalić, T., Lukačević, D., Miškić, T., & Škrivanko, M. (2024). Is golden jackal (Canis aureus) the most important indicator species of Trichinella infection in Croatia? (Vol. 333). https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110239
21. Battilani, M., Modugno, F., Mira, F., Purpari, G., Bella, S., Guercio, A., & Balboni, A. (2019). Molecular epidemiology of canine parvovirus type 2 in Italy from 1994 to 2017: Recurrence of the CPV2b variant. BMC Veterinary Research, 15(1), 393. https://doi.org/10.1186/s12917-019-2096-1
22. Behdenna, A., Lembo, T., Calatayud, O., Cleaveland, S., Halliday, J. E. B., Packer, C., Lankester, F., Hampson, K., Craft, M. E., Czupryna, A., Dobson, A. P., Dubovi, E. J., Ernest, E., Fyumagwa, R., Hopcraft, J. G. C., Mentzel, C., Mzimbiri, I., Sutton, D., Willett, B., …

Viana, M. (2019). Transmission ecology of canine parvovirus in a multi-host, multi-pathogen system. Proceedings of the Royal Society B, 286(1899), 20182772. https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2772

23. Beikpour, F., Letafati, A., Fakhr, Z., Decaro, N., & Mozhgani, S. (2025). Canine circovirus: An emerging virus of dogs and wild canids. Irish Veterinary Journal, 78. https://doi.org/10.1186/s13620-025-00290-7
24. Beikpour, F., Ndiana, L. A., Sazmand, A., Capozza, P., Nemati, F., Pellegrini, F., Zafari, S., Zolhavarieh, S. M., Cardone, R., Faraji, R., Lanave, G., Martella, V., & Decaro, N. (2022). Detection and Genomic Characterization of Canine Circovirus in Iran. Animals : An Open Access Journal from MDPI, 12(4), 507. https://doi.org/10.3390/ani12040507
25. Benković, D., Nišavić, J., Milić, N., Krnjaić, D., Prošić, I., Gajdov, V., Stević, N., Sukara, R., Balać, M., & Radalj, A. (2025). Genetic Diversity of Canine Circovirus Detected in Wild Carnivores in Serbia. Veterinary Sciences, 12(6), 515. https://doi.org/10.3390/vetsci12060515
26. Berns, K. (1990). Parvovirus replication. Microbiological reviews, 54 3, 316-329. https://doi.org/10.1128/mr.54.3.316-329.1990
27. Bexton, S., Wiersma, L. C., Getu, S., Run, P. R., Verjans, G. M., Schipper, D., Schapendonk, C. M., Bodewes, R., Oldroyd, L., Haagmans, B. L., Koopmans, M. M., & Smits, S. L. (2015). Detection of Circovirus in Foxes with Meningoencephalitis, United Kingdom, 2009-2013. Emerging Infectious Diseases, 21(7), 1205-1208. https://doi.org/10.3201/eid2107.150228
28. Bieri, J., Suter, C., Caliaro, O., Bartetzko, S., Bircher, C., & Ros, C. (2024). Globoside Is an Essential Intracellular Factor Required for Parvovirus B19 Endosomal Escape. Cells, 13. https://doi.org/10.3390/cells13151254
29. Bodendorf, U., Cziepluch, C., Jauniaux, J., Rommelaere, J., & Salomé, N. (1999). Nuclear Export Factor CRM1 Interacts with Nonstructural Proteins NS2 from Parvovirus Minute Virus of Mice. Journal of Virology, 73, 7769-7779. https://doi.org/10.1128/JVI.73.9.7769-7779.1999
30. Boisvert, M., Fernandes, S., & Tijssen, P. (2010). Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. J Virol. https://doi.org/10.1128/JVI.00479-10. https://doi.org/10.1128/JVI.00479-10
31. Breitbart, M., Delwart, E., Rosario, K., Segalés, J., Varsani, A., & Ictv Report Consortium (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Circoviridae. The Journal of general virology, 98(8), 1997–1998. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000871
32. Broliden, K., Tolfvenstam, T., & Norbeck, O. (2006). Clinical aspects of parvovirus B19 infection. Journal of internal medicine, 260(4), 285–304. https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01697.x
33. Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N., & Carmichael, L. (2001). Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. The Journal of General Virology, 82(Pt 12), 3021-3025. https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-12-3021
34. Busqueta-Medina, A., Ávalos-Ramírez, R., Zamora-Ávila, D. E., Aguirre-Arzola, V. E., Contreras-Cordero, J. F., & Cedillo-Rosales, S. (2026). Genomic Characterization of

Clinical Canine Parvovirus Type 2c Infection in Wild Coyotes (*Canis latrans*) in Mexico. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *15*(1), 80. https://doi.org/10.3390/pathogens15010080

35. Cadar, D., Cságola, A., Kiss, T., & Tuboly, T. (2013a). Capsid protein evolution and comparative phylogeny of novel porcine parvoviruses. Molecular Phylogenetics and Evolution, 66(1), 243-253. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.09.030
36. Cadar, D., Cságola, A., Lorincz, M., Tombácz, K., Spînu, M., & Tuboly, T. (2011). Distribution and genetic diversity of porcine hokovirus in wild boars. Archives of Virology, 156(12), 2233-2239. https://doi.org/10.1007/s00705-011-1125-6
37. Cadar, D., Dán, Á., Tombácz, K., Lőrincz, M., Kiss, T., Becskei, Z., Spînu, M., Tuboly, T., & Cságola, A. (2012). Phylogeny and evolutionary genetics of porcine parvovirus in wild boars. Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 12(6), 1163-1171. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.020
38. Cadar, D., Lőrincz, M., Kiss, T., Novosel, D., Podgorska, K., Becskei, Z., Tuboly, T., & Cságola, A. (2013b). Emerging novel porcine parvoviruses in Europe: Origin, evolution, phylodynamics and phylogeography. The Journal of general virology, 94(Pt 10), 2330-2337. https://doi.org/10.1099/vir.0.055129-0
39. Calatayud, O., Esperón, F., Velarde, R., Oleaga, Á., Llaneza, L., Ribas, A., Negre, N., Torre, A., Rodríguez, A., & Millán, J. (2020). Genetic characterization of Carnivore Parvoviruses in Spanish wildlife reveals domestic dog and cat-related sequences. Transboundary and Emerging Diseases, 67(2), 626-634. https://doi.org/10.1111/tbed.13378
40. Callaway, H. M., Welsch, K., Weichert, W., Allison, A. B., Hafenstein, S. L., Huang, K., Iketani, S., & Parrish, C. R. (2018). Complex and dynamic interactions between parvovirus capsids, transferrin receptors, and antibodies control cell infection and host range. Journal of Virology, 92(13), e00460-18. https://doi.org/10.1128/JVI.00460-18
41. Campbell, S., Ashley, W., Gil-Fernandez, M., Newsome, T. M., Giallonardo, F., Ortiz-Baez, A. S., Mahar, J. E., Towerton, A. L., Gillings, M., Holmes, E. C., Carthey, A. J. R., & Geoghegan, J. L. (2020). Red fox viromes in urban and rural landscapes. Virus Evolution, 6(ue 2). https://doi.org/10.1093/ve/veaa065
42. Canuti, M., King, A. V. L., Franzo, G., Cluff, H. D., Larsen, L. E., Fenton, H., Dufour, S. C., & Lang, A. S. (2024). Diverse fox circovirus (Circovirus canine) variants circulate at high prevalence in grey wolves (Canis lupus) from the Northwest Territories, Canada. Peer Community Journal, 4, Article e73. https://doi.org/10.24072/pcjournal.443
43. Canuti, M., Rodrigues, B., Bouchard, É., Whitney, H. G., Lang, A. S., Dufour, S. C., & Verhoeven, J. T. P. (2022). Distinct epidemiological profiles of porcine circovirus 3 and fox circovirus in Canadian foxes (Vulpes spp.). Current Research in Microbial Sciences, 3, 100161. https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100161
44. Cao, L., Fu, F., Chen, J., Shi, H., Zhang, X., Liu, J., Shi, D., Huang, Y., Tong, D., & Feng, L. (2021). Nucleocytoplasmic Shuttling of Porcine Parvovirus NS1 Protein Mediated by the CRM1 Nuclear Export Pathway and the Importin α/β Nuclear Import Pathway. Journal of Virology, 96. https://doi.org/10.1128/JVI.01481-21

45. Capozza, P., Buonavoglia, A., Pratelli, A., Martella, V., & Decaro, N. (2023). Old and Novel Enteric Parvoviruses of Dogs. Pathogens, 12. https://doi.org/10.3390/pathogens12050722
46. Cardoso, B. T. M., de Deus, D. R., Sousa, E. C., Pinheiro, K. D. C., da Costa, J. N., Maués, M. A. C., Mesquita, M. J. F., Teixeira, D. M., Siqueira, J. A. M., Resque, H. R., Gabbay, Y. B., & da Silva, L. D. (2023). Molecular analysis of canine circovirus in dogs from animal shelters in Belém, Pará, northern Brazil: first detection at the amazon region. Brazilian journal of veterinary medicine, 45, e000723. https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm000723
47. Castelló, J. R. (2018). Canids of the world: Wolves, wild dogs, foxes, jackals, coyotes, and their relatives. Princeton University Press. https://www.jstor.org/stable/j.ctv39x6vm
48. Chen, D., Zhang, L., & Xu, S. (2023). Pathogenicity and immune modulation of porcine circovirus 3. Frontiers in Veterinary Science, 10. https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1280177
49. Chen, S., Chen, N., Miao, B., Peng, J., Zhang, X., Chen, C., Zhang, X., Chang, L., Du, Q., Huang, Y., & Tong, D. (2021a). Coatomer protein COPε, a novel NS1-interacting protein, promotes the replication of Porcine Parvovirus via attenuation of the production of type I interferon. Veterinary Microbiology, 261, 109188. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109188
50. Chen, S., Liu, F., Yang, A., & Shang, K. (2024). For better or worse: Crosstalk of parvovirus and host DNA damage response. Frontiers in Immunology, 15. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1324531
51. Chen, S., Miao, B., Chen, N., Chen, C., Shao, T., Zhang, X., Chang, L., Zhang, X., Du, Q., Huang, Y., & Tong, D. (2021b). SYNCRIP facilitates porcine parvovirus viral DNA replication through the alternative splicing of NS1 mRNA to promote NS2 mRNA formation. Veterinary Research, 52. https://doi.org/10.1186/s13567-021-00938-6
52. Cheung, A. K., Wu, G., Wang, D., Bayles, D. O., Lager, K. M., & Vincent, A. L. (2010). Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus. Archives of virology, 155(5), 801–806. https://doi.org/10.1007/s00705-010-0646-8
53. Cheung, A. K. (2012). Porcine circovirus: Transcription and DNA replication. Virus Res. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.012
54. Chung, H. C., Nguyen, V. G., Park, Y. H., & Park, B. K. (2021). Genotyping of PCV3 based on reassembled viral gene sequences. Veterinary medicine and science, 7(2), 474–482. https://doi.org/10.1002/vms3.374
55. Ćorić, I., Miletić, G., Konjević, D., Bosković, I., Bujanić, M., Skrinjarić, A., Kovač, S., Barbić, L., Jungić, A., & Stevanović, V. (2026). Detection and Molecular Characterisation of Protoparvovirus carnivoran 1 in Golden Jackals (Canis aureus) in Croatia. Viruses, 18(1), 123. https://doi.org/10.3390/v18010123
56. Cotmore, S. F., Agbandje-McKenna, M., Canuti, M., Chiorini, J. A., Eis-Hubinger, A. M., Hughes, J., Mietzsch, M., Modha, S., Ogliastro, M., Pénzes, J. J., Pintel, D. J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., & Ictv Report Consortium (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. The Journal of general virology, 100(3), 367–368. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001212

57. Cotmore, S. F., Hafenstein, S., & Tattersall, P. (2010). Depletion of virion-associated divalent cations induces parvovirus minute virus of mice to eject its genome in a 3'-to-5' direction from an otherwise intact viral particle. J Virol, Feb;84(4):1945-56. https://doi.org/10.1128/JVI.01563-09. https://doi.org/10.1128/JVI.01563-09
58. Cotmore, S., & Tattersall, P. (2007). Parvoviral host range and cell entry mechanisms. Advances in Virus Research, 70, 183-232. https://doi.org/10.1016/S0065-3527(07)70005-2
59. Cruz, T. F., Batista, T. N., Vieira, E. M., Portela, L. M. F., Baccarin, A. M., Gradiz, J. J., & Araújo Junior, J. P. (2020). Caracterização genômica do circovírus canino detectado em cão com gastroenterite hemorrágica intermitente no Brasil. Ciência Rural, 50(5), e20190909. https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190909
60. Cságola, A., Lőrincz, M., Cadar, D., Tombácz, K., Biksi, I., & Tuboly, T. (2012). Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. Archives of Virology, 157(6), 1003–1010. https://doi.org/10.1007/s00705-012-1257-3
61. Cságola, A., Varga, S., Lőrincz, M., & Tuboly, T. (2014). Analysis of the full-length VP2 protein of canine parvoviruses circulating in Hungary. Archives of Virology, 159(9), 2441–2444. https://doi.org/10.1007/s00705-014-2068-5
62. Cui, J., Biernacka, K., Fan, J., Gerber, P. F., Stadejek, T., & Opriessnig, T. (2017b). Circulation of porcine parvovirus types 1 through 6 in serum samples obtained from six commercial Polish pig farms. Transboundary and Emerging Diseases, 64(6), 1945–1952. https://doi.org/10.1111/tbed.12593
63. Cui, J., Fan, J., Gerber, P. F., Biernacka, K., Stadejek, T., Xiao, C.-T., & Opriessnig, T. (2017a). First identification of porcine parvovirus 6 in Poland. Virus Genes, 53(1), 100–104. https://doi.org/10.1007/s11262-016-1386-y
64. Cui, Y., Hou, L., Pan, Y., Feng, X., Zhou, J., Wang, D., Guo, J., Liu, C., Shi, Y., Sun, T., Yang, X., Zhu, N., Tong, X., Wang, Y., & Liu, J. (2022). Reconstruction of the Evolutionary Origin, Phylodynamics, and Phylogeography of the Porcine Circovirus Type 3. Frontiers in Microbiology, 13, 898212. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.898212
65. Cui, Y., Li, S., Xu, W., Xie, J., Wang, D., Hou, L., Zhou, J., Feng, X., & Liu, J. (2024). Intra- and inter-host origin, evolution dynamics and spatial-temporal transmission characteristics of circoviruses. Frontiers in Immunology, 15, 1332444. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1332444
66. Cziepluch, C., Lampel, S., Grewenig, A., Grund, C., Lichter, P., & Rommelaere, J. (2000). H-1 Parvovirus-Associated Replication Bodies: A Distinct Virus-Induced Nuclear Structure. Journal of Virology, 74, 4807-4815. https://doi.org/10.1128/jvi.74.10.4807-4815.2000
67. Czyżewska-Dors, E., Dors, A., Augustyniak, A., Jabłoński, A., Andrusiak, E., & Podgórska, K. (2026). Detection of PCV3 in various sample types from wild boars in Poland. BMC Veterinary Research, 22, 113. https://doi.org/10.1186/s12917-025-05256-z
68. da Silva, D. F., Ciola, M., Lopes, V. O., Matias, D. R. M., Oliveira, T. S., & de Castro, A. M. M. G. (2025). Canine circovirus: emergence, adaptation, and challenges for animal and public health. Frontiers in veterinary science, 12, 1535650. https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1535650

69. Dankaona, W., Mongkholdej, E., Satthathum, C., Piewbang, C., & Techangamsuwan, S. (2022). Epidemiology, genetic diversity, and association of canine circovirus infection in dogs with respiratory disease. Scientific Reports, 12, 15445. https://doi.org/10.1038/s41598-022-19815-z
70. Dankaona, W., Nooroong, P., Poolsawat, N., Srionrod, N., Techangamsuwan, S., & Anuracpreeda, P. (2024). Molecular characterization of canine circovirus based on the Capsid gene in Thailand. BMC Veterinary Research, 20, 312. https://doi.org/10.1186/s12917-024-04120-w
71. de Oliveira Santana, W., Silveira, V. P., Wolf, J. M., Kipper, D., Echeverrigaray, S., Canal, C. W., Truyen, U., Lunge, V. R., & Streck, A. F. (2022). Molecular phylogenetic assessment of the canine parvovirus 2 worldwide and analysis of the genetic diversity and temporal spreading in Brazil. Infection, Genetics and Evolution, 98, 105225. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105225
72. de Oliveira, P. S. B., Cargnelutti, J. F., Masuda, E. K., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2019). New variants of canine parvovirus in dogs in southern Brazil. Archives of Virology, 164(5), 1361–1369. https://doi.org/10.1007/s00705-019-04198-w
73. de Villiers, L., Molini, U., Coetzee, L. M., Visser, L., Spangenberg, J., de Villiers, M., Berjaoui, S., Khaiseb, S., Lorusso, A., & Franzo, G. (2023). Molecular epidemiology of canine circovirus in domestic dogs and wildlife in Namibia, Africa. Infection, Genetics and Evolution, 112, 105458. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105458
74. Decaro, N., & Buonavoglia, C. (2012). Canine parvovirus--a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. Veterinary microbiology, 155(1), 1–12. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.007
75. Decaro, N., Buonavoglia, C., & Barrs, V. R. (2020). Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication? Veterinary Microbiology, 247, 108760. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108760
76. Decaro, N., Desario, C., Miccolupo, A., Campolo, M., Parisi, A., Martella, V., Amorisco, F., Lucente, M. S., Lavazza, A., & Buonavoglia, C. (2008). Genetic analysis of feline panleukopenia viruses from cats with gastroenteritis. Journal of General Virology, 89(9), 2290–2298. https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/001503-0
77. Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Desario, C., Campolo, M., Trani, L. D., Tarsitano, E., Tempesta, M., & Buonavoglia, C. (2005). A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. Veterinary Microbiology, 105(1), 19-28. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.018
78. Decaro, N., Martella, V., Desario, C., Lanave, G., Circella, E., Cavalli, A., Elia, G., Camero, M., & Buonavoglia, C. (2014). Genomic characterization of a circovirus associated with fatal hemorrhagic enteritis in dog, Italy. PloS one, 9(8), e105909. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105909
79. Dei Giudici, S., Franzoni, G., Bonelli, P., Angioi, P. P., Zinellu, S., Deriu, V., Carta, T., Sechi, A. M., Salis, F., Balzano, F., & Oggiano, A. (2020). Genetic Characterization of Porcine Circovirus 3 Strains Circulating in Sardinian Pigs and Wild Boars. Pathogens (Basel, Switzerland, 9(5), 344. https://doi.org/10.3390/pathogens9050344
80. Dei Giudici, S., Lo Presti, A., Bonelli, P., Angioi, P. P., Sanna, G., Zinellu, S., Balzano, F., Salis, F., Ciccozzi, M., & Oggiano, A. (2019). Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 in Sardinia, Italy, shows genotype 2d circulation among domestic pigs and wild boars.

Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 71, 189-196. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.013

81. Dei Giudici, S., Mura, L., Bonelli, P., Ferretti, L., Hawko, S., Franzoni, G., Angioi, P. P., Ladu, A., Puggioni, G., Antuofermo, E., Sanna, M. L., Burrai, G. P., & Oggiano, A. (2024). First Molecular Characterisation of Porcine Parvovirus 7 (PPV7) in Italy. Viruses, 16(6), 932. https://doi.org/10.3390/v16060932
82. Dei Giudici, S., Mura, L., Bonelli, P., Hawko, S., Angioi, P. P., Sechi, A. M., Denti, S., Sulas, A., Burrai, G. P., Madrau, M. P., Antuofermo, E., & Oggiano, A. (2023). Evidence of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Genetic Shift from PCV2b to PCV2d Genotype in Sardinia, Italy. Viruses, 15(11), 2157. https://doi.org/10.3390/v15112157
83. Delcourt, J., Brochier, B., Delvaux, D., Vangeluwe, D., & Poncin, P. (2022). Fox Vulpes vulpes population trends in Western Europe during and after the eradication of rabies. Mammal Review, 52(3), 343–359. https://doi.org/10.1111/mam.12289
84. Deng, Z., Sun, R., Han, X., Zhang, Y., Zhou, Y., Shan, Y., Xu, J., Li, X., He, F., & Fang, W. (2022). Porcine Circovirus 2 Activates the PERK-Reactive Oxygen Species Axis To Induce p53 Phosphorylation with Subsequent Cell Cycle Arrest at S Phase in Favor of Its Replication. Journal of Virology, 96. https://doi.org/10.1128/jvi.01274-22
85. Du, Q., Zhu, L., Zhong, J., Wei, X., Zhang, Q., Shi, T., Han, C., Yin, X., Chen, X., Tong, D., & Huang, Y. (2024). Porcine circovirus type 2 infection promotes the SUMOylation of nucleophosmin-1 to facilitate the viral circular single-stranded DNA replication. PLOS Pathogens, 20. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012014
86. Duarte, M. D., Henriques, A. M., Barros, S. C., Fagulha, T., Mendonça, P., Carvalho, P., Monteiro, M., Fevereiro, M., Basto, M. P., Rosalino, L. M., Barros, T., Bandeira, V., Fonseca, C., & Cunha, M. V. (2013). Snapshot of viral infections in wild carnivores reveals ubiquity of parvovirus and susceptibility of Egyptian mongoose to feline panleukopenia virus. PloS one, 8(3), e59399. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059399
87. Duvigneau, J. C., Hartl, R. T., Groiss, S., & Gemeiner, M. (2005). Quantitative simultaneous multiplex real-time PCR for the detection of porcine cytokines. Journal of Immunological Methods, 306(1-2), 16-27. https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.06.021
88. Eichwald, V., Daeffler, L., Klein, M., Rommelaere, J., & Salomé, N. (2002). The NS2 Proteins of Parvovirus Minute Virus of Mice Are Required for Efficient Nuclear Egress of Progeny Virions in Mouse Cells. Journal of Virology, 76, 10307-10319. https://doi.org/10.1128/JVI.76.20.10307-10319.2002
89. Fanelli, A., Pellegrini, F., Camero, M., Catella, C., Buonavoglia, D., Fusco, G., Martella, V., & Lanave, G. (2022). Genetic Diversity of Porcine Circovirus Types 2 and 3 in Wild Boar in Italy. Animals : An Open Access Journal from MDPI, 12(8), 953. https://doi.org/10.3390/ani12080953
90. Faraji, R., Sadeghi, M., Mozhgani, S.-H., Vasinioti, V., Ndiana, L. A., Desario, C., Beikpour, F., & Decaro, N. (2022). Detection of canine circovirus in dogs infected with canine parvovirus. Acta Tropica, 235, 106646. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106646

91.Farr, G. A., Zhang, L. G., & Tattersall, P. (2005). Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry. Proc Natl Acad Sci U S A. https://doi.org/10.1073/pnas.0508477102
92.Faustini, G., Poletto, F., Baston, R., Tucciarone, C. M., Legnardi, M., Dal Maso, M., Genna, V., Fiorentini, L., Donato, A., Perulli, S., Cecchinato, M., Drigo, M., & Franzo, G. (2024). D for dominant: Porcine circovirus 2d (PCV-2d) prevalence over other genotypes in wild boars and higher viral flows from domestic pigs in Italy. Frontiers in Microbiology, 15, 1412615. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1412615
93.Fayos, M., Sacristán, I., Ewbank, A. C., de la Torre, A., Iglesias, I., Velarde, R., Wipf, A., & Sacristán, C. (2026). Adenovirus, herpesvirus, and parvovirus survey in Iberian wolves (Canis lupus signatus) of Cantabria, Spain. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 102449. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2026.102449
94.Fehér, E., Jakab, F., & Bányai, K. (2023). Mechanisms of circovirus immunosuppression and pathogenesis with a focus on porcine circovirus 2: A review. The Veterinary Quarterly, 43, 1-18. https://doi.org/10.1080/01652176.2023.2234430
95.Fehér, E., Kemenesi, G., Görföl, T., Wazzani, Y., Bodó, K., Lanszki, J., Máté, D., Kaszab, E., Domán, M., Zádori, Z., & Lanszki, Z. (2025). Occurrence of Recombinant Canine Coronavirus, Picodicistrovirus, and Circovirus in Red Foxes (Vulpes vulpes) Implies Frequent Virus Transmission Events Among Carnivores. Transboundary and Emerging Diseases, 6681119. https://doi.org/10.1155/tbed/6681119
96.Ferrara, G., Brocherel, G., Falorni, B., Gori, R., Pozzi, A., Cammitti, V., Iovane, V., Montagnaro, S., & Piscopo, N. (2024). Detection of selected pathogens in reproductive tissues of wild boars in the Campania region, southern Italy. Acta Veterinaria Scandinavica, 66, 9. https://doi.org/10.1186/s13028-024-00731-3
97.Ferraro, E., Da Rold, G., Celva, R., Dalla Libera, E., Leopardi, S., Simonato, G., et al. (2026). Monitoring the health of wolves (Canis lupus): Integrating conservation and public health. PLoS ONE, 21(1), e0338969. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0338969
98.Filipov, C., Desario, C., Patouchas, O., Eftimov, P., Gruichev, G., Manov, V., Filipov, G., Buonavoglia, C., & Decaro, N. (2016). A ten-year molecular survey on parvoviruses infecting carnivores in Bulgaria. Transboundary and Emerging Diseases, 63(4), 460–464. https://doi.org/10.1111/tbed.12285
99.Frant, M. P., Mazur-Panasiuk, N., Gal-Cisoń, A., Bocian, Ł., Łyjak, M., & Szczotka-Bochniarz, A. (2024). Porcine Circovirus Type 3 (PCV3) in Poland: Prevalence in Wild Boar Population in Connection with African Swine Fever (ASF. Viruses, 16(5), 754. https://doi.org/10.3390/v16050754
100.Franzo, G., & Segalés, J. (2018). Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. PLoS ONE, 13(12), e0208585. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208585
101.Franzo, G., Delwart, E., Fux, R., Hause, B., Su, S., Zhou, J., & Segalés, J. (2020). Genotyping *Porcine Circovirus 3* (PCV-3) Nowadays: Does It Make Sense?. *Viruses*, *12*(3), 265. https://doi.org/10.3390/v12030265
102.Franzo, G., Faustini, G., Legnardi, M., Berto, G., Dal Maso, M., Genna, V., Menandro, M. L., Poletto, F., Cecchinato, M., Drigo, M., & Tucciarone, C. M. (2023). Wilder than intense: Higher frequency, variability, and viral flows of porcine circovirus 3 in wild boars and

rural farms compared to intensive ones in northern Italy. Frontiers in Microbiology, 14, 1234393. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1234393

103. Franzo, G., Legnardi, M., Hjulsager, C. K., Klaumann, F., Larsen, L. E., Segalés, J., & Drigo, M. (2018). Full-genome sequencing of porcine circovirus 3 field strains from Denmark, Italy and Spain demonstrates a high within-Europe genetic heterogeneity. Transboundary and Emerging Diseases, 65(3), 602-606. https://doi.org/10.1111/tbed.12836

104. Franzo, G., Menandro, M. L., Tucciarone, C. M., Barbierato, G., Crovato, L., Mondin, A., Libanora, M., Obber, F., Orusa, R., Robetto, S., Citterio, C., & Grassi, L. (2021). Canine Circovirus in Foxes from Northern Italy: Where Did It All Begin? Pathogens, 10(8). https://doi.org/10.3390/pathogens10081002

105. Franzo, G., Tinello, S., Grassi, L., Tucciarone, C. M., Legnardi, M., Cecchinato, M., Dotto, G., Mondin, A., Martini, M., Pasotto, D., Menandro, M. L., & Drigo, M. (2020). Free to Circulate: An Update on the Epidemiological Dynamics of Porcine Circovirus 2 (PCV-2) in Italy Reveals the Role of Local Spreading, Wild Populations, and Foreign Countries. Pathogens (Basel, Switzerland, 9(3), 221. https://doi.org/10.3390/pathogens9030221

106. Franzo, G., Tucciarone, C. M., Casagrande, S., Caldin, M., Cortey, M., Furlanello, T., Legnardi, M., Cecchinato, M., & Drigo, M. (2019). Canine parvovirus (CPV) phylogeny is associated with disease severity. Scientific Reports, 9, 11266. https://doi.org/10.1038/s41598-019-47773-6

107. Franzo, G., Legnardi, M., Poletto, F., Baston, R., Cecchinato, M., Drigo, M., & Tucciarone, C. M. (2025). Host-driven evolution of PCV2: insights into genetic diversity and adaptation. Frontiers in immunology, 16, 1577436. https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1577436

108. Fux, R., Söckler, C., Link, E. K., Renken, C., Krejci, R., Sutter, G., Ritzmann, M., & Eddicks, M. (2018). Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains. Virology Journal, 15(1), 25. https://doi.org/10.1186/s12985-018-0929-3

109. Ganaie, S., & Qiu, J. (2018). Recent Advances in Replication and Infection of Human Parvovirus B19. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8. https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00166

110. Gao, Y., Wang, H., Wang, S., Sun, M., Fang, Z., Liu, X., Cai, X., & Tu, Y. (2022). Self-Assembly of Porcine Parvovirus Virus-like Particles and Their Application in Serological Assay. Viruses, 14. https://doi.org/10.3390/v14081828

111. Gao, Y., Wang, Q., Li, H., Zhang, S., Zhao, J., Bao, D., Zhao, H., Wang, K., Hu, G., & Gao, F. (2024). Genomic composition and pathomechanisms of porcine circoviruses: A review. Virulence, 15. https://doi.org/10.1080/21505594.2024.2439524

112. Gil-Ranedo, J., Hernando, E., Riolobos, L., Domínguez, C., Kann, M., & Almendral, J. (2015). The Mammalian Cell Cycle Regulates Parvovirus Nuclear Capsid Assembly. PLoS Pathogens, 11. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004920

113. Giraldo-Ramirez, S., Rendon-Marin, S., & Ruíz-Saenz, J. (2020). Phylogenetic, evolutionary and structural analysis of canine parvovirus (CPV-2) antigenic variants circulating in Colombia. Viruses, 12(5), 500. https://doi.org/10.3390/v12050500

114. Glišić, D., Šolaja, S., Stevan, K., Milićević, V., Vučićević, M., Aleksić, J., & Davitkov, D. (2025). First report of triple viral co-infection (PPV, PCV2, PCMV) in wild boars in the Western Balkans. Pathogens, 14(7), 710. https://doi.org/10.3390/pathogens14070710
115. Gong, W., Du, H., Wang, T., Sun, H., Peng, P., Qin, S., Geng, H., Zeng, Z., Liang, W., Ling, H., Tu, C., & Tu, Z. (2023). Epizootiological surveillance of porcine circoviruses in free-ranging wild boars in China. Virologica Sinica, 38(5), 663–670. https://doi.org/10.1016/j.virs.2023.08.008
116. Grecco, S., Condon, E., Bucafusco, D., Bratanich, A. C., Panzera, Y., & Pérez, R. (2024). Comparative genomics of canine parvovirus in South America: Diversification patterns in local populations. Infection, Genetics and Evolution, 123, 105633. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2024.105633
117. Guo, J., Lai, Y., Yang, Z., Song, W., Zhou, J., Li, Z., Su, W., Xiao, S., & Fang, L. (2024). Coinfection and nonrandom recombination drive the evolution of swine enteric coronaviruses. Emerging Microbes & Infections, 13(1), 2332653. https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2332653
118. Guo, J., Liu, Z., Tong, X., Wang, Z., Xu, S., Chen, Q., Zhou, J., Fang, L., Wang, D., & Xiao, S. (2021). Evolutionary Dynamics of Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Whole-Genome Analysis. Viruses, 13(12), 2469. https://doi.org/10.3390/v13122469
119. Guo, Y., Yan, G., Chen, S., Han, H., Li, J., Zhang, H., Luo, S., Liu, M., Wu, Q., Li, Q., Tu, C., Huang, L., & Gong, W. (2022). Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus in China. Frontiers in Veterinary Science, 9. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1009103
120. Hao, X., Li, Y., Chen, H., Chen, B., Liu, R., Wu, Y., Xiao, X., Zhou, P., & Li, S. (2022b). Canine circovirus suppresses the type I interferon response and protein expression but promotes CPV-2 replication. International Journal of Molecular Sciences, 23(12), 6382. https://doi.org/10.3390/ijms23126382
121. Hao, X., Li, Y., Xiao, X., Chen, B., Zhou, P., & Li, S. (2022a). The Changes in Canine Parvovirus Variants over the Years. International Journal of Molecular Sciences, 23. https://doi.org/10.3390/ijms231911540
122. Hasircioglu, S., Aslım, H. P., Kale, M., Bulut, O., Koçlu, O., & Orta, Y. S. (2023). Molecular characterization of carnivore protoparvovirus strains circulating in cats in Turkey. Pesquisa Veterinária Brasileira, 43, 07178. https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-7178
123. Hess, S. C., Weiss, K. C. B., Custer, J. M., Lewis, J. S., Kraberger, S., & Varsani, A. (2024). Identification of small circular DNA viruses in coyote fecal samples from Arizona (USA). Archives of Virology, 169, 12. https://doi.org/10.1007/s00705-023-05937-w
124. Hijikata, M., Abe, K., Win, K. M., Shimizu, Y. K., Keicho, N., & Yoshikura, H. (2001). Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. Japanese journal of infectious diseases, 54(6), 244–245.
125. Hu, X., Chen, Z., Li, Y., Ding, Z., Zeng, Q., Wan, T., & Wu, H. (2022). Detection of Porcine Circovirus 1/2/3 and Genetic Analysis of Porcine Circovirus 2 in Wild Boar from Jiangxi Province of China. Animals : An Open Access Journal from MDPI, 12(16). https://doi.org/10.3390/ani12162021

126.Huang, Z., Cheong, U., Liu, Z., He, J., Zhao, L., Zhu, D., Xu, H., Tsai, Y., Wei, J., Dan, Z., Lu, B., & Jin, Y. (2026). Surveillance of Parvovirus in Free-Roaming Dogs in the Qinling Mountains and Assessment of the Risk of Cross-Species Transmission to Giant Pandas. Animals, 16(11), 1686. https://doi.org/10.3390/ani16111686
127.Igriczi, B., Dénes, L., Biksi, I., Albert, E., Révész, T., & Balka, G. (2022). High Prevalence of Porcine Circovirus 3 in Hungarian Pig Herds: Results of a Systematic Sampling Protocol. Viruses, 14(6), 1219. https://doi.org/10.3390/v14061219
128.Igriczi, B., Dénes, L., Schönhardt, K., Woźniak, A., Stadejek, T., & Balka, G. (2024). Comparative prevalence estimation and phylogenetic analysis of novel porcine parvoviruses (PPV2-7) in Hungarian pig herds. Transboundary and Emerging Diseases. https://doi.org/10.1155/2024/5117884
129.Ihalainen, T., Niskanen, E., Jylhävä, J., Paloheimo, O., Dross, N., Smolander, H., Langowski, J., Timonen, J., & Vihinen-Ranta, M. (2009). Parvovirus Induced Alterations in Nuclear Architecture and Dynamics. PLoS ONE, 4. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005948
130.Ikeda, Y., Nakamura, K., Miyazawa, T., Tohya, Y., Takahashi, E., & Mochizuki, M. (2002). Feline host range of canine parvovirus: Recent emergence of new antigenic types in cats. Emerging Infectious Diseases, 8(4), 341–346. https://doi.org/10.3201/eid0804.010228
131.Jager, M. C., Tomlinson, J. E., Lopez-Astacio, R. A., Parrish, C. R., & Van de Walle, G. R. (2021). Small but mighty: old and new parvoviruses of veterinary significance. Virology journal, 18(1), 210. https://doi.org/10.1186/s12985-021-01677-y
132.Jaya, F. R., Brito, B. P., & Darling, A. E. (2023). Evaluation of recombination detection methods for viral sequencing. Virus Evolution, 9(2), 066. https://doi.org/10.1093/ve/vead066
133.Jayappa, K., Rajkhowa, T. K., & Gaikwad, S. S. (2024). Canine parvovirus in North-East India: A phylogenetic and evolutionary analysis. Veterinary Quarterly, 44(1), 1–13. https://doi.org/10.1080/01652176.2024.2408742
134.Jezdimirović, N., Savić, B., Milovanović, B., Glišić, D., Ninković, M., Kureljušić, J., Maletić, J., Aleksić Radojković, J., Kasagić, D., & Milićević, V. (2024). Molecular Detection of Porcine Cytomegalovirus, Porcine Parvovirus, Aujeszky Disease Virus and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Wild Boars Hunted in Serbia during 2023. Veterinary Sciences, 11(6), 249. https://doi.org/10.3390/vetsci11060249
135.Ji, J., Chen, Q., Sui, C., Yu, Z., Xu, X., Yao, L., Kan, Y., Bi, Y., & Xie, Q. (2020). Novel Genotype Definition and Genome Characteristics of Duck Circovirus in Central and Eastern China. Transboundary and Emerging Diseases. https://doi.org/10.1111/tbed.13676
136.Ji, J., Jiao, R., Zhang, Z., Xu, X., Wang, Y., Bi, Y., & Yao, L. (2024). Novel genotyping definition and molecular characteristics of canine circovirus in China. Virology, 600, 110261. https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110261
137.Jin, X., Yuan, Y., Zhang, C., Zhou, Y., Song, Y., Wei, Z., & Zhang, G. (2020). Porcine parvovirus nonstructural protein NS1 activates NF-κB and it involves TLR2 signaling pathway. Journal of Veterinary Science, 21. https://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e50

138.Jongeneel, C., Sahli, R., Mcmaster, G., & Hirt, B. (1986). A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. Journal of Virology, 59, 564-573. https://doi.org/10.1128/jvi.59.3.564-573.1986
139.Kaneko, F., Kato, M., & Ito, Y. (2023). Porcine circoviruses in wild boars in Nagano Prefecture, Japan. The Journal of Veterinary Medical Science, 85(3), 367–370. https://doi.org/10.1292/jvms.22-0034
140.Kapoor, A., Dubovi, E. J., Henriquez-Rivera, J. A., & Lipkin, W. I. (2012). Complete genome sequence of the first canine circovirus. Journal of Virology, 86(12), 7018. https://doi.org/10.1128/JVI.00791-12
141.Kazlauskas, D., Varsani, A., & Krupovic, M. (2018). Pervasive Chimerism in the Replication-Associated Proteins of Uncultured Single-Stranded DNA Viruses. Viruses, 10(4), 187. https://doi.org/10.3390/v10040187
142.Khayat, R., Brunn, N., Speir, J., Hardham, J., Ankenbauer, R., Schneemann, A., & Johnson, J. (2011). The 2.3-Angstrom Structure of Porcine Circovirus 2. Journal of Virology, 85, 11542-11542. https://doi.org/10.1128/JVI.05863-11
143.Kim, S. C., Jeong, C. G., Nazki, S., Lee, S. I., Baek, Y. C., Jung, Y. J., & Kim, W. I. (2021). Evaluation of a multiplex PCR method for the detection of porcine parvovirus types 1 through 7 using various field samples. PloS One, 16(1), 0245699. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245699
144.Kim, S. C., Kim, J. H., Kim, J. Y., Park, G. S., Jeong, C. G., & Kim, W. I. (2022). Prevalence of porcine parvovirus 1 through 7 (PPV1-PPV7) and co-factor association with PCV2 and PRRSV in Korea. BMC Veterinary Research, 18(1), 133. https://doi.org/10.1186/s12917-022-03236-1
145.Kim, S.-C., Kim, J.-H., Kim, J.-Y., Park, G.-S., Jeong, C.-G., & Kim, W.-I. (2022). Prevalence of porcine parvovirus 1 through 7 (PPV1-PPV7) and co-factor association with PCV2 and PRRSV in Korea. BMC Veterinary Research, 18, 133. https://doi.org/10.1186/s12917-022-03236-1
146.Kimpston, C., Hatke, A., Castelli, B., Otto, N., Tiffin, H., Machtinger, E., Brown, J., Why, K., & Marconi, R. (2022). High Prevalence of Antibodies against Canine Parvovirus and Canine Distemper Virus among Coyotes and Foxes from Pennsylvania: Implications for the Intersection of Companion Animals and Wildlife. Microbiology Spectrum, 10. https://doi.org/10.1128/spectrum.02532-21
147.Klaumann, F., Correa-Fiz, F., Franzo, G., Sibila, M., Núñez, J. I., & Segalés, J. (2018a). Current knowledge on porcine circovirus 3 (PCV-3): A novel virus with a yet unknown impact on the swine industry. Frontiers in Veterinary Science, 5, 315. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00315
148.Klaumann, F., Franzo, G., Sohrmann, M., Correa-Fiz, F., Drigo, M., Núñez, J. I., Sibila, M., & Segalés, J. (2018b). Retrospective detection of Porcine circovirus 3 (PCV-3) in pig serum samples from Spain. Transboundary and Emerging Diseases, 65(5), 1290-1296. https://doi.org/10.1111/tbed.12876
149.Komina, A., Krasnikov, N., Simakova, M., Rykova, V., Zhukova, E., Bulgakov, A., & Yuzhakov, A. (2025). Distribution and phylogenetic analysis of porcine parvoviruses in

the wild boar population of Russia. BMC Genomics, 26(1), 209. https://doi.org/10.1186/s12864-025-11371-w
150. Kosakovsky Pond, S. L., Posada, D., Gravenor, M. B., Woelk, C. H., & Frost, S. D. (2006). Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. Molecular Biology and Evolution, 23(10), 1891-1901. https://doi.org/10.1093/molbev/msl051
151. Kotsias, F., Bucafusco, D., Nuñez, D. A., Lago Borisovsky, L. A., Rodriguez, M., & Bratanich, A. C. (2019). Genomic characterization of canine circovirus associated with fatal disease in dogs in South America. PLoS ONE, 14(6), e0218735. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218735
152. Kovačič, T., Konec, M., Boljte, B., Florijančić, T., Jan, M., Potočnik, H., Karamanlidis, A. A., Kusak, J., Righetti, D., Schenekar, T., Skrbinšek, T., Šprem, N., & Stronen, A. V. (2026). Investigation of Dalmatian population ancestry in golden jackals in nearby regions. Mammal Research, 71, 34. https://doi.org/10.1007/s13364-026-00853-1
153. Krasnikov, N., Rykova, V., Kucheruk, O., Komina, A., Pchelnikov, A., Gulyukin, A., & Yuzhakov, A. (2024). Genetic diversity of porcine circoviruses 2 and 3 circulating among wild boars in the Moscow Region of Russia. Frontiers in Veterinary Science, 11, 1372203. https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1372203
154. Kureljušić, B., Milićević, V., Glišić, D., Vasić, A., Savić, B., Jezdimirović, N., Erünlü, N. G. O., Blasi, B., & Weissenbacher-Lang, C. (2026). Retrospective analysis of possible associations between Pneumocystis spp. And five immunosuppressive viral pathogens in three wild carnivore species. BMC Veterinary Research, 22(1), 141. https://doi.org/10.1186/s12917-026-05315-z
155. Kurucay, H. N., Tamer, C., Muftuoglu, B., Elhag, A. E., Gozel, S., Cicek-Yildiz, Y., Demirtas, S., Ozan, E., Albayrak, H., Okur-Gumusova, S., & Yazici, Z. (2023). First isolation and molecular characterization of canine parvovirus-type 2b (CPV2b) from red foxes (Vulpes vulpes) living in the wild habitat of Turkey. Virology Journal, 20(1), 27. https://doi.org/10.1186/s12985-023-01988-2
156. Kusza, S., Podgórski, T., Scandura, M., Borowik, T., Jávor, A., Sidorovich, V. E., & sar. (2014). Contemporary Genetic Structure, Phylogeography and Past Demographic Processes of Wild Boar Sus scrofa Population in Central and Eastern Europe. PLoS ONE, 9(3), 91401. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091401
157. Lagan Tregaskis, P., Staines, A., Gordon, A., Sheridan, P., McMenamy, M., Duffy, C., Collins, P. J., Mooney, M. H., & Lemon, K. (2021). Co-infection status of novel parvovirus's (PPV2 to 4) with porcine circovirus 2 in porcine respiratory disease complex and porcine circovirus-associated disease from 1997 to 2012. Transboundary and Emerging Diseases, 68(4), 1979-1994. https://doi.org/10.1111/tbed.13846
158. Lakshmanan, R., Hull, J., Berry, L., Burg, M., Bothner, B., McKenna, R., & Agbandje-McKenna, M. (2022). Structural Dynamics and Activity of B19V VP1u during the pHs of Cell Entry and Endosomal Trafficking. Viruses, 14. https://doi.org/10.3390/v14091922
159. Lamm, C., & Rezabek, G. B. (2008). Parvovirus Infection in Domestic Companion Animals. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 38(ue 4), 837-850. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.03.008

160.Lanszki, J., Kurys, A., Szabó, L., Nagyapáti, N., & Porter, L. B. (2016). Miklós Heltai „Diet composition of the golden jackal and the sympatric red fox in an agricultural area (Hungary. Folia Zoologica, 65(4), 310-322,. https://doi.org/10.25225/fozo.v65.i4.a3.2016
161.Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Tse, H., Fu, C. T. Y., Au, W. K., Chen, X. C., Tsoi, H. W., Tsang, T. H. F., Chan, J. S. Y., Tsang, D. N. C., Li, K. S. M., Tse, C. W. S., Ng, T. K., Tsang, O. T. Y., Zheng, B. J., Tam, S., Chan, K. H., Zhou, B., & Yuen, K. Y. (2008). Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. The Journal of general virology, 89(Pt 8), 1840–1848. https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/000380-0
162.Leopardi, S., Milani, A., Cocchi, M., Bregoli, M., Schivo, A., Leardini, S., Festa, F., Pastori, A., Zan, G., Gobbo, F., Beato, M. S., Palei, M., Bremini, A., Rossmann, M.-C., Zucca, P., Monne, I., & Benedictis, P. (2022). Carnivore protoparvovirus 1 (CPV2 and FPV) Circulating in Wild Carnivores and in Puppies Illegally Imported into North-Eastern Italy. Viruses, 14(12), 2612. https://doi.org/10.3390/v14122612
163.Li, C., Liu, H., Li, J., Liu, D., Meng, R., Zhang, Q., Shaozhou, W., Bai, X., Zhang, T., Liu, M., & Zhang, Y. (2016). A Conserved Epitope Mapped with a Monoclonal Antibody against the VP3 Protein of Goose Parvovirus by Using Peptide Screening and Phage Display Approaches. PLoS ONE, 11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147361
164.Li, G., He, W., Zhu, H., Bi, Y., Wang, R., Xing, G., Zhang, C., Zhou, J., Yuen, K.-Y., Gao, G. F., & Su, S. (2018). Origin, genetic diversity, and evolutionary dynamics of novel porcine circovirus 3. Advanced Science, 5, 1800275. https://doi.org/10.1002/advs.201800275
165.Li, G., Ji, S., Zhai, X., Zhang, Y., Liu, J., Zhu, M., Zhou, J., & Su, S. (2017). Evolutionary and genetic analysis of the VP2 gene of canine parvovirus. BMC Genomics, 18. https://doi.org/10.1186/s12864-017-3935-8
166.Li, G., Liu, R., Chen, Y., Liang, H., Liang, Y., Li, X., Ke, Y., Lin, B., Zhong, J., Guo, X., Che, J., & Luo, J. (2025b). Evolutionary dynamics and codon bias analysis of canine circovirus: Insights into global spread and host adaptability. Molecular Phylogenetics and Evolution, 108369. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2025.108369
167.Li, H., Zhou, H., Li, L., Han, X., Shang, Q., Zhang, C., Zhou, M., Fu, Z. F., Zhao, J., & Zhao, L. (2025a). Epidemiological status and genome characteristics of canine parvovirus in China from 2022 to 2024. Archives of Virology, 170(6), 124. https://doi.org/10.1007/s00705-025-06301-w
168.Li, J., Xiao, Y., Qiu, M., Li, X., Li, S., Lin, H., Li, X., Zhu, J., & Chen, N. (2021). A systematic investigation unveils high coinfection status of porcine parvovirus types 1 through 7 in China from 2016 to 2020. Microbiology Spectrum, 9(3), e01294-21. https://doi.org/10.1128/Spectrum.01294-21
169.Li, L., McGraw, S., Zhu, K., Leutenegger, C. M., Marks, S. L., Kubiski, S., Gaffney, P., Dela Cruz, F. N., Jr, Wang, C., Delwart, E., & Pesavento, P. A. (2013). Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. Emerging Infectious Diseases, 19(4), 534-541. https://doi.org/10.3201/eid1904.121390
170.Li, Y., Wang, Q., Yue, W., Li, X., Chen, Y., & Gao, Y. (2023). Expression and self-assembly of virus-like particles from porcine parvovirus and its application in antibody detection. Polish Journal of Veterinary Sciences, 26 4, 591-609. https://doi.org/10.24425/pjvs.2023.148280

171. Li, Z., Cai, J., Feng, C., Wang, Y., Fang, S., & Xue, X. (2024). Two novel sites determine genetic relationships between CPV2and FPV: an epidemiological survey of canine and feline parvoviruses in Changchun, China (2020. Frontiers in Veterinary Science, 11, 1444984. https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1444984
172. Lina, Z., Kai, W., Fuyu, A., Zhang, D., Zhang, H., Xu, X., Ce, G., Yan, H., Kuang, Y., Zhang, Z., Lu, R., & Yan, H. (2022). Fatal canine parvovirus type 2a and 2c infections in wild Chinese pangolins (Manis pentadactyla) in southern China. Transboundary and Emerging Diseases, 69, 4002-4008. https://doi.org/10.1111/tbed.14703
173. Liu, Y., Chen, Y., Shang, Y., Deng, X., & Hao, H. (2025). Porcine Parvovirus in China: Recent Advances, Epidemiology, and Vaccine Strategies. Viruses, 17(9), 1262. https://doi.org/10.3390/v17091262
174. Liu, Y., Qin, Y., Hu, Y., Chen, W., Han, Z., Yi, C., Bi, J., Huang, H., Li, Y., Zhang, X., Lan, T., Zheng, M., & Sun, W. (2024). Epidemiological and evolutionary analysis of canine circovirus from 1996 to 2023. BMC Veterinary Research, 20. https://doi.org/10.1186/s12917-024-04186-6
175. 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. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.01.005
176. Lombardo, E., Ramírez, J., Agbandje-McKenna, M., & Almendral, J. (2000). A Beta-Stranded Motif Drives Capsid Protein Oligomers of the Parvovirus Minute Virus of Mice into the Nucleus for Viral Assembly. Journal of Virology, 74, 3804-3814. https://doi.org/10.1128/JVI.74.8.3804-3814.2000
177. Lombardo, E., Ramírez, J., García, J., & Almendral, J. (2002). Complementary Roles of Multiple Nuclear Targeting Signals in the Capsid Proteins of the Parvovirus Minute Virus of Mice during Assembly and Onset of Infection. Journal of Virology, 76, 7049-7059. https://doi.org/10.1128/JVI.76.14.7049-7059.2002
178. López-Astacio, R. A., Adu, O. F., Goetschius, D. J., Lee, H., Weichert, W. S., Wasik, B. R., Frueh, S. P., Alford, B. K., Voorhees, I. E. H., Flint, J. F., Saddoris, S., Goodman, L. B., Holmes, E. C., Hafenstein, S. L., & Parrish, C. R. (2023). Viral Capsid, Antibody, and Receptor Interactions: Experimental Analysis of the Antibody Escape Evolution of Canine Parvovirus. Journal of Virology, 97(6), 0009023. https://doi.org/10.1128/jvi.00090-23
179. Lucchini, V., Meijaard, E., Diong, C. H., Groves, C. P., & Randi, E. (2005). New phylogenetic perspectives among species of South-east Asian wild pig (Sus sp.) based on mtDNA sequences and morphometric data. J Zool, 266, 25-35. https://doi.org/10.1017/S0952836905006588
180. Lv, Z.-H., Lian, C.-Y., Li, C.-L., Chui, W.-T., Yao, X.-Y., Shao, J.-W., & Zhang, X.-L. (2023). Epidemiology and genotypic diversity of canine circovirus identified in pet dogs in Harbin, China. Acta Tropica, 245, 106978. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106978
181. Lyu, Z., Zhang, X., Xue, S., Yang, X., Liu, J., Fan, K., & Dai, A. (2023). Detection and genetic evolution analysis of porcine parvovirus type 7 (PPV7) in Fujian Province. Infection,

Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 115, 105515. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105515
182. Ma, X., Guo, Z., Zhang, Z., Li, X., Wang, X., Liu, Y., & Wang, X. (2020). Ferulic acid isolated from propolis inhibits porcine parvovirus replication potentially through Bid-mediate apoptosis. International immunopharmacology, 83, 106379. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106379
183. Magliocca, M., Taddei, R., Urbani, L., Bertasio, C., Facile, V., Gallina, L., Sampieri, M., Rugna, G., Rubini, S., Maioli, G., Terrusi, A., Battilani, M., & Balboni, A. (2024). Molecular Detection of Viral and Bacterial Pathogens in Red Foxes (Vulpes vulpes) from Italy. Animals, 14(13). https://doi.org/10.3390/ani14131969
184. Maity, H., Samanta, K., Deb, R., & Gupta, M. (2023). Revisiting Porcine Circovirus Infection: Recent Insights and Its Significance in the Piggery Sector. Vaccines, 11. https://doi.org/10.3390/vaccines11081308
185. Mankertz, A., Caliskan, R., Hattermann, K., Hillenbrand, B., Kurzendoerfer, P., Mueller, B., Schmitt, C., Steinfeldt, T., & Finsterbusch, T. (2004). Molecular biology of Porcine circovirus: Analyses of gene expression and viral replication. Veterinary Microbiology, 98 2, 81-88. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.10.014
186. Mäntylä, E., Chacko, J., Aho, V., Parrish, C., Shahin, V., Kann, M., Digman, M., Gratton, E., & Vihinen-Ranta, M. (2018). Viral highway to nucleus exposed by image correlation analyses. Scientific Reports, 8. https://doi.org/10.1038/s41598-018-19582-w
187. Mäntylä, E., Kann, M., & Vihinen-Ranta, M. (2017). Protoparvovirus Knocking at the Nuclear Door. Viruses, 9. https://doi.org/10.3390/v9100286
188. Markov, N., Pankova, N., & Morelle, K. (2019). Where winter rules: Modelling wild boar distribution in its north-eastern range. Sci Total Environm, 687, 1055-1064. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.157
189. Maroto, B., Valle, N., Saffrich, R., & Almendral, J. (2004). Nuclear Export of the Nonenveloped Parvovirus Virion Is Directed by an Unordered Protein Signal Exposed on the Capsid Surface. Journal of Virology, 78, 10685-10694. https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10685-10694.2004
190. Martin, D. P., Varsani, A., Roumagnac, P., Botha, G., Maslamoney, S., Schwab, T., Kelz, Z., Kumar, V., & Murrell, B. (2020). RDP5: A computer program for analyzing recombination in, and removing signals of recombination from, nucleotide sequence datasets. Virus Evolution, 7(1), 087. https://doi.org/10.1093/ve/veaa087
191. Mattola, S., Aho, V., Bustamante-Jaramillo, L., Pizzioli, E., Kann, M., & Vihinen-Ranta, M. (2022a). Nuclear entry and egress of parvoviruses. Molecular Microbiology, 118, 295-308. https://doi.org/10.1111/mmi.14974
192. Mattola, S., Mäntylä, E., Aho, V., Salminen, S., Leclerc, S., Oittinen, M., Salokas, K., Järvensivu, J., Hakanen, S., Ihalainen, T., Viiri, K., & Vihinen-Ranta, M. (2022b). G2/M checkpoint regulation and apoptosis facilitate the nuclear egress of parvoviral capsids. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 10. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1070599

193.Melegari, I., Berjaoui, S., Secondini, B., Curini, V., Lollo, V., Molini, U., Lorusso, A., & Franzo, G. (2025). Molecular epidemiology and genetic characterization of PCV2 and PCV3 circulating in domestic pigs and wild boars in central-southern regions of Italy. BMC Veterinary Research, 21(1), 478. https://doi.org/10.1186/s12917-025-04928-0
194.Mia, M., & Hasan, M. (2021). Update on Canine Parvovirus Infection: A Review from the Literature. Veterinary Sciences: Research and Reviews. https://doi.org/10.17582/journal.vsrr/2021.7.2.92.100
195.Mietzsch, M., Pénzes, J., & Agbandje-McKenna, M. (2019). Twenty-Five Years of Structural Parvovirology. Viruses, 11. https://doi.org/10.3390/v11040362
196.Milek, D., Woźniak, A., Guzowska, M., & Stadejek, T. (2019). Detection Patterns of Porcine Parvovirus (PPV) and Novel Porcine Parvoviruses 2 through 6 (PPV2-PPV6) in Polish Swine Farms. Viruses, 11(5), 474. https://doi.org/10.3390/v11050474
197.Milićević, V., Glišić, D., Sapundžić, Z. Z., Ninković, M., Milovanović, B., Veljović, L., & Kureljušić, B. (2023). Molecular characterization of Canine parvovirus type 2 from diarrheic dogs in Serbia from 2008 to 2020. Veterinary Research Communications, 47(1), 285-289. https://doi.org/10.1007/s11259-022-09924-5
198.Milićević, V., Glišić, D., Veljović, L., Vasić, A., Milovanović, B., Kureljušić, B., & Paunović, M. (2024). Protoparvovirus carnivoran 1 infection of golden jackals Canis aureus in Serbia. Veterinary Research Communications, 48(2), 1203-1209. https://doi.org/10.1007/s11259-023-10249-0
199.Milićević, V., Radojicic, S., Valcic, M., Ivovic, V., & Radosavljevic, V. (2016). Evidence of Aujeszky's disease in wild boar in Serbia. BMC Vet Res. https://doi.org/10.1186/s12917-016-0758-9.
200.Mira, F., Purpari, G., Bella, S., Colaianni, M. L., Schirò, G., Chiaramonte, G., Gucciardi, F., Pisano, P., Lastra, A., Decaro, N., & Guercio, A. (2019). Spreading of canine parvovirus type 2c mutants of Asian origin in southern Italy. Transboundary and Emerging Diseases, 66(6), 2297-2304. https://doi.org/10.1111/tbed.13283
201.Miranda, C., Coelho, C., Vieira-Pinto, M., & Thompson, G. (2015). Porcine hokovirus in wild boar in Portugal. Archives of Virology, 161(4), 981–983. https://doi.org/10.1007/s00705-015-2730-6
202.Misinzo, G. (2007). Entry of porcine circovirus 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in their host cells (Doktorska disertacija, Univerzitet u Gentu).
203.Misinzo, G., Delputte, P., Lefebvre, D., & Nauwynck, H. (2009). Porcine circovirus 2 infection of epithelial cells is clathrin-, caveolae- and dynamin-independent, actin and Rho-GTPase-mediated, and enhanced by cholesterol depletion. Virus Research, 139 1, 1-9. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.09.005
204.Mochizuki, M., Ohshima, T., Une, Y., & Yachi, A. (2008). Recombination between vaccine and field strains of canine parvovirus is revealed by isolation of virus in canine and feline cell cultures. Journal of Veterinary Medical Science, 70(12), 1305-1314. https://doi.org/10.1292/jvms.70.1305

205.Morelle, K., Fattebert, J., Mengal, C., & Lejeune, P. (2016). Invading or recolonizing? Patterns and drivers of wild boar population expansion into Belgian agroecosystems. Agric Ecosys Environm, 222, 267-275. https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.02.016
206.Naeger, L., Schoborg, R., Zhao, Q., Tullis, G., & Pintel, D. (1992). Nonsense mutations inhibit splicing of MVM RNA in cis when they interrupt the reading frame of either exon of the final spliced product. Genes & Development, 6 6, 1107-1119. https://doi.org/10.1101/gad.6.6.1107
207.Nandi, S., & Kumar, M. (2010). Canine parvovirus: Current perspective. Indian Journal of Virology, 21(1), 31–44. https://doi.org/10.1007/s13337-010-0007-y
208.Nath, B., Das, S., Roby, J., Sarker, S., Luque, D., Raidal, S., & Forwood, J. (2020). Structural Perspectives of Beak and Feather Disease Virus and Porcine Circovirus Proteins. Viral immunology. https://doi.org/10.1089/vim.2020.0097
209.Ndiana, L. A., Lanave, G., Desario, C., Berjaoui, S., Alfano, F., Puglia, I., Fusco, G., Colaianni, M. L., Vincifori, G., Camarda, A., Parisi, A., Sgroi, G., Elia, G., Veneziano, V., Buonavoglia, C., & Decaro, N. (2021). Circulation of diverse protoparvoviruses in wild carnivores, Italy. Transboundary and Emerging Diseases, 68(4), 2489-2502. https://doi.org/10.1111/tbed.13917
210.Ndiana, L. A., Lanave, G., Desario, C., Odigie, A. E., Madubuike, K. G., Lucente, M. S., Ezeifeka, C. A., Patruno, G., Lorusso, E., Elia, G., Buonavoglia, C., & Decaro, N. (2023). Detection of selected canine viruses in Nigerian free-ranging dogs traded for meat consumption. Animals, 13(6), 1119. https://doi.org/10.3390/ani13061119
211.Ndiana, L. A., Lanave, G., Vasinioti, V., Desario, C., Martino, C., Colaianni, M. L., Pellegrini, F., Camarda, A., Berjaoui, S., Sgroi, G., Elia, G., Pratelli, A., Buono, F., Martella, V., Buonavoglia, C., & Decaro, N. (2022). Detection and Genetic Characterization of Canine Adenoviruses, Circoviruses, and Novel Cycloviruses From Wild Carnivores in Italy. Frontiers in Veterinary Science, 9, 851987. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.851987
212.Nelsen, A., Lin, C.-M., & Hause, B. M. (2021). Porcine parvovirus 2 is predominantly associated with macrophages in porcine respiratory disease complex. Frontiers in Veterinary Science, 8, 726884. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.726884
213.Nguyen Manh, T., Piewbang, C., Rungsipipat, A., & Techangamsuwan, S. (2021). Molecular and phylogenetic analysis of Vietnamese canine parvovirus 2C originated from dogs reveals a new Asia-IV clade. Transboundary and emerging diseases, 68(3), 1445–1453. https://doi.org/10.1111/tbed.13811
214.Ni, J., Qiao, C., Han, X., Han, T., Kang, W., Zi, Z., Cao, Z., Zhai, X., & Cai, X. (2014). Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus (PPV6) in China. Virology Journal, 11, 203. https://doi.org/10.1186/s12985-014-0203-2
215.Nikitović, J., Djan, M., Ćirović, D., Antić, M., & Šnjegota, D. (2023). The first report on genetic variability and population structure in jackals from Bosnia and Herzegovina. Mammal Research, 68, 243–247. https://doi.org/10.1007/s13364-022-00665-z
216.Nišavić, J., Milić, N., Radalj, A., Krnjaić, D., Milićević, D., Knežević, A., Radojičić, M., Obrenović, S., Ćosić, M., Tešović, B., Benković, D., & Živulj, A. (2021). Genetic Analysis and Distribution of Porcine Parvoviruses Detected in the Organs of Wild Boars in Serbia. Acta Veterinaria, 71(1), 32-46. https://doi.org/10.2478/acve-2021-0003

217.Nišavić, J., Milić, N., Radalj, A., Mirilović, M., Vejnović, B., Ćosic, M., Knezević, A., Veljović, L., & Živulj, A. (2022). Detection and characterisation of porcine circoviruses in wild boars in northeastern Serbia. Veterinarni Medicina, 67(3), 131-137. https://doi.org/10.17221/32/2021-VETMED
218.Nišavić, J., Radalj, A., Milić, N., Prošić, I., Živulj, A., Benković, D., & Vejnović, B. (2024). PCV2 AND PCV3 GENOTYPING IN WILD BOARS FROM SERBIA. Slovenian Veterinary Research, 61(4), 263-269. https://doi.org/10.26873/SVR-1708-2024
219.Niu, G., Chen, S., Li, X., Zhang, L., & Ren, L. (2022). Advances in Crosstalk between Porcine Circoviruses and Host. Viruses, 14. https://doi.org/10.3390/v14071419
220.Niu, L., Wang, Z., Zhao, L., Wang, Y., Cui, X., Shi, Y., Chen, H., & Ge, J. (2020). Detection and molecular characterization of canine circovirus circulating in northeastern China during 2014-2016. Archives of Virology, 165(1), 137-143. https://doi.org/10.1007/s00705-019-04433-4
221.Novosel, D., Tuboly, T., Balka, G., Szeredi, L., Lojkić, I., Jungić, A., Acinger-Rogić, Ž., Ait-Ali, T., & Cságola, A. (2019). Evidence of CPV2c introgression into Croatia and novel insights into phylogeny and cell tropism. Scientific Reports, 9, 16909. https://doi.org/10.1038/s41598-019-53422-9
222.Nykky, J., Vuento, M., & Gilbert, L. (2014). Role of Mitochondria in Parvovirus Pathology. PLoS ONE, 9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086124
223.Ohshima, T., Nakajima, T., Oishi, T., Imamoto, N., Yoneda, Y., Fukamizu, A., & Yagami, K. (1999). CRM1 mediates nuclear export of nonstructural protein 2 from parvovirus minute virus of mice. Biochemical and Biophysical Research Communications, 264 1, 144-150. https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1478
224.Olvera, A., Cortey, M., & Segalés, J. (2007). Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. Virology, 357(2), 175-185. https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.07.047
225.Opriessnig, T., Meng, X.-J., & Halbur, P. G. (2007). Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 19(6), 591–615. https://doi.org/10.1177/104063870701900601
226.Opriessnig, T., Shen, H. G., Pal, N., Ramamoorthy, S., Huang, Y. W., Lager, K. M., Beach, N. M., Halbur, P. G., & Meng, X. J. (2011). A live-attenuated chimeric porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccine is transmitted to contact pigs but is not upregulated by concurrent infection with porcine parvovirus (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and is efficacious in a PCV2b-PRRSV-PPV challenge model. Clinical and Vaccine Immunology, 18(8), 1261-1268. https://doi.org/10.1128/CVI.05057-11
227.Pacini, M. I., Forzan, M., Cilia, G., Bertelloni, F., Fratini, F., & Mazzei, M. (2021). Detection and characterization of viral pathogens associated with reproductive failure in wild boars in central Italy. Animals, 11(2), 304. https://doi.org/10.3390/ani11020304
228.Palinski, R., Mitra, N., & Hause, B. (2016). Discovery of a novel Parvovirinae virus, porcine parvovirus 7, by metagenomic sequencing of porcine rectal swabs. Virus Genes, 52, 564-567. https://doi.org/10.1007/s11262-016-1322-1

229.Palinski, R., Piñeyro, P., Shang, P., Yuan, F., Guo, R., Fang, Y., Byers, E., & Hause, B. M. (2017). A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. Journal of Virology, 91(1), e01879-16. https://doi.org/10.1128/JVI.01879-16
230.Pallarés, F., Halbur, P., Opriessnig, T., Sorden, S., Villar, D., Janke, B., Yaeger, M., Larson, D., Schwartz, K., Yoon, K., & Hoffman, L. (2002). Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2) Coinfections in US Field Cases of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 14, 515-519. https://doi.org/10.1177/104063870201400614
231.Park, G. N., Song, S., Cha, R. M., Choe, S., Shin, J., Kim, S. Y., Hyun, B. H., Park, B. K., & An, D. J. (2021). Genetic analysis of porcine parvoviruses detected in South Korean wild boars. Archives of virology, 166(8), 2249-2254. https://doi.org/10.1007/s00705-021-05106-x
232.Parker, J., & Parrish, C. (2000). Cellular Uptake and Infection by Canine Parvovirus Involves Rapid Dynamin-Regulated Clathrin-Mediated Endocytosis, Followed by Slower Intracellular Trafficking. Journal of Virology, 74. https://doi.org/10.1128/JVI.74.4.1919-1930.2000
233.Parrish C. R. (1995). Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. Bailliere's clinical haematology, 8(1), 57–71. https://doi.org/10.1016/s0950-3536(05)80232-x
234.Paul, P. S., Mengeling, W. L., & TT, B., Jr. (1979). Replication of porcine parvovirus in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and peritoneal macrophages. Infect Immun. https://doi.org/10.1128/iai.25.3.1003-1007.1979.
235.Payne, S. L. (2017). Family Parvoviridae. In Viruses (pp. 237–241). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803109-4.00029-5
236.Pérez, R., Calleros, L., Marandino, A., Sarute, N., Iraola, G., Grecco, S., Blanc, H., Vignuzzi, M., Isakov, O., Shomron, N., Carrau, L., Hernández, M., Francia, L., Sosa, K., Tomás, G., & Panzera, Y. (2014). Phylogenetic and genome-wide deep-sequencing analyses of canine parvovirus reveal co-infection with field variants and emergence of a recent recombinant strain. PloS One, 9(11), 111779. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111779
237.Petroušková, P., Pelegrinová, A., Lazár, J., Lipinský, J., Drážovská, M., Prokeš, M., Korytár, Ľ., Vojtek, B., Kostičák, M., Molnár, L., Vaščinec, J. M., & Ondrejková, A. (2025). Red Foxes (Vulpes vulpes) and European Badgers (Meles meles) as Overlooked Wildlife Hosts of Canine Parvovirus in Slovakia: First Evidence by Molecular Characterization and Virus Isolation. Microorganisms, 13(10), 2325. https://doi.org/10.3390/microorganisms13102325
238.Phan, T. G., Giannitti, F., Rossow, S., Marthaler, D., Knutson, T. P., Li, L., Deng, X., Resende, T., Vannucci, F., & Delwart, E. (2016). Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. Virology journal, 13(1), 184. https://doi.org/10.1186/s12985-016-0642-z
239.Piewbang, C., Jo, W. K., Puff, C., Vries, E., Kesdangsakonwut, S., Rungsipipat, A., Kruppa, J., Jung, K., Baumgärtner, W., Techangamsuwan, S., Ludlow, M., & Osterhaus, A. D. M. E. (2018). Novel canine circovirus strains from Thailand: Evidence for genetic

recombination. Scientific Reports, 8(1), 7524. https://doi.org/10.1038/s41598-018-25936-1
240. Prinz, C., Stillfried, M., Neubert, L. K., & Denner, J. (2019). Detection of PCV3 in German wild boars. Virology Journal, 16, 25. https://doi.org/10.1186/s12985-019-1133-9
241. Renzhammer, R., Truyen, U., Buchebner, B., Baumgartner, G., Kobialka, R., Wahed, A., Koch, M., Ladinig, A., & Unterweger, C. (2024). Duration of maternally derived antibodies of porcine parvovirus in growing pigs and presence of antibodies in gilts and sows vaccinated with three different parvovirus vaccines. Porcine Health Management, 10. https://doi.org/10.1186/s40813-024-00361-1
242. Riolobos, L., Reguera, J., Mateu, M., & Almendral, J. (2006). Nuclear transport of trimeric assembly intermediates exerts a morphogenetic control on the icosahedral parvovirus capsid. Journal of Molecular Biology, 357 3, 1026-1038. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.019
243. Roić, B., Cajavec, S., Toncić, J., Madić, J., Lipej, Z., Jemersić, L., Lojkić, M., Mihaljević, Z., Cac, Z., & Sostarić, B. (2005). Prevalence of antibodies to porcine parvovirus in wild boars (Sus scrofa) in Croatia. Journal of wildlife diseases, 41(4), 796–799. https://doi.org/10.7589/0090-3558-41.4.796
244. Ros, C., Bieri, J., & Leisi, R. (2020). The VP1u of Human Parvovirus B19: A Multifunctional Capsid Protein with Biotechnological Applications. Viruses, 12. https://doi.org/10.3390/v12121463
245. Rudova, N., Buttler, J., Kovalenko, G., Sushko, M., Bolotin, V., Muzykina, L., Zinenko, O., Stegniy, B., Dunaiev, Y., Sytiuk, M., Gerilovych, A., Drown, D. M., Bortz, E., & Solodiankin, O. (2022). Genetic Diversity of Porcine Circovirus 2 in Wild Boar and Domestic Pigs in Ukraine. Viruses, 14(5), 924. https://doi.org/10.3390/v14050924
246. Rykova, V., Komina, A., Makhova, I., Zhukova, E., Igolkin, A., Lavrentiev, I., & Yuzhakov, A. (2026). Molecular detection and phylogenetic analysis of selected viral pathogens in wild boar populations of Russia. Viruses, 18(3), 307. https://doi.org/10.3390/v18030307
247. Sabyrzhan, T., Kumar, M., Kydyrmanov, A., Kassymbekov, Y., Klivleyeva, N., Baimakhanova, B., & Karamendin, K. (2025). Co-infection of canine parvovirus and circovirus in fatal gastroenteritis outbreak among service dogs in Kazakhstan, 2023. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 15, 1645697. https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1645697
248. Saekhow, P., & Ikeda, H. (2015). Prevalence and genomic characterization of porcine parvoviruses detected in Chiangmai area of Thailand in 2011. Microbiol Immunol, 59, 82-88. https://doi.org/10.1111/1348-0421.12218
249. Saekhow, P., Mawatari, T., & Ikeda, H. (2014). Coexistence of multiple strains of porcine parvovirus 2 in pig farms. Microbiology and Immunology, 58(7), 382–387. https://doi.org/10.1111/1348-0421.12159
250. Sanchez, J., Ghadirian, N., & Horton, N. (2021). High-Resolution Structure of the Nuclease Domain of the Human Parvovirus B19 Main Replication Protein NS1. Journal of Virology, 96. https://doi.org/10.1101/2021.12.20.473600
251. Saporiti, V., Huerta, E., Correa-Fiz, F., Grosse Liesner, B., Duran, O., Segalés, J., & Sibila, M. (2020). Detection and genotyping of Porcine circovirus 2 (PCV-2) and detection of

Porcine circovirus 3 (PCV-3) in sera from fattening pigs of different European countries. Transboundary and emerging diseases, 67(6), 2521–2531. https://doi.org/10.1111/tbed.13596
252. Sarchese, V., Profio, F., Robetto, S., Orusa, R., Vuillermoz, B., Pellegrini, F., Marsilio, F., Martella, V., & Martino, B. (2025). Molecular Survey for Major Canine Enteric Viral Pathogens in Wild Carnivores, Northwestern Italy. Veterinary Sciences, 12(9), 814. https://doi.org/10.3390/vetsci12090814
253. Sari, P., Saragih, A., Pasaribu, A., & Lestari, F. (2024). Canine Parvovirus Infection in Dogs: Pathogenesis, Clinical Symptoms and Vaccination. Buletin Veteriner Udayana. https://doi.org/10.24843/bvu.v16i1.110
254. Scandura, M., Iacolina, L., & Apollonio, M. (2011). Genetic diversity in the European wild boar Sus scrofa: Phylogeography, population structure, and wild x domestic hybridization. Mammal Rev, 41, 125-137. https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2010.00182.x
255. Segalés, J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. Virus Research, 164(1–2), 10–19. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.007
256. Segalés, J., Allan, G. M., & Domingo, M. (2005). Porcine circovirus diseases. Animal health research reviews, 6(2), 119–142. https://doi.org/10.1079/ahr2005106
257. Segev, G., Yaaran, T., Maurice, S., & Baneth, G. (2022). Effect of sampling site on the diagnosis of canine parvovirus infection in dogs using polymerase chain reaction. Journal of veterinary internal medicine, 36(2), 591–598. https://doi.org/10.1111/jvim.16373
258. Shi, J., Pei, Y., Yu, Q., & Dong, H. (2023). Progress in the study of parvovirus entry pathway. Virology Journal, 20. https://doi.org/10.1186/s12985-023-02016-z
259. Shi, R., Hou, L., Wei, L., Quan, R., Zhou, B., Jiang, H., Wang, J., Zhu, S., Song, J., Wang, D., & Liu, J. (2021). Porcine Circovirus Type 3 Enters Into PK15 Cells Through Clathrin- and Dynamin-2-Mediated Endocytosis in a Rab5/Rab7 and pH-Dependent Fashion. Frontiers in Microbiology, 12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.636307
260. Simon, U., Gerhards, K., Becker, S., Willems, H., Friedrichs, V., Forth, J. H., Calvelage, S., Blome, S., & Reiner, G. (2024). Genetic differentiation of wild boar populations in a region affected by African swine fever. European Journal of Wildlife Research, 70, Article 54. https://doi.org/10.1007/s10344-024-01807-1
261. Sliz, I., Vlasakova, M., Jackova, A., & Vilcek, S. (2015). Characterization of porcine parvovirus type 3 and porcine circovirus type 2 in wild boars (Sus scrofa) in Slovakia. Journal of Wildlife Diseases, 51(3), 703–711. https://doi.org/10.7589/2015-01-005
262. Šolaja, S., Glišić, D., & Milićević, V. (2025). Prevalence of porcine circoviruses 2 and 3 in wild boar in Serbia. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 37(4), 674-678. https://doi.org/10.1177/10406387251325534
263. Steinel, A., Parrish, C. R., Bloom, M. E., & Truyen, U. (2001). Parvovirus infections in wild carnivores. Journal of Wildlife Diseases, 37(3), 594–607. https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.3.594

264.Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., & Mankertz, A. (2006). Demonstration of Nicking/Joining Activity at the Origin of DNA Replication Associated with the Rep and Rep′ Proteins of Porcine Circovirus Type 1. Journal of Virology, 80, 6225-6234. https://doi.org/10.1128/JVI.02506-05
265.Streck, A. F., & Truyen, U. (2020). Porcine parvovirus. Current Issues in Molecular Biology, 37, 33–46. https://doi.org/10.21775/cimb.037.033
266.Streck, A. F., Canal, C. W., & Truyen, U. (2015). Molecular epidemiology and evolution of porcine parvoviruses. Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 36, 300-306. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.10.007
267.Sun, J., Huang, L., Wei, Y., Wang, Y., Chen, D., Du, W., Wu, H., & Liu, C. (2015). Prevalence of emerging porcine parvoviruses and their co-infections with porcine circovirus type 2 in China. Archives of Virology, 160(5), 1339-1344. https://doi.org/10.1007/s00705-015-2373-7
268.Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular biology and evolution, 38(7), 3022-3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120
269.Tan, C. Y., Thanawongnuwech, R., Arshad, S. S., Hassan, L., Fong, M. W. C., & Ooi, P. T. (2022). Genotype shift of Malaysian porcine circovirus 2 (PCV2) from PCV2b to PCV2d within a decade. Animals, 12(14), 1849. https://doi.org/10.3390/ani12141849
270.Tang, Y., Tang, N., Zhu, J., Wang, M., Liu, Y., & Lyu, Y. (2022). Molecular characteristics and genetic evolutionary analyses of circulating parvoviruses derived from cats in Beijing. BMC Veterinary Research, 18(1), 195. https://doi.org/10.1186/s12917-022-03281-w
271.Tattersall, P., Cotmore, S. F., & Bloom, M. E. (2013). Parvoviruses. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), Fields Virology (6th ed., pp. 1768–1823). Lippincott Williams & Wilkins.
272.Tochetto, C., Lima, D., Varela, A., Loiko, M., Paim, W., Scheffer, C., Herpich, J., Cerva, C., Schmitd, C., Cibulski, S., Santos, A., Mayer, F., & Roehe, P. (2018). Full-Genome Sequence of Porcine Circovirus type 3 recovered from serum of sows with stillbirths in Brazil. Transboundary and Emerging Diseases, 65, 5-9. https://doi.org/10.1111/tbed.12735
273.Torretta, E., Riboldi, L., Costa, E., Delfoco, C., Frignani, E., & Meriggi, A. (2021). Niche partitioning between sympatric wild canids: The case of the golden jackal (Canis aureus) and the red fox (Vulpes vulpes) in north-eastern Italy. BMC Ecology and Evolution, 21, Article 129. https://doi.org/10.1186/s12862-021-01860-3
274.Truyen U. (1999). Emergence and recent evolution of canine parvovirus. Veterinary microbiology, 69(1-2), 47–50. https://doi.org/10.1016/s0378-1135(99)00086-3
275.Truyen, U., & Parrish, C. R. (2013). Feline panleukopenia virus: its interesting evolution and current problems in immunoprophylaxis against a serious pathogen. Veterinary microbiology, 165(1-2), 29–32. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.005
276.Truyen, U., Müller, T., Heidrich, R., Tackmann, K., & Carmichael, L. (1998). Survey on viral pathogens in wild red foxes (Vulpes vulpes) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. Epidemiology and Infection, 121, 433-440. https://doi.org/10.1017/S0950268898001319

277.Tsunoda, H. (2022). Niche Overlaps and Partitioning Between Eurasian Golden Jackal Canis aureus and Sympatric Red Fox Vulpes vulpes. Proc Zool Soc, 75, 143-151. https://doi.org/10.1007/s12595-022-00431-8
278.Tucciarone, C. M., Franzo, G., Legnardi, M., Lazzaro, E., Zoia, A., Petini, M., Furlanello, T., Caldin, M., Cecchinato, M., & Drigo, M. (2021). Genetic Insights into Feline Parvovirus: Evaluation of Viral Evolutionary Patterns and Association between Phylogeny and Clinical Variables. Viruses, 13(6), 1033. https://doi.org/10.3390/v13061033
279.Turan, T., & Işıdan, H. (2020). Molecular characterization of canine astrovirus, vesivirus and circovirus, isolated from diarrheic dogs in Turkey. Iranian Journal of Veterinary Research, 21(3), 172–179.
280.Turlewicz-Podbielska, H., Augustyniak, A., & Pomorska-Mól, M. (2022). Novel Porcine Circoviruses in View of Lessons Learned from Porcine Circovirus Type 2-Epidemiology and Threat to Pigs and Other Species. Viruses, 14. https://doi.org/10.3390/v14020261
281.Uhl, L. K., & Fasina, O. O. (2025). Parvovirus RNA Processing: Compact Genomic Organization and Unique Alternative mRNA Processing Mechanisms. Viruses, 17(7), 984. https://doi.org/10.3390/v17070984
282.Urbani, L., Tryland, M., Ehrich, D., Fuglei, E., Battilani, M., & Balboni, A. (2021). Ancient origin and genetic segregation of canine circovirus infecting arctic foxes (Vulpes lagopus) in Svalbard and red foxes (Vulpes vulpes) in Northern Norway. Transboundary and Emerging Diseases, 68(3), 1283-1293. https://doi.org/10.1111/tbed.13783
283.Van Kruiningen, H. J., Heishima, M., Kerr, K. M., Garmendia, A. E., Helal, Z., & Smyth, J. A. (2019). Canine circoviral hemorrhagic enteritis in a dog in Connecticut. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 31(5), 732–736. https://doi.org/10.1177/1040638719863102
284.Vargas-Bermudez, D. S., Mogollon, J. D., Franco-Rodriguez, C., & Jaime, J. (2023). The Novel Porcine Parvoviruses: Current State of Knowledge and Their Possible Implications in Clinical Syndromes in Pigs. Viruses, 15(12), 2398. https://doi.org/10.3390/v15122398
285.Vargas-Bermudez, D., Prandi, B., Souza, U., Durães-Carvalho, R., Mogollón, J., Campos, F., Roehe, P., & Jaime, J. (2024). Molecular Epidemiology and Phyloevolutionary Analysis of Porcine Parvoviruses (PPV1 through PPV7) Detected in Replacement Gilts from Colombia. International Journal of Molecular Sciences, 25. https://doi.org/10.3390/ijms251910354
286.Vargas-Ruíz, A., Araiza-Hernández, D., González-Díaz, F., Marín-Flamand, E., Betancourt, J., Sánchez-Mendoza, A., & García-Camacho, L. (2025). Phylogenetic analysis and molecular structure of NS1 proteins of porcine parvovirus 5 isolates from Mexico. Archives of Virology, 170. https://doi.org/10.1007/s00705-024-06182-5
287.Varsani, A., Harrach, B., Roumagnac, P., Benkő, M., Breitbart, M., Delwart, E., Franzo, G., Kazlauskas, D., Rosario, K., Segalés, J., Dunay, E., Rukundo, J., Goldberg, T. L., Fehér, E., Kaszab, E., Bányai, K., & Krupovic, M. (2024). 2024 taxonomy update for the family Circoviridae. Archives of Virology, 169, 176. https://doi.org/10.1007/s00705-024-06107-2

288.Vicente, J., Segalés, J., Höfle, U., Balasch, M., Plana-Durán, J., Domingo, M., & Gortázar, C. (2004). Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (Sus scrofa). Veterinary Research, 35(2), 243–253. https://doi.org/10.1051/vetres:2004008
289.Vieira, F. V., Hoffmann, D. J., Fabri, C. U. F., Bresciani, K. D. S., Gameiro, R., Flores, E. F., & Cardoso, T. C. (2017). Circulation of canine parvovirus among dogs living in human-wildlife interface in the Atlantic forest biome, Brazil. Heliyon, 3(9), e00491. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00491
290.Minh, H., Villanueva, B. H. A., & Chuang, K.-P. (2026). Detection of canine circovirus (CanineCV) co-infection in canine parvovirus 2 (CPV-2) cases among domestic dogs in Vietnam, 2023–2024. Archives of Virology, 171(6), Article 196. https://doi.org/10.1007/s00705-026-06661-x
291.Walter-Weingärtner, J., Bergmann, M., Weber, K., Truyen, U., Muresan, C., & Hartmann, K. (2021). Comparison of Eight Commercially Available Faecal Point-of-Care Tests for Detection of Canine Parvovirus Antigen. Viruses, 13(10), 2080. https://doi.org/10.3390/v13102080
292.Wang, D., Mai, J., Yang, Y., & Wang, N. (2020). Porcine Parvovirus 7: Evolutionary Dynamics and Identification of Epitopes toward Vaccine Design. Vaccines, 8(3), 359. https://doi.org/10.3390/vaccines8030359
293.Wang, D., Mai, J., Yang, Y., Xiao, C., & Wang, N. (2022). Current knowledge on epidemiology and evolution of novel porcine circovirus 4. Veterinary Research, 53. https://doi.org/10.1186/s13567-022-01053-w
294.Wang, D., Zhou, W., He, Q., Bai, Y., Zhang, L., Zhan, Y., Yang, Y., & Wang, N. (2025). Amino acid mutations of porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid protein increase virus binding to host and evade immune responses: An evaluation of viral evolution. Virulence, 16. https://doi.org/10.1080/21505594.2025.2535472
295.Wang, H., Zhang, K., Lin, C., Zhou, J., Jin, Y., Dong, W., Gu, J., & Zhou, J. (2019a). Conformational Changes and Nuclear Entry of Porcine Circovirus without Disassembly. Journal of Virology, 93. https://doi.org/10.1128/JVI.00824-19
296.Wang, L., Li, Y., Guo, Z., Yi, Y., Zhang, H., Shangguan, H., Huang, C., & Ge, J. (2021). Genetic changes and evolutionary analysis of canine circovirus. Archives of Virology, 166, 1815–1826. https://doi.org/10.1007/s00705-021-05125-8
297.Wang, W., Cao, L., Sun, W., Xin, J., Zheng, M., Tian, M., Lu, H., & Jin, N. (2019b). Sequence and phylogenetic analysis of novel porcine parvovirus 7 isolates from pigs in Guangxi. China. PloS One, 14(7), 0219560. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219560
298.Wang, Y., Yang, K., Wang, J., Wang, X., Zhao, L., Sun, P., & Li, Y. (2019c). Detection and molecular characterization of novel porcine parvovirus 7 in Anhui province from Central-Eastern China. Infection, Genetics and Evolution, 71, 31–35. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.004
299.Wei, R., Xie, J., Theuns, S., & Nauwynck, H. (2019). Changes on the viral capsid surface during the evolution of porcine circovirus type 2 (PCV2) from 2009 till 2018 may lead to a better receptor binding. Virus Evolution, 5. https://doi.org/10.1093/ve/vez026
300.Weissenbacher-Lang, C., Kristen, T., Mendel, V., Brunthaler, R., Schwarz, L., & Weissenböck, H. (2020). Porcine circovirus type 2 (PCV2) genotyping in Austrian pigs

in the years 2002 to 2017. BMC Veterinary Research, 16(1), 198. https://doi.org/10.1186/s12917-020-02413-4

301. Wen, S., Song, Y., Lv, X., Meng, X., Liu, K., Yang, J., Diao, F., He, J., Huo, X., Chen, Z., & Zhai, J. (2022). Detection and Molecular Characterization of Porcine Parvovirus 7 in Eastern Inner Mongolia Autonomous Region, China. Frontiers in Veterinary Science, 9, 930123. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.930123

302. Wen, S., Sun, W., Li, Z., Zhuang, X., Zhao, G., Xie, C., Zheng, M., Jing, J., Xiao, P., Wang, M., Han, J., Ren, J., Liu, H., Lu, H., & Jin, N. (2018). The detection of porcine circovirus 3 in Guangxi. China. Transboundary and Emerging Diseases, 65(1), 27-31. https://doi.org/10.1111/tbed.12754

303. Wolter, S., Richards, R., & Armentrout, R. (1980). Cell cycle-dependent replication of the DNA of minute virus of mice, a parvovirus. Biochimica et Biophysica Acta, 607 3, 420-431. https://doi.org/10.1016/0005-2787(80)90152-5

304. Xiao, C. T., Gerber, P. F., Giménez-Lirola, L. G., Halbur, P. G., & Opriessnig, T. (2013a). Characterization of porcine parvovirus type 2 (PPV2) which is highly prevalent in the USA. Veterinary Microbiology, 161(3-4), 325-330. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.038

305. Xiao, C. T., Giménez-Lirola, L. G., Halbur, P. G., & Opriessnig, T. (2012). Increasing porcine PARV4 prevalence with pig age in the U.S. pig population. Veterinary Microbiology, 160(3-4), 290-296. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.038

306. Xiao, C. T., Giménez-Lirola, L. G., Jiang, Y. H., Halbur, P. G., & Opriessnig, T. (2013b). Characterization of a novel porcine parvovirus tentatively designated PPV5. PloS one, 8(6), 65312. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065312

307. Xie, C., Tao, Y., Zhang, Y., Zhang, P., Zhu, X., Ha, Z., Zhang, H., Xie, Y., Xia, X., Jin, N., & Li, Y. (2022). Codon usage for genetic diversity, and evolutionary dynamics of novel porcine parvoviruses 2 through 7 (PPV2–PPV7). Viruses, 14(2), 170. https://doi.org/10.3390/v14020170

308. Xie, Q., Wang, J., Gu, C., Wu, J., & Liu, W. (2023). Structure and function of the parvoviral NS1 protein: A review. Virus Genes, 59(2), 195–203. https://doi.org/10.1007/s11262-022-01944-2

309. Xing, X., Zhou, H., Tong, L., Chen, Y., Sun, Y., Wang, H., & Zhang, G. (2018). First identification of porcine parvovirus 7 in China. Archives of Virology, 163(1), 209-213. https://doi.org/10.1007/s00705-017-3585-9

310. Xu, D., Du, Q., Han, C., Wang, Z., Zhang, X., Wang, T., Zhao, X., Huang, Y., & Tong, D. (2016). Signaling modulation of cell cycle arrest and viral replication in porcine circovirus type 2 infection cells. Veterinary Research, 47, 53. https://doi.org/10.1186/s13567-016-0403-4

311. Yang, J., Kim, C. H., Jang, G., & Lee, C. (2024b). Molecular epidemiological surveillance and complete genome analysis of porcine circoviruses in wild boars (Sus scrofa) in Gyeongnam Province, South Korea. Journal of Veterinary Science, 25(6), 79. https://doi.org/10.4142/jvs.24252

312. Yang, K., Wang, Z., Wang, X., Bi, M., Hu, S., Li, K., Pan, X., Wang, Y., Ma, D., & Mo, X. (2024a). Epidemiological investigation and analysis of the infection of porcine

circovirus in Xinjiang. Virology journal, 21(1), 230. https://doi.org/10.1186/s12985-024-02504-w
313. Yeo, Y. G., Kim, H. R., Park, J., Kim, J. M., Shin, Y. K., Lee, K. K., Kwon, O. K., Jeoung, H. Y., Kang, H. E., Ku, B. K., Park, S. C., Kwon, O. D., & Park, C. K. (2023). Epidemiological and Molecular Approaches for a Fatal Feline Panleukopenia Virus Infection of Captive Siberian Tigers (Panthera tigris altaica) in the Republic of Korea. Animals : an open access journal from MDPI, 13(18), 2991. https://doi.org/10.3390/ani13182991
314. Yin, X., Zhang, S., Gao, Y., Li, J., Tan, S., Liu, H., Wu, X., Chen, Y., Liu, M., & Zhang, Y. (2012). Characterization of monoclonal antibodies against waterfowl parvoviruses VP3 protein. Virology Journal, 9, 288-288. https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-288
315. Young, P., Jensen, K., Burger, L., Pintel, D., & Lorson, C. (2002). Minute Virus of Mice NS1 Interacts with the SMN Protein, and They Colocalize in Novel Nuclear Bodies Induced by Parvovirus Infection. Journal of Virology, 76, 3892-3904. https://doi.org/10.1128/JVI.76.8.3892-3904.2002
316. Yuan, L., Liu, Y., Chen, Y., Gu, X., Dong, H., Zhang, S., Han, T., Zhou, Z., Song, X., & Wang, C. (2020). Optimized real-time fluorescence PCR assay for the detection of porcine Circovirus type 3 (PCV3. BMC Veterinary Research, 16(1), 249. https://doi.org/10.1186/s12917-020-02435-y
317. Zaccaria, G., Malatesta, D., Scipioni, G., Felice, E., Campolo, M., Casaccia, C., Savini, G., Sabatino, D., & Lorusso, A. (2016). Circovirus in domestic and wild carnivores: An important opportunistic agent? Virology, 490, 69-74. https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.01.007
318. Zakrzewska, K., Arvia, R., Bua, G., Margheri, F., & Gallinella, G. (2023). Parvovirus B19: Insights and implication for pathogenesis, prevention and therapy. Aspects of Molecular Medicine, 1, 100007-100017. https://dx.doi.org/10.1016/j.amolm.2023.100007
319. Zhang, H., Hu, W., Li, J., Liu, T., Zhou, J., Opriessnig, T., & Xiao, C. (2019b). Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China. Transboundary and Emerging Diseases. https://doi.org/10.1111/tbed.13446
320. Zhang, H., Luo, Q., Zheng, Y., Sha, H., Li, G., Kong, W., Huang, L., & Zhao, M. (2023). Genetic Variability and Recombination of the NSP2 Gene of PRRSV-2 Strains in China from 1996 to 2021. Veterinary Sciences, 10(5), 325. https://doi.org/10.3390/vetsci10050325
321. Zhang, J., Fan, J., Li, Y., Liang, S., Huo, S., Wang, X., Zuo, Y., Cui, D., Li, W., Zhong, Z., & Zhong, F. (2019a). Porcine Parvovirus Infection Causes Pig Placenta Tissue Damage Involving Nonstructural Protein 1 (NS1)-Induced Intrinsic ROS/Mitochondria-Mediated Apoptosis. Viruses, 11. https://doi.org/10.3390/v11040389
322. Zhang, R., Li, H., Xie, H., Hou, X., Zhou, L., Cao, A., Zeshan, B., Zhou, Y., & Wang, X. (2024). Comparing the molecular evolution and recombination patterns of predominant PRRSV-2 lineages co-circulating in China. Frontiers in Microbiology, 15, 1398470. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1398470
323. Zhang, X., Zheng, C., Lv, Z., Xue, S., Chen, Y., Liu, Y., Huang, X., Luo, G., Yang, X., & Dai, A. (2022b). Genetic and epidemic characteristics of porcine parvovirus 7 in the Fujian and

Guangdong regions of southern China. Frontiers in Veterinary Science, 9. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.949764

324.Zhang, Y., Shao, Z., Gao, Y., Fan, B., Yang, J., Chen, X., Zhao, X., Shao, Q., Zhang, W., Cao, C., Liu, H., & Gan, J. (2022a). Structures and implications of the nuclease domain of human parvovirus B19 NS1 protein. Computational and Structural Biotechnology Journal, 20, 4645-4655. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.08.047

325.Zhao, D., Lin, H., Huang, Z., Zhou, Y., Qi, W., Cui, M., Qiu, M., Zhu, J., & Chen, N. (2024). Positivity Status and Molecular Characterization of Porcine Parvoviruses 1 Through 8 (PPV1-PPV8) from Slaughtered Pigs in China. Animals : an open access journal from MDPI, 14(22), 3238. https://doi.org/10.3390/ani14223238

326.Zhao, X., Xiang, H., Bai, X., Fei, N., Huang, Y., Song, X., Zhang, H., Zhang, L., & Tong, D. (2016). Porcine parvovirus infection activates mitochondria-mediated apoptotic signaling pathway by inducing ROS accumulation. Virology Journal, 13, Article 26. https://doi.org/10.1186/s12985-016-0480-z

327.Zhou, H., Zhang, H., Su, X., Xu, F., Xiao, B., Zhang, J., Qi, Q., Lin, L., Cui, K., Li, Q., Li, S., & Yang, B. (2025a). Identification of Host-Protein Interaction Network of Canine Parvovirus Capsid Protein VP2 in F81 Cells. Microorganisms, 13. https://doi.org/10.3390/microorganisms13010088

328.Zhou, J., Dai, Y., Lin, C., Zhang, Y., Feng, Z., Dong, W., Jin, Y., Yan, Y., Zhou, J., & Gu, J. (2020). Nucleolar protein NPM1 is essential for circovirus replication by binding to viral capsid. Virulence, 11, 1379-1393. https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1832366

329.Zhou, Z., Shi, X., Li, K., Hu, Q., Ren, Y., Zhou, X., Li, M., Zhang, T., Yang, F., Huang, Y., Wang, C., Li, D., Zhong, Z., Liu, H., Li, C., He, T., & Peng, G. (2025b). First identification of CPV-2c infection in a wild cub giant panda (Ailuropoda melanoleuca) suggesting an emerging transmission from wildlife and domestic dogs. Transboundary and Emerging Diseases, 2025, 6716483. https://doi.org/10.1155/tbed/6716483

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Дамир Бенковић

број уписа 2019/5009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

МОЛЕКУЛАРНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПАРВОВИРУСА И ЦИРКОВИРУСА ДЕТЕКТОВАНИХ У ПОПУЛАЦИЈАМА ДИВЉИХ СВИЊА И МЕСОЈЕДА НА ТЕРИТОРИЈИ ЗАПАДНОБАЧКОГ ОКРУГА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 02.11.2026.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Дамир Бенковић

Број уписа 2019/5009

Студијски програм Докторске академске студије

Наслов рада МОЛЕКУЛАРНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПАРВОВИРУСА И ЦИРКОВИРУСА ДЕТЕКТОВАНИХ У ПОПУЛАЦИЈАМА ДИВЉИХ СВИЊА И МЕСОЈЕДА НА ТЕРИТОРИЈИ ЗАПАДНОБАЧКОГ ОКРУГА

Ментор Проф. др Андреа Радаљ

Потписани Дамир Бенковић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 02.11.2026



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Молекуларна карактеризација парвовируса и цирковируса детектованих у популацијама дивљих свиња и месоједа на територији Западнобачког округа

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 02.11.2026.

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.