

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΚΤΡΟΦΗΣ ΖΩΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΙΟΓΕΝΟΥΣ
ΔΙΑΡΡΟΙΑΣ ΤΩΝ ΒΟΟΕΙΔΩΝ (ΙΔΒ) Ή ΝΟΣΟΥ ΤΩΝ
ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΩΝ (NB) ΣΕ ΑΓΕΛΛΑΔΕΣ
ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

ΤΣΕΛΙΚΗΣ ΑΘ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Συμβουλευτική Επιτροπή

Εισηγήτρια: Ξυλούρη Ε., Αν. Καθηγήτρια
Σωτηράκογλου Κ., Αν. Καθηγήτρια
Χαρισμάδου Μ., Λέκτορας

Αθήνα, Μάρτιος 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς όλα τα μέλη Δ.Ε.Π του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, που μου παρείχαν τη δυνατότητα να συνεχίσω τις σπουδές μου. Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων του Γ.Π.Α.

Ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ε. Ξυλούρη για την εμπιστοσύνη της να μου αναθέσει την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη, καθώς και για την επίβλεψη και την καθοδήγηση της, στην υλοποίησή της.

Ευχαριστώ επίσης την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Σ. Χαδιώ για την απλόχερη βοήθεια της σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω προς τα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής, κ.κ. Κ. Σωτηράκογλου και Μ. Χαρισμιάδου για τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους.

Ευχαριστώ θερμά τη συνάδελφο Ρ. Μπάτζιου, η συμβολή της οποίας στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης ήταν καθοριστική.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συναδέλφους στο Εργαστήριο Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων και ιδιαίτερα τον κ. Θ. Βαγγελή.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου.

ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ...

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus (Ιός της Ιογενούς Διάρροιας των Βοοειδών)
MD	Mucosal Disease (Νόσος των Βλεννογόνων)
IBR	Infectious Bovine Rhinotracheitis (Λοιμώδης Ρινοτραχειίτιδα των Βοοειδών)
BoHV-1	Bovine Herpes Virus-1 (Βόειος Ερπητοϊός-1)
PI-3	Parainfluenza-3 (Ιός της Παραγρίπης)
BRSV	Bovine Respiratory Syncytial Virus (Βόειος Αναπνευστικός Συγκυτιακός Ιός)
BRV	Border Disease Virus (Ιός της Νόσου Border των Προβάτων)
BRD	Bovine Respiratory Disease (Αναπνευστική Νόσος των Βοοειδών)
ΚΚΠ	Κακοήθης Καταρροϊκός Πυρετός
IRES	Internal Ribosomal Entry Site (Εσωτερικό Σημείο Πρόσδεσης των Ριβοσωμάτων)
ORF	Open Reading Frame (Ανοικτό Αναγνωστικό Πλαίσιο)
Ι.Δ.Β	Ιογενής Διάρροια των Βοοειδών
Λ.Ρ.Β	Λοιμώδης Ρινοτραχειίτιδα των Βοοειδών
ΑΑΠ	Ανοικτό Αναγνωστικό Πλαίσιο
ncpBVDV	Μη κυτταροπαθογόνο BVDV στέλεχος
cpBVDV	Κυτταροπαθογόνο BVDV στέλεχος
Φ.Ο.	Φυσική Οχεία
Τ.Σ.	Τεχνητή Σπερματέγχυση

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A/A	Τίτλος	Σελίδα
A	Περίληψη	1
B	Abstract	3
Γ	ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	5
	2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
	2.1 Ιστορική αναδρομή	7
	2.2 Ευπάθεια	8
	2.3 Ταξινόμηση	9
	2.3.1 Μορφολογία	11
	2.3.2 Φυσικές και χημικές ιδιότητες του ιού	11
	2.3.3 Βιολογικές ιδιότητες	12
	2.3.4 Αντιγονική συγγένεια	12
	2.4 Γονιδίωμα και πρωτεΐνες	13
	2.4.1 Δομικές πρωτεΐνες	14
	2.4.2 Μη δομικές πρωτεΐνες	15
	2.5 Πρακτική σημασία του διαχωρισμού σε γενότυπους και βιότυπους	16
	2.6 Επιζωοτιολογία	18
	2.6.1 Μετάδοση ατομικά σε μια εκτροφή	18
	2.6.1.1 Μετάδοση από επίμονα μολυσμένα ζώα	18
	2.6.1.2 Μετάδοση από παροδικά μολυσμένα ζώα	18
	2.6.1.3 Άλλοι τρόποι μετάδοσης	18
	2.6.2 Μετάδοση μεταξύ των εκτροφών	19

	2.6.2.1 Ρόλος της έμμεσης μετάδοσης	20
	2.6.2.2 Ρόλος βιολογικών προϊόντων	20
	2.6.2.3 Ρόλος των ξενιστών, όχι βοοειδών	21
	2.7 Παθογένεια	23
	2.7.1 Κύκλος ζωής του BVDV	23
	2.7.1.1 Μετάφραση και μεταγραφή	24
	2.7.1.2 Ρύθμιση της μετάφρασης και μεταγραφής	25
	2.7.1.3 Σχηματισμός του ιού και εξωκυττάρωση	26
	2.7.1.4 Σημεία αντιγραφής	26
	2.7.2 Παθογένεια	26
	2.7.2.1 Οξεία λοίμωξη	27
	2.7.2.2 Διαπλακούντια / Ενδομήτρια μόλυνση	30
	2.7.2.2.1 Έκθεση της μήτρας στον BVDV κατά τη σπερματέγχυση	31
	2.7.2.3 Μόλυνση του εμβρύου	32
	2.7.2.4 Επίμονη μόλυνση	35
	2.7.2.5 Νόσος των βλεννογόνων	36
	2.8 Ανοσοποιητικό σύστημα και BVDV	41
	2.8.1 Πρωτογενής ανοσολογική αντίδραση	41
	2.8.2 Χυμική ανοσία	42
	2.8.3 Μητρική ανοσία	42
	2.8.4 Κυτταρική ανοσία	43
	2.8.5 Ανοσολογική ανταπόκριση των επίμονα μολυσμένων ζώων	44
	2.8.6 Ανοσοκαταστολή και δευτερογενείς λοιμώξεις	44

	2.9 Συμπτωματολογία	47
	2.9.1 Οξεία ΙΔΒ	47
	2.9.2 Νόσος των βλεννογόνων	50
	2.9.3 Συμπτώματα από το αναπαραγωγικό σύστημα	50
	2.9.4 Διάρκεια και σοβαρότητα των συμπτωμάτων	51
	2.10 Δημόσια υγεία	52
	2.11 Διάγνωση	53
	2.11.1 Άμεση ανίχνευση αντιγόνων	54
	2.11.1.1 Ανοσοφθορισμός	54
	2.11.1.2 Ανοσοϊστοχημεία των περιφερικών λευκοκυττάρων	54
	2.11.1.3 Ανοσοϊστοχημεία των βιοψιών του δέρματος	54
	2.11.1.4 Ανοσοενζυματικές μέθοδοι (ELISA)	55
	2.11.2 Απομόνωση του ιού	55
	2.11.3 Ανίχνευση αντισωμάτων	56
	2.11.3.1 Δοκιμή εξουδετέρωσης του ιού	57
	2.11.3.2 ELISA	57
	2.11.3.3 Ανοσοϋπεροξειδάση και ανοσοφθορισμός	57
	2.11.3.4 RT-PCR	58
	2.11.4 Το γάλα ως διαγνωστικό δείγμα	58
	2.11.5 Έλεγχος για επίμονα μολυσμένα ζώα	58
	2.12 Συστήματα διαχείρισης και προγράμματα ελέγχου	61
	2.12.1 Μη συστηματικός έλεγχος – εμβολιασμοί	62

	2.12.1.1 εμβολιασμοί	63
	2.12.2 Συστηματικός έλεγχος	66
	2.12.2.1 Συστηματικός έλεγχος χωρίς εμβολιασμούς	67
	2.12.2.2 Συστηματικός έλεγχος και εμβολιασμοί	69
	2.13 Κατάσταση στην Ελλάδα	70
Δ	3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	73
	3.1 Υλικά και Μέθοδοι	74
	3.1.1 Σκοπός της έρευνας	74
	3.1.2 Περιοχές δειγματοληψίας	74
	3.1.3 Συλλογή δειγμάτων	75
	3.1.4 Συλλογή επιζωοτιολογικών στοιχείων	76
	3.2 Ανίχνευση αντισωμάτων	76
	3.2.1 Περιγραφή της διαγνωστικής τεχνικής	76
	3.2.2 Διαδικασία	77
	3.2.3 Στατιστική ανάλυση	79
Ε	3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	80
	3.3.1 Παρουσία αντισωμάτων στις δύο κύριες κατηγορίες ζώων	82
	3.3.1.1 Μη εμβολιασμένα ζώα	82
	3.3.1.2 Εμβολιασμένα ζώα	83
	3.3.2 Μέθοδος γονιμοποίησης και BVDV	83
	3.3.3 Μέγεθος εκτροφής και BVDV	84
	3.3.4 Ύπαρξη του BVDV στις εκτροφές και εμφάνιση αποβολών	84
	3.3.5 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Α.Κ.Σ)	85
ΣΤ	3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	89

Z	3.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	93
H	3.6 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ – ΜΕΤΡΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΝΟΣΗΜΑΤΟΣ	94
Θ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	95
	Σύντομο Βιογραφικό υποψηφίου	120

ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΙΟΓΕΝΟΥΣ ΔΙΑΡΡΟΙΑΣ ΤΩΝ ΒΟΟΕΙΔΩΝ (Ι.Δ.Β) ή ΝΟΣΟΥ ΤΩΝ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΩΝ (NB) ΣΕ ΑΓΕΛΛΑΔΕΣ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Τμήμα Επιστήμης Ζωϊκής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, Ιερά Οδός 75, 118 55 , email: efxil@aua.gr

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Ιογενής Διάρροια των Βοοειδών (Ι.Δ.Β) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ιογενή νοσήματα των βοοειδών και παρουσιάζει παγκόσμια εξάπλωση. Προκαλείται από τον Ιό της Ιογενούς Διάρροιας των Βοοειδών (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV), που ταξινομείται στο γένος pestivirus, στην οικογένεια Flaviviridae. Η Ι.Δ.Β εκδηλώνεται με συμπτώματα από το πεπτικό, το αναπνευστικό, το ανοσοποιητικό και το αναπαραγωγικό σύστημα των ευαίσθητων ζώων. Η οξεία Ι.Δ.Β συχνά προκαλεί ήπια νόσο που χαρακτηρίζεται από παροδικό πυρετό και λευκοπενία, καθώς και συμπτώματα από το αναπνευστικό σύστημα και / ή διάρροια. Η οξεία μόλυνση των εγκύων ζώων μπορεί να προκαλέσει αποβολή, συγγενείς ανωμαλίες, γέννηση θνησιγενών ζώων ή τη γέννηση επίμονα μολυσμένων (persistently infected, PI) μόσχων, που παρουσιάζουν ανοσοανοχή και διασπείρουν τον ιό ισοβίως. Τα επίμονα μολυσμένα ζώα είναι μολυσμένα με μη-κυτταροπαθογόνο (non-cytopathogenic, ncp) στέλεχος BVDV και αν γίνει υπερμόλυνση από κυτταροπαθογόνο (cytopathogenic, cp) στέλεχος BVDV, αντιγονικά όμοιο προς το μη-κυτταροπαθογόνο στέλεχος, εκδηλώνεται η νόσος των βλεννογόνων (Mucosal Disease, MD).

Από προηγούμενη επιζωοτιολογική μελέτη για την ανίχνευση αντιγόνου BVDV, έχει αναφερθεί η παρουσία του ιού και στην Ελλάδα. Έκδηλη είναι η παρουσία του ιού και σε γειτονικές της Ελλάδας χώρες προκαλώντας σημαντικές οικονομικές απώλειες.

Σκοπός της παρούσης έρευνας ήταν η ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων κατά του BVDV σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής και η εκτίμηση του ισχύοντα επιπολασμού του νοσήματος στον Ελλαδικό χώρο. Η ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων κατέστη δυνατή με τη χρήση της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA. Για τους σκοπούς της έρευνας συλλέχθηκαν δείγματα από εκτροφές αγελάδων γαλακτοπαραγωγής στη Μακεδονία, τη Θράκη, τη Θεσσαλία, την Ήπειρο, τα Επτάνησα και την Αττική.

Συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν 460 δείγματα αίματος από τα οποία τα 264 βρέθηκαν θετικά (ύπαρξη αντισωμάτων κατά της μη ειδικής πρωτεΐνης NS3 του BVDV), ποσοστό της τάξης του 57,4%. Θετικά δείγματα εντοπίστηκαν σε 15 από τις 19 συνολικά υπό εξέταση εκτροφές (78,95%), από όλα τα γεωγραφικά διαμερίσματα της χώρας.

Από το σύνολο των ζώων τα 317 δεν ήταν εμβολιασμένα κατά του BVDV και από αυτά τα 190 ήταν θετικά, ποσοστό ίσο με 59,94%. Από τα 89 ζώα που ήταν

εμβολιασμένα κατά του BVDV τα 73 ήταν θετικά, ποσοστό ίσο με 82,02%. Το υψηλό ποσοστό αποδίδεται, είτε στον εμβολιασμό, είτε σε φυσική μόλυνση και δεν μπορεί να διαχωριστεί από τη χρησιμοποιηθείσα μέθοδο.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό οροθετικότητας μεταξύ των ζώων που γονιμοποιήθηκαν με τεχνητή σπερματέγχυση και αυτών που γονιμοποιήθηκαν με φυσική οχεία, με μεγαλύτερο ποσοστό οροθετικών ζώων στην πρώτη περίπτωση, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στη χρήση μη ελεγμένου σπέρματος για τον BVDV.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων εφαρμόστηκε η μέθοδος της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA). Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι δεν υφίσταται ιδιαίτερη γεωγραφική διάκριση στη μολυσματικότητα της ασθένειας. Παρατηρούνται όμως ομαδοποιήσεις με βάση ποσοτικές παραμέτρους.

Από τα αποτελέσματα είναι εμφανές ότι η μόλυνση από τον BVDV είναι διαδεδομένη στις εκτροφές του Ελλαδικού χώρου, καθώς σε όλες τις περιοχές της δειγματοληψίας εντοπίστηκαν θετικά ζώα. Έως σήμερα, δεν εφαρμόζεται συστηματικό πρόγραμμα ελέγχου και εξάλειψης της νόσου στην Ελλάδα.

Λέξεις κλειδιά: BVDV, αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, επιζωοτιολογία, Ελλάδα

SEROLOGICAL INVESTIGATION TO DETERMINE THE PREVALENCE OF BOVINE VIRAL DIARRHEA (BVD) or MUCOSAL DISEASE (MD) IN DAIRY COWS IN GREECE

Department of Animal Science and Aquaculture, Laboratory of Anatomy and Physiology of Farm Animals, Iera Odos 75, 118 55, email: efxil@aua.gr

ABSTRACT

Bovine Viral Disease is one of the most important viral diseases of cattle and has a world-wide distribution. It's caused by the Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and is classified to the genus pestivirus within the family Flaviviridae. BVD is emerged with symptoms from the digestive, respiratory, immune and reproductive system of the susceptible animals. Acute BVDV infections frequently cause mild disease characterized by transient fever and leukopenia, with respiratory symptoms and / or diarrhea. Acute infection of pregnant animals can result in abortion, congenital malformations, stillbirth, or generation of immunotolerant persistently infected (PI) calves, which shed the virus throughout their lives. PI animals are infected by a non-cytopathogenic (ncp) virus; when they are superinfected with a cytopathogenic (cp) BVDV antigenically related to the ncp strain, they develop the Mucosal Disease (MD).

From former epizootiological survey based on the detection of antigen against BVDV, it has been proven that BVDV is present in Greece. The presence of the virus is also manifested in neighbouring countries, causing significant economic losses.

The purpose of this research was to detect the presence of specific antibodies against BVDV in dairy cows in Greece and the estimation of the current prevalence of the disease in the country. The detection of the specific antibodies against BVDV was conducted with the use of ELISA assay. For the purposes of this research, blood samples were collected from dairy herds in Macedonia, Thrace, Thessaly, Epirus, the Ionian Islands and Attiki.

Totally, 460 sera were sampled and tested from which 264 were positive (detection of antibodies against non structural protein NS3 BVDV), which equals to 57,4%. Seropositive sera were detected in 15 out of the total 19 dairy farms (78,95%), in all regions of Greece.

317 cows were not vaccinated against BVDV and were found to be 59,94% seropositive. 89 cows were vaccinated against BVDV and were found to be 82,02% seropositive. This high percentage is attributed, either to vaccination, or to natural infection and cannot be estimated in this research.

A statistically significant difference— regarding seropositivity- was observed between cows that were artificially inseminated and those that were naturally served, which is probably due to the fact that semen is not tested for BVDV contamination.

For the evaluation of the obtained results, Principal Component Analysis (PCA) was applied. It was proven that there is no particular regional distinction in the infectivity of the disease. However, groupings are observed based on quantitative parameters.

Consequently, the results of this study clearly demonstrate that BVDV infection is present in a great extent in Greek herds and BVDV circulates in all regions of Greece, as antibodies against it were detected in all sampling areas. Up to date, no systemic control and eradication program against BVDV is applied in Greece.

Key Words: BVDV, dairy cows, epizootiology, Greece

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΙΟΓΕΝΗΣ ΔΙΑΡΡΟΙΑ ΤΩΝ ΒΟΟΕΙΔΩΝ (ΙΔΒ) – ΝΟΣΟΣ ΤΩΝ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΩΝ (NB)

BOVINE VIRAL DIARRHEA (BVD) – MUCOSAL DISEASE (MD)

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Ιογενής Διάρροια των Βοοειδών (ΙΔΒ) είναι μια πολύ σημαντική ιογενής νόσος των βοοειδών που χαρακτηρίζεται από προβλήματα στο αναπαραγωγικό και στο πεπτικό σύστημα των βοοειδών, με μεγάλες οικονομικές απώλειες για τις εκτροφές (Παπαδόπουλος Ο., 1998). Προκαλείται από τον Ιό της Ιογενούς Διάρροιας των Βοοειδών (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV) και εκδηλώνεται με συμπτώματα από το γαστρεντερικό, το αναπνευστικό, το ανοσοποιητικό και το αναπαραγωγικό σύστημα των ευαίσθητων ζώων. Η μόλυνση των αγελάδων από τον ιό κατά το πρώτο τρίμηνο της κυοφορίας μπορεί να καταλήξει στη γέννηση επίμονα μολυσμένων μόσχων (persistently infected, PI). Τα επίμονα μολυσμένα ζώα παραμένουν φορείς του ιού για όλη τη ζωή τους, παρουσιάζουν ανοσοανοχή στον ιό και αποτελούν εστία μόλυνσης για τα υγιή ζώα που βρίσκονται μαζί τους. Επιπλέον, σε μόσχους ηλικίας 6-24 μηνών που γεννήθηκαν με επίμονη μόλυνση, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί σποραδικά η θανατηφόρος νόσος των βλεννογόνων (NB).

Ο BVDV είναι ένα από τα πιο σημαντικά παθογόνα αίτια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ενός σοβαρού αναπνευστικού συνδρόμου των βοοειδών γνωστό ως «πυρετός της μεταφοράς». Ανήκει στη λίστα Β του καταλόγου του ΟΙΕ που περιλαμβάνει μεταδοτικές ασθένειες με κοινωνικο-οικονομική σημασία, οι οποίες είναι σημαντικές για το διεθνές εμπόριο ζωικού κεφαλαίου και ζωικών προϊόντων (Turin et al, 1999).

Ο BVDV παρουσιάζει παγκόσμια εξάπλωση και είναι υπεύθυνος για σημαντικές απώλειες που οφείλονται στο ίδιο το νόσημα (προβλήματα στην αναπαραγωγή, οξείες και επίμονες μολύνσεις, ανοσοκαταστολή και δευτερογενείς λοιμώξεις) αλλά και στους περιορισμούς στο εμπόριο των βοοειδών που αυτό συνεπάγεται. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η χαρακτηριστική ιδιότητα του ιού να μην προκαλεί κυτταροπαθόγνο αποτέλεσμα, συνέβαλλε σημαντικά στη διασπορά του διαμέσου του ορού εμβρύων μόσχων (fetal calf serum, FCS), κατά τη χρήση του στις καλλιέργειες των κυττάρων *in vitro*.

Το κρίσιμο σημείο για τον έλεγχο της Ι.Δ.Β. είναι η πρόληψη των εμβρυϊκών μολύνσεων στην αρχή της κυοφορίας. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν δύο διαφορετικές στρατηγικές: οι μέθοδοι ανοσοποίησης και τα μέτρα βιοασφάλειας, που συνεχώς εξελίσσονται και βελτιώνονται.

Η κατανόηση, όχι μόνο της βιολογίας του ιού, αλλά και κοινωνικών παραγόντων, όπως η συμπεριφορά των εκτροφέων και των καταναλωτών, καθώς και η συνεχής εγρήγορση των ελεγκτικών μηχανισμών, αποτελούν κρίσιμους παράγοντες για την επιτυχία των στρατηγικών ελέγχου της νόσου (A. Lindberg and H. Houe, 2005).

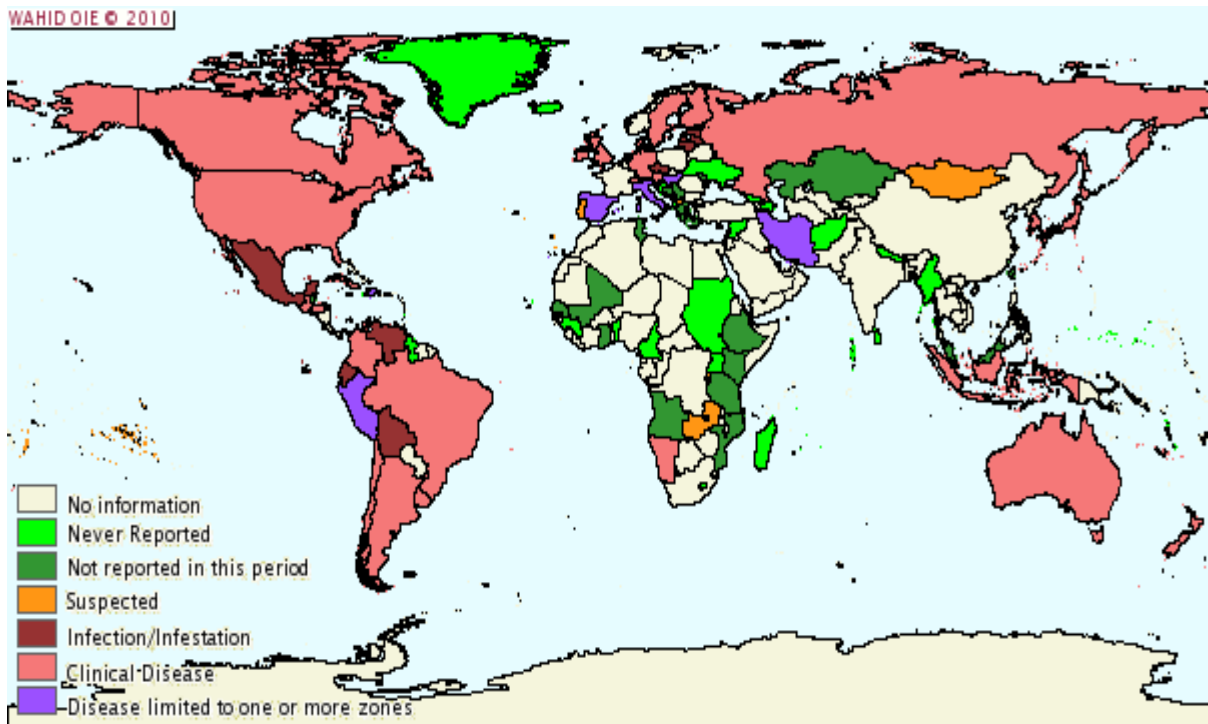
2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η Ιογενής Διάρροια των Βοοειδών (ΙΔΒ) περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Olafson et al (1946) στις Η.Π.Α. Οι αρχικές κλινικές περιγραφές της ΙΔΒ ήταν μιας σοβαρής νόσου που χαρακτηριζόταν από υψηλό πυρετό, διάρροια, αλλοιώσεις στους βλεννογόνους και λευκοπενία. Σε όλη όμως την περίοδο από το 1950 μέχρι το 1976 η νόσος διέφευγε της προσοχής στις ΗΠΑ επειδή στις ορολογικές μελέτες αποδεικνυόταν ότι οι ενήλικες αγελάδες παρουσίαζαν στον ορό τίτλους εξουδετερωτικών αντισωμάτων κατά του ιού της ΙΔΒ. Τα αποτελέσματα αυτά ερμηνεύονταν ότι η ΙΔΒ προσέβαλλε συχνά τα βοοειδή με υποκλινική ή ήπια μορφή και ήταν μικρής κλινικής σημασίας. Ως αποτέλεσμα της θεώρησης αυτής, ήταν η έλλειψη ενδιαφέροντος για εμβολιασμούς των γαλακτοπαραγωγών βοοειδών κατά του ιού της ΙΔΒ.

Κατά τη περίοδο αυτή, η χρησιμοποίηση ζωντανών τροποποιημένων εμβολίων (εμβόλια ΕΛΔ) κατά του BVDV κατέληγε συχνά στην εμφάνιση συμπτωμάτων ΙΔΒ σε ομάδες μοσχίδων, ηλικίας 1 έως 4 εβδομάδων. Παρόλο που αυτό αποθάρρυνε την περαιτέρω χρήση των εμβολίων, αποδόθηκε σε ατυχή συγκυρία και στο ότι οι μοσχίδες ήδη επώαζαν τον ιό. Αυτές οι υποξείες ή χρόνιες περιπτώσεις, συνήθως σε μοσχίδες, συχνά αποκαλούνταν Νόσος των Βλεννογόνων (NB), λόγω των εύκολα παρατηρούμενων αλλοιώσεων του στοματικού βλεννογόνου και των γαστρεντερικών αλλοιώσεων που παρατηρούνταν στη νεκροψία, καθώς και των χαρακτηριστικών κλινικών συμπτωμάτων όπως του πυρετού, της απώλειας βάρους και της διάρροιας (Ramsey and Chivers, 1953). Εργαστηριακοί περιορισμοί κατά τη χρονική αυτή περίοδο, ενέτειναν τη σύγχυση σχετικά με τη νόσο που αποκαλούνταν ΙΔΒ ή NB. Η διάγνωση βασιζόταν κυρίως στις ορολογικές δοκιμές εξουδετέρωσης του ιού και σε τεχνικές ανοσοφθορισμού σε ιστούς, παρά στην απομόνωση του ιού.

Την παραπάνω περίοδο (1950 – 1975), δεν ήταν δυνατή η επιβεβαίωση των επιδράσεων του ιού στο αναπαραγωγικό σύστημα και το έμβρυο. Πέρασαν δύο δεκαετίες μέχρι να ανακαλυφθεί η σχέση μεταξύ της ανοσοανοχής, της επίμονης μόλυνσης και της ανακάλυψης των 2 βιότυπων του ιού (McClurkin et al., 1984, Brownlie et al., 1984). Άλλα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά του BVDV, όπως η ανοσοκαταστολή, η ενδομήτρια μόλυνση με όλες τις συνέπειες της και η εμφάνιση της αιμορραγικής νόσου, ανακαλύφθηκαν επίσης σταδιακά (Done et al., 1980, Rebhun et al., 1989). Το 1967 συμφωνήθηκε ότι και τα δύο νοσήματα προκαλούνται από τον ίδιο αιτιολογικό παράγοντα και υιοθετήθηκε η ονομασία ΙΔΒ - NB.

Από το 1990, στις Σκανδιναβικές χώρες εφαρμόζονται προγράμματα εκρίζωσης της νόσου χωρίς τη διενέργεια εμβολιασμών, με πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα.



Εικόνα 2.1.1. Κατάσταση της ΙΒΒ / ΝΒ παγκόσμια (ΟΙΕ, 2010).

2.2 ΕΥΠΑΘΕΙΑ

Στους ξενιστές του BVDV περιλαμβάνονται όλα τα θηλαστικά ζώα της τάξης Αρτιοδάκτυλα, η οποία αποτελείται από 10 οικογένειες και 240 είδη (Grubb, 2005). Ενδείξεις μόλυνσης έχουν ανακαλυφθεί σε περισσότερα από 50 είδη (Nettleton, 1990, Van Campen et al., 2001, Grondahl et al., 2003).

Η πιθανή μόλυνση και άλλων ζωικών ειδών από τον BVDV πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν καταρτίζονται προγράμματα ελέγχου της ΙΒΒ.

2.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Ο Ιός της Ιογενούς Διάρροιας των Βοοειδών (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV), κατατάσσεται στο γένος pestivirus της οικογένειας Flaviviridae. Σύμφωνα με τη διεθνή επιτροπή ταξινόμησης των ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), έως σήμερα είναι αποδεκτά 4 είδη ιών του γένους pestivirus, ο Ιός της Ιογενούς Διάρροιας των Βοοειδών γενότυπος 1 (BVDV-1) και 2 (BVDV-2), ο Ιός της Κλασσικής Πανώλης του Χοίρου (Classical Swine Fever Virus, CSFV) και ο Ιός της νόσου Border του Προβάτου (Border Disease Virus, BDV), καθώς και ένα άτυπο είδος που αντιπροσωπεύεται από το στέλεχος H138 που απομονώθηκε από καμηλοπάρδαλη στη Κένυα (Plowright, 1969).

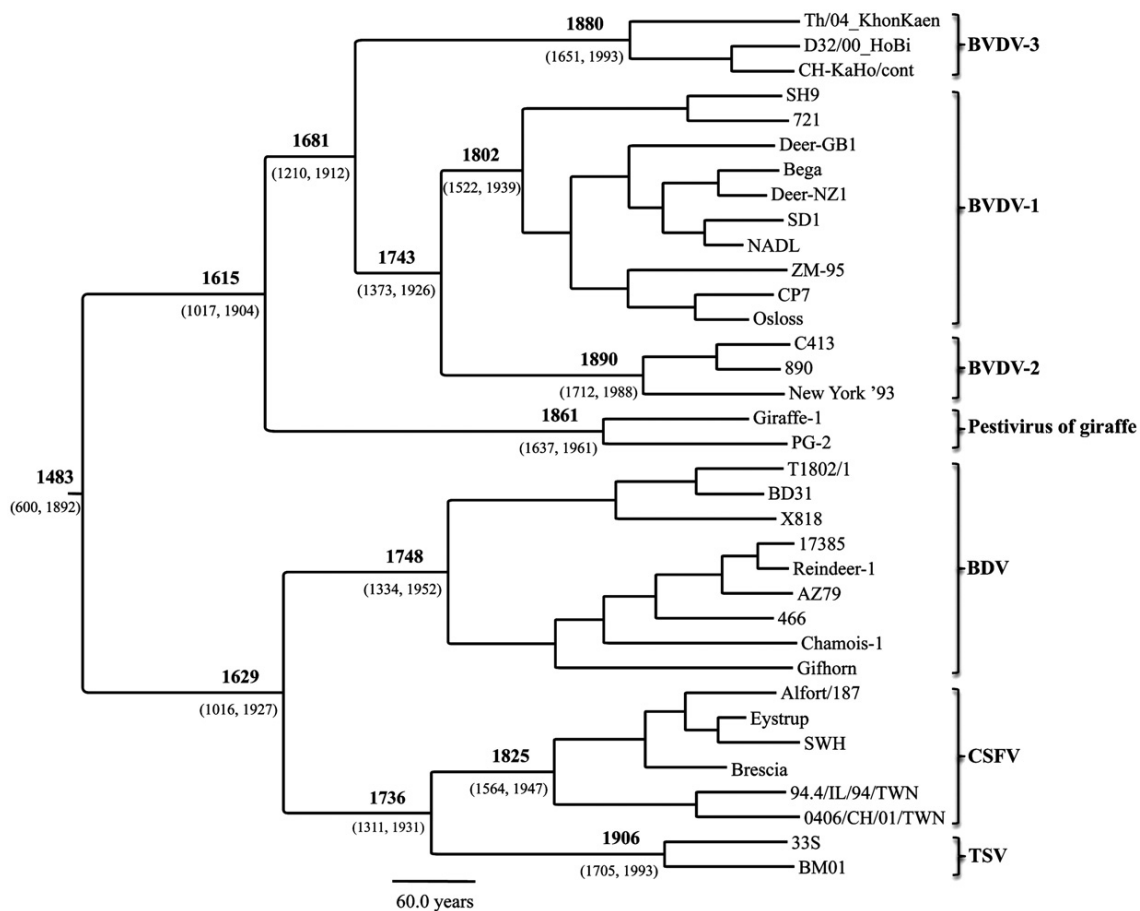
Το κρυπτόγραμμα της οικογένειας είναι: R/SS :4/L⁺: Se/S:I, V/Vc (C) /Ac, Di (Τσότσος Α., 1992).

Αρχικά τα είδη των ιών του γένους pestivirus ταξινομήθηκαν με βάση το ξενιστή στον οποίο εντοπίστηκαν, όμως η ταξινόμηση αυτή αποδείχτηκε προβληματική, καθώς με εξαίρεση τον CSFV που φαίνεται να προσβάλλει αποκλειστικά τους χοίρους, οι υπόλοιποι ιοί του γένους ξεπερνούν το φραγμό του είδους. Σήμερα, ο προσδιορισμός του είδους γίνεται με τη φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών των νουκλεοτιδίων του γονιδιώματος (Hofmann et al., 1994, Horasawa R., 1996, Becher et al., 1997, Ridpath and Bolin, 1997, Sullivan et al., 1997, Vilcek et al., 2001a, Lihong Liu et al., 2009). Από τη γενετική ανάλυση των ιών που χαρακτηρίζονται ως BVDV, προέκυψε ότι υπάρχουν 2 γενότυποι του ιού, ο BVDV-1 και ο BVDV-2 (γενότυπο ενός ιού, αποτελεί το στέλεχος που παρουσιάζει νουκλεοτιδική ετερογένεια >10%). Ο BVDV-2 προκαλεί παρόμοια κλινικά συμπτώματα με τον BVDV-1. Επιπλέον, στελέχη BVDV-2 μεγάλης λοιμογόνου δύναμης, μπορούν να προκαλέσουν την εμφάνιση της σοβαρής, οξείας ΙΔΒ (severe acute, SA BVD), η οποία μπορεί να εκδηλωθεί και με αιμορραγικό σύνδρομο, προκαλώντας μεγάλη θνησιμότητα στους πληθυσμούς των βοοειδών (Pellerin et al., 1994, Ridpath et al., 1994b).

Εκτός των παραπάνω στελεχών, έχουν απομονωθεί αρκετά ακόμη άτυπα στελέχη του γένους pestivirus ('HoBi like viruses' κ.α.) για τα οποία δεν έχει ακόμη καθοριστεί η ταξινόμησή τους. Ειδικά για τον BVDV, έχει επίσης προταθεί η περαιτέρω ταξινόμηση του σε υπο-γενότυπους (υπότυπους), τουλάχιστον 12 για τον BVDV-1 και τουλάχιστον 3 για τον BVDV-2 (Vilcek et al., 2001a, Jackova et al., 2008, Nagai et al., 2008). Τα στελέχη που απομονώνονται για κάθε δοθέντα υπότυπο σχετίζονται στενά στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, με >90% ομολογία στην αλληλουχία, ενώ μεταξύ των γενότυπων η ομολογία μειώνεται στο 75%.

Επιζωοτιολογικές μελέτες υποδηλώνουν ότι τα στελέχη του υπότυπου BVDV-1b μπορούν να επικρατούν στα αναπνευστικά περιστατικά (Fulton et al., 2002), ενώ τα BVDV-1a στελέχη μπορούν να επικρατούν στις εμβρυϊκές μολύνσεις που συμβαίνουν στο τέλος της κυοφορίας (Evermann and Ridpath, 2002).

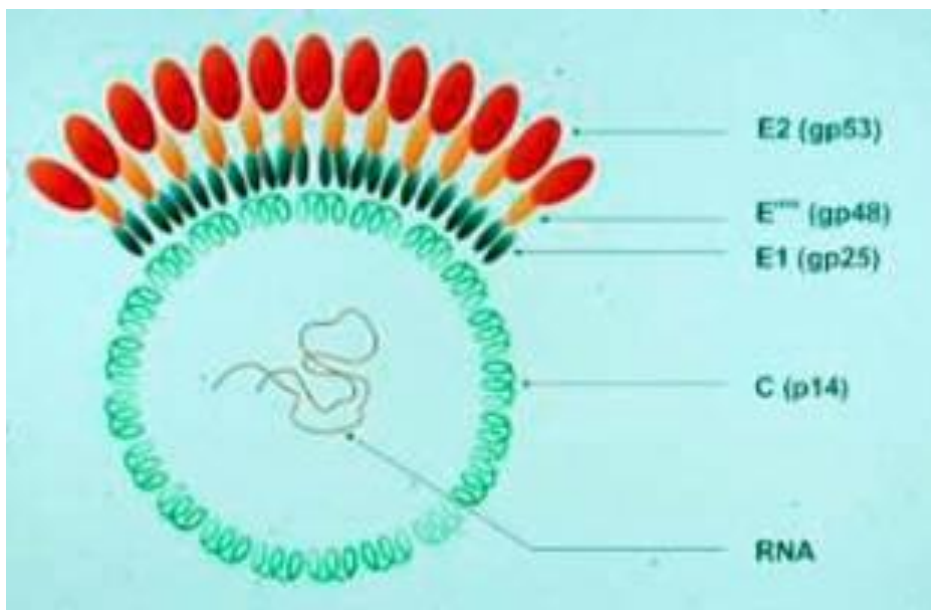
Ο BVDV-1 παρουσιάζει παγκόσμια εξάπλωση. Η μεγαλύτερη πολυμορφία έχει περιγραφεί στην Ευρώπη, όπου έχουν ανιχνευτεί οι υπότυποι 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h, 1j και 1k. Στις περισσότερες χώρες επικρατούν από 3 έως 6 υπότυποι (Vilcek et al., 2004). Σε άλλες, επικρατεί ένας μόνο υπότυπος, όπως π.χ. στην Ιρλανδία (Graham et al., 2001), στο Ηνωμένο Βασίλειο (Vilcek et al., 1999), στη Νορβηγία (όπου έχει εξαλειφθεί) και στην Αυστραλία (Mahony et al., 2005). Τα στελέχη του γενότυπου BVDV-2 παρουσιάζουν μικρότερη γεωγραφική εξάπλωση, κυρίως στη βόρεια (Pellerin et al., 1994, Ridpath et al., 1994) και νότια Αμερική (Flores et al., 2002), ενώ έχει αναφερθεί η απομόνωση τους και στην Γερμανία (Tajima et al., 2000), το Βέλγιο (Counreur et al., 2002), την Ιταλία και την Ιαπωνία (Nagai et al., 2001). Θεωρείται ότι ο γενότυπος BVDV-2 εξαπλώνεται στην Ευρώπη (Vilcek et al., 2004).



Εικόνα 2.3.1. Φυλογενετική ανάλυση των κύριων ειδών του γένους pestivirus, βασισμένη στην ανάλυση 2037 χαρακτήρων από τις περιοχές του γονιδιώματος 5' UTR, N^{pro} και E2. Οι αριθμοί σε κάθε κλάδο αντιπροσωπεύουν τη χρονολογία εμφάνισης του είδους, με το 95% των αποκλίσεων στις παρενθέσεις (Lihong Liu et al., 2009).

2.3.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Τα ιϊκά σωματίδια είναι σφαιρικά, φέρουν λιπιδικό περίβλημα και έχουν διάμετρο 40-60nm. Αποτελούνται από ένα κεντρικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας το οποίο περικλείει το ιϊκό RNA. Το καψίδιο εμφανίζει έναν ενεργειακά πυκνό εσωτερικό πυρήνα και έχει διάμετρο περίπου 30 nm. Η κατασκευή και η συμμετρία του πυρήνα δεν έχουν μελετηθεί. Το περίβλημα του ιϊκού σωματιδίου παρουσιάζει πλειομορφισμό. Στην επιφάνεια του ιϊκού περιβλήματος εμφανίζονται στρογγυλόμορφες υπομονάδες μεγέθους 10-12 nm (Heinz et al., 2000).



Εικόνα 2.3.1.1. Το σωματίδιο του BVDV

2.3.2 ΦΥΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΙΟΥ

Ο BVDV είναι σχετικά ασταθής στο εξωτερικό περιβάλλον και διασπάται εύκολα από οργανικούς διαλύτες, όπως ο αιθέρας και το χλωροφόρμιο. Η πυκνότητά του σε σουκρόζη είναι 1.10-1.15g/cm³. Ο ιός παραμένει σταθερός σε τιμές pH μεταξύ 5.7 και 9.3, έξω όμως από τα όρια αυτά αδρανοποιείται γρήγορα (Hafez and Liess, 1972b). Τα φυσικά και χημικά μέσα που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά του CSFV, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και κατά του BVDV. Η ικανότητα μόλυνσης του ιού δεν επηρεάζεται κατά την κατάψυξη αλλά αδρανοποιείται γρήγορα σε θερμοκρασίες πάνω από 40°C (Heinz et al., 2000).

Άλλες μέθοδοι απευαισθητοποίησης περιλαμβάνουν την επεξεργασία του ιού με Θρυψίνη (0,5 mg / ml, 37°C, 60 min), με Εθυλενιμίνη – αζιριδίνη (ethynelimine-azirid, μείωση 5log₁₀ μονάδων με τη χορήγηση 10mM στους 37°C για 2ώρες) (Preuss et al., 1997), την ακτινοβόληση με ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας (4.9 με 2.5 KGy απαιτούνται για τη μείωση της λοιμικότητας του ιού κατά 1log₁₀, σε κατεψυγμένα και υγρά δείγματα, αντίστοιχα, Preuss et al., 1997) και την ακτινοβόληση με ακτινοβολία γ (20-30 KGy) (Miekka et al., 1998).

2.3.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Το κύριο χαρακτηριστικό του BVDV είναι η ετερογένεια, που επιτρέπει στον ιό να προσαρμόζεται και να διαφεύγει της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή. Η προέλευση της πολυμορφίας αυτής σχετίζεται με τους υψηλούς ρυθμούς μετάλλαξης που παρατηρούνται στους RNA ιούς.

Ο BVDV, ανάλογα με την εκδήλωση ή μη, κυτταροπαθογόνου δράσης στις κυτταροκαλλιέργειες, διακρίνεται σε 2 βιότυπους, τον κυτταροπαθογόνο (cytopathic, cpBVDV) και τον μη-κυτταροπαθογόνο (noncytopathic, ncpBVDV), αντίστοιχα (Baker, 1995). Η κυτταροπαθογόνος δράση στις κυτταροκαλλιέργειες δεν σχετίζεται με τη λοιμικότητα *in vivo*, καθώς όλα τα υψηλής λοιμογόνου δύναμης στελέχη που έχουν μελετηθεί έως σήμερα ανήκουν στον μη-κυτταροπαθογόνο βιότυπο (Liebler-Tenorio et al., 2002). Ο μη-κυτταροπαθογόνος βιότυπος κυριαρχεί στη φύση. Μόνο τα μη κυτταροπαθογόνα στελέχη έχει παρατηρηθεί ότι προκαλούν επίμονη μόλυνση που χαρακτηρίζεται από ανοσοανοχή, είναι ειδική για το στέλεχος και διαρκεί ισόβια.

Η κυτταροπαθογόνος δράση θεωρείται ότι σχετίζεται με την παραγωγή της NS3 πρωτεΐνης (Donis and Duboni, 1987). Η πρωτεΐνη αυτή παράγεται με αρκετές διαφορετικές στρατηγικές ανάλογα με το εμπλεκόμενο ιϊκό στέλεχος. Συνηθέστερα σχετίζεται με ενσωματώσεις στην περιοχή του γονιδιώματος του BVDV που κωδικοποιεί την NS2-3 πρωτεΐνη. Η ενσωμάτωση εισάγει μια θέση διαχωρισμού που προκαλεί την παραγωγή της NS3 από την NS2-3. Επειδή τα cpBVDV στελέχη δεν προκαλούν επίμονη μόλυνση *in vivo*, είναι ο βιότυπος εκλογής για τη παραγωγή εμβολίων ΕΛΔ. Η υπερμόλυνση ενός ζώου, επίμονα μολυσμένου από ncpBVDV, με cpBVDV στέλεχος, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση της NB (Brownlie et al., 1984, Bolin et al., 1985).

2.3.4 ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ

Όλα τα στελέχη των ιών του γένους pestivirus είναι αντιγονικά διασταυρούμενα. Δηλαδή, κάθε ζώο που μολύνεται από κάποιο στέλεχος του ιού θα δημιουργήσει αντισώματα που αναγνωρίζουν όλα τα είδη του γένους. Η αντιγονική διαφοροποίηση είναι πολύπλοκη επειδή οι ιοί του γένους pestivirus είναι αντιγονικά διασταυρούμενοι

και ταυτόχρονα αντιγονικά πολύμορφοι, ακόμη και μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους. Σχετίζονται όμως στενά γενετικά και αντιγονικά μεταξύ τους, ώστε είναι δυνατή η παρουσία διασταυρούμενων αντιδράσεων στις συνήθεις διαγνωστικές δοκιμές.

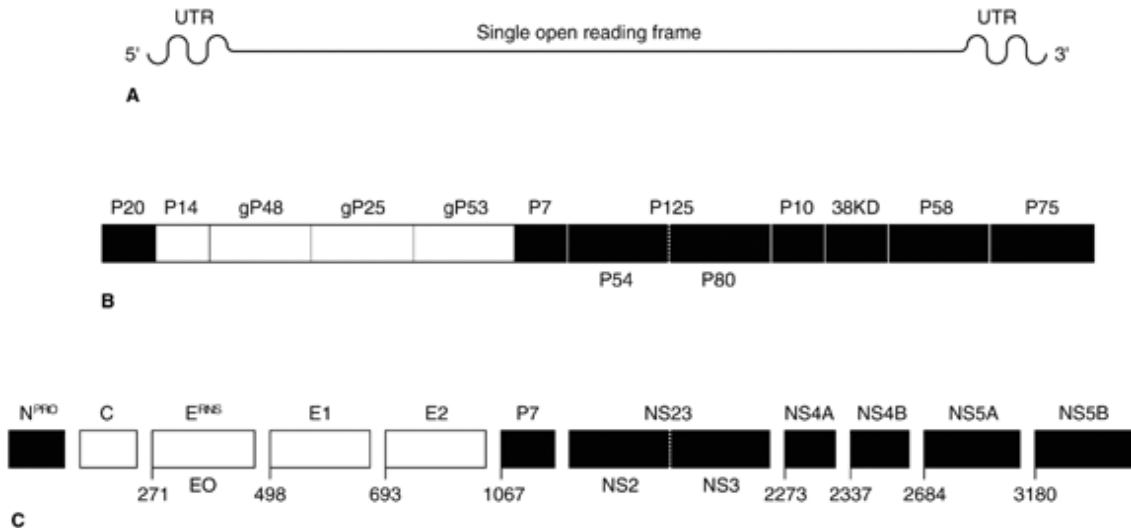
Ο βαθμός της αναγνώρισης, όπως ορίζεται από την ικανότητα του ορού να συνδέεται με ιό, ποικίλει. Οι τίτλοι εξουδετερωτικών αντισωμάτων που ανευρίσκονται στον ορό είναι, τυπικά, 5 με 10 φορές μεγαλύτεροι κατά ιών του ίδιου είδους, σε σχέση με άλλα είδη. Παρ' όλες τις αντιγονικές διαφορές, αυτές δεν είναι τόσο εκτεταμένες ώστε τα διάφορα στελέχη των ιών να αναγνωριστούν ως ορότυποι. Επίσης, οι διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ των ειδών και η παραλλακτικότητά τους, καθιστούν δύσκολη τη παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων που θα διαφοροποιούν τα είδη μεταξύ τους και ταυτόχρονα θα αναγνωρίζουν όλους τους ιούς του ίδιου είδους. Η καλύτερη μέθοδος διαφοροποίησης τους βασίζεται στη σύγκριση των γενετικών τους αλληλουχιών. Ο διαχωρισμός των στελεχών με βάση τις ορολογικές μεθόδους, συμφωνεί με τη σύγκριση των γονιδιωμάτων.

Η γνώση των αντιγονικών ιδιοτήτων του BVDV είναι σημαντική για τη κατανόηση του εύρους των διαφορών που παρατηρούνται στη παθογένεια των κλινικών συνδρόμων που προκαλούνται από τον ιό, για τη παρακολούθηση της επιζωοτιολογίας των διαφόρων στελεχών και για το σχεδιασμό των βέλτιστων διαγνωστικών δοκιμών και εμβολίων.

2.4 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ BVDV

Το γονιδίωμα του BVDV αποτελείται από μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας, μεγέθους περίπου 12,3Kb, που κωδικοποιεί ένα μακρύ (περίπου 4000 βάσεις) ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο (open reading frame, ORF). Στα 5' και 3' άκρα της κωδικής περιοχής υπάρχουν ιδιαίτερα συντηρημένες και με έντονη δευτεροταγή δομή μη μεταφραζόμενες περιοχές (untranslated regions, UTR). Το 5' άκρο δεν έχει καλύπτρα και δεν υπάρχει poly(A) ουρά στο 3' άκρο. Το γονιδίωμα σε όλους τους ιούς του γένους pestivirus τερματίζεται στο 3' άκρο με μικρή poly(C) ουρά.

Το μακρύ Ανοικτό Αναγνωστικό Πλαίσιο (ΑΑΠ) του γονιδιώματος του BVDV κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη. Το υδρόφοβο προφίλ της πολυπρωτεΐνης διατηρείται στο γένος pestivirus. Στη συνέχεια η πολυπρωτεΐνη πρωτεολύεται, είτε κατά τη μετάφραση είτε μετα-μεταφραστικά, με τη βοήθεια κυτταρικών και ιικών πρωτεασών στην περιοχή του ενδοπλασματικού δικτυωτού, στις δομικές και τις μη δομικές πρωτεΐνες. Η διάταξη των πρωτεϊνών στην πολυπρωτεΐνη είναι ως εξής: NH₂-N^{PRO}-C-E^{TRS}-E1-E2-P7-NS2/3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH. Οι N^{PRO}, C, E1 και E2 αποτελούν τις δομικές πρωτεΐνες και οι υπόλοιπες τις μη δομικές πρωτεΐνες.



Εικόνα 2.4.1. Γονιδίωμα BVDV και προϊόντα μετάφρασης

(A) μονόκλωνο γονιδίωμα θετικής πολικότητας με τις 5' και 3' UTR

(B) Πολυπρωτεΐνη με τη παλιά ονοματολογία των επιμέρους πρωτεϊνών

(C) Πρωτεΐνες του BVDV με τη σημερινή, αποδεκτή ονοματολογία. Οι αριθμοί στο αριστερό άκρο των πρωτεϊνών είναι τα N-τελικά αμινοξέα για τη πρωτεΐνη, βάση της αλληλούχησης του SD-1 στελέχους. Οι λευκές περιοχές στα (B) και (C) αντιπροσωπεύουν τις δομικές και οι μαύρες τις μη δομικές πρωτεΐνες.

2.4.1 ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το μητρικό ιϊκό σωματίδιο είναι οι C, E^{ms}, E1 και E2. Η κυτταρική πρωτεάση (πρωτεάση σινιάλου) η οποία θεωρείται ότι βρίσκεται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτυωτού, φαίνεται να ευθύνεται για την παραγωγή των δομικών και της P7 πρωτεϊνών (Heinz et al., 2000). Η C είναι η πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου του ιϊκού σωματιδίου, είναι βασική και πολύ συντηρημένη και εντοπίζεται σε μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτυωτού, όπου συγκρατείται μέσω του υδρόφοβου καρβοξυτελικού της άκρου. Η E^{ms} πρωτεΐνη είναι γλυκοζυλιωμένη και σχηματίζει ομοδιμερή με μεταξύ τους δεσμούς δισουλφιδίων. Σε καλλιεργητικά συστήματα ιστών, η E^{ms} μπορεί να βρεθεί τόσο στα ιϊκά σωματίδια, όσο και ελεύθερη στο καλλιεργητικό υγρό. Η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει ασυνήθιστη δράση ριβονουκλεάσης. Παρόλο που η δράση της ριβονουκλεάσης αυτής στον ιϊκό κύκλο δεν είναι γνωστή, τα αντισώματα που αναστέλλουν τη δράση της, εξουδετερώνουν και τον CSFV (Windisch et al., 1996).

Οι E1 και E2 πρωτεΐνες είναι οι πρωτεΐνες του φακέλου του ιού. Θεωρούνται αναπόσπαστα συστατικά των μεμβρανών και αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν ετεροδιμερή (Weiland et al., 1990). Οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, είτε ομοιοπολικά, είτε μη-ομοιοπολικά στα ετεροδιμερή που σχηματίζονται. Τα μη-ομοιοπολικά

ετεροδιμερή φαίνεται να είναι εκείνα που υπάρχουν στον ιϊκό φάκελο. Το αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών αυτών θεωρείται ότι προεξέχει από το φάκελο προς το εξωτερικό του ιϊκού σωματιδίου (Bartosch and Cosset, 2006).

Η ύπαρξη της E2 είναι απαραίτητη για τη σωστή αναδίπλωση της E1. Η E2 διαθέτει αντιπροποπτική δράση. Επιπλέον, στο αμινοτελικό τμήμα της εντοπίζεται μια περιοχή που παρουσιάζει εξαιρετική ποικιλομορφία που πιθανά σχετίζεται με τη διαφυγή του ιού από την ανοσοαπόκριση των ασθενών ζώων.

2.4.2 ΜΗ ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Η πρώτη ιϊκή πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το ΑΑΠ του BVDV είναι η μη δομική πρωτεΐνη, N^{pro}. Η πρωτεΐνη αυτή, που είναι μοναδική στο γένος pestivirus, είναι μια αυτοπρωτεάση της οποίας η μοναδική γνωστή λειτουργία είναι να απομακρύνει τον εαυτό της από τη πολυπρωτεΐνη. Η επόμενη μη δομική πρωτεΐνη είναι η P7 και ακολουθεί την E2 στη πολυπρωτεΐνη (Elbers et al., 1996). Αποτελείται από μια κεντρικά φορτισμένη περιοχή που πλαισιώνεται από ένα υδρόφοβο άκρο. Ο ρόλος της πρωτεΐνης αυτής δεν έχει ξεκαθαριστεί. Έχει προταθεί ότι η P7 απαιτείται για την παραγωγή λοιμογόνου ιού, αλλά όχι για την αντιγραφή του RNA (Harada et al., 2000). Ο αποκλεισμός του καναλιού των ιόντων που κωδικοποιούνται από τη P7 πρωτεΐνη καταστέλλει την αντιγραφή του ιού. Δεν είναι καθοριστική για την αντιγραφή του ιού.

Μετά την P7, η επόμενη μη δομική πρωτεΐνη είναι η πρωτεάση σερίνης NS2-3. Σε BVDV στελέχη του κυτταροπαθογόνου βιότυπου, η NS2-3 διαχωρίζεται σε NS2 και NS3. Η δραστηριότητα της πρωτεάσης σερίνης NS2-3 βρίσκεται στο NS3 τμήμα της πρωτεΐνης.

Τόσο η μη διασπασμένη NS2-3, όσο και η NS3 πρωτεΐνες, ενεργούν ως πρωτεάσες σερίνης (Tautz et al., 1997) που διαχωρίζουν τις υπόλοιπες μη δομικές πρωτεΐνες από τη πολυπρωτεΐνη. Η κεκαθαρμένη BVDV NS3 πρωτεΐνη κατέχει δράση RNA ελικάσης και RNA-εξαρτώμενης NTPάσης. Οι λειτουργίες αυτές είναι απαραίτητες για την επιβίωση του ιού (Grassmann et al., 1999, Gu et al., 2000). Τα αντισώματα κατά των NS2-3 και NS3 δεν εξουδετερώνουν τη λοιμογόνο δύναμη του ιού. Όμως, η NS2-3 και η NS3 αναγνωρίζονται ισχυρά από πολυκλωνικά αντισώματα. Ζώα εμβολιασμένα με εμβόλια ΕΛΔ προκαλούν ισχυρή αντίδραση στην NS2-3 και / ή την NS3 πρωτεΐνη.

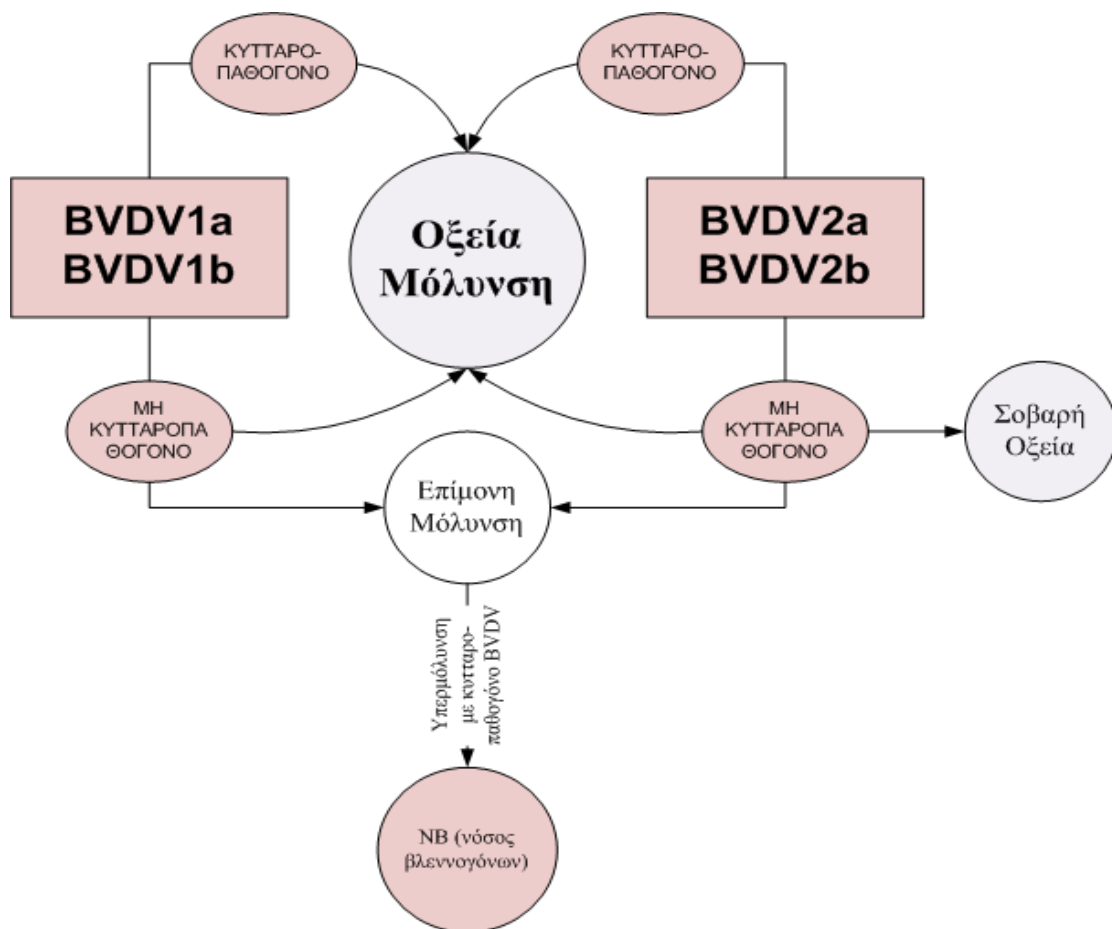
Οι NS4A και NS4B πρωτεΐνες είναι όμοιες σε μέγεθος, σύσταση και υδροφοβικότητα με άλλες παρόμοιες πρωτεΐνες της οικογένειας Flavivirus (Lindenbach and Rice, 2001). Η NS5A με ποικίλους τρόπους αλληλεπιδρά με πολλές διόδους που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την επιβίωση του κυττάρου κατά την ιϊκή μόλυνση και αποτελεί την κλασσική αντιπροποπτική πρωτεΐνη του ιού.

Για την NS5B πρωτεΐνη έχει αποδειχτεί δράση RNA πολυμεράσης (Lai et al., 1999). Στην αλληλουχία της υπάρχει το μοτίβο Gly-Asp-Asp που χαρακτηρίζει όλες τις RNA-εξαρτώμενες RNA-πολυμεράσες (Lohmann et al., 1997). Η NS5B αποτελεί την

πολυμεράση του ιού και αντιγράφει τόσο το ιϊκό RNA όσο και το αρνητικής πολικότητας ενδιάμεσο μόριο. Η NS5B δεν διαθέτει ενεργότητα 3'-5' εξωνουκλεάσης και συνεπώς λάθη κατά την αντιγραφή του γονιδιώματος του BVDV δεν διορθώνονται, καταλήγοντας στη δημιουργία quasi species ('σχεδόν είδη'). Ο όρος αναφέρεται σε ετερογενή ομάδα στελεχών του ιού που συνυπάρχουν στον ίδιο ασθενή *in vivo* και οφείλονται σε γρήγορες μεταλλάξεις του γονιδιώματος.

2.5 ΠΡΑΚΤΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΣΕ ΓΕΝΟΤΥΠΟΥΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΥΠΟΥΣ

Η πρακτική σημασία των γενότυπων βασίζεται στη σχέση τους με σημαντικές βιολογικές διαφορές. Η πιο σημαντική βιολογική διαφορά είναι ότι οι 2 γενότυποι είναι αντιγονικά διακριτοί. Με τη χρησιμοποίηση διαγνωστικών τεχνικών με πολυκλωνικό ορό ή μονοκλωνικά αντισώματα διαχωρίζονται σαφώς οι γενότυποι. Περαιτέρω, ζώα που εμβολιάζονται με εμβόλια κατά του ενός υπότυπου του BVDV θα παρουσιάσουν υψηλότερο τίτλο εξουδετερωτικών αντισωμάτων κατά αυτού του υπότυπου, έναντι άλλων υπότυπων.



Εικόνα 2.5.1. Ομοιότητες και διαφορές μεταξύ BVDV-1 και BVDV-2

Ο γενότυπος δεν πρέπει να συγγέεται με τον βιότυπο. Στελέχη και από τους 2 γενότυπους μπορούν να ανήκουν σε κάποιον από τους 2 βιότυπους, κυτταροπαθογόνο ή μη. Ο βιότυπος αντιπροσωπεύει μια φαινοτυπική διαφορά. Ενώ ο γενότυπος αντανακλά τις διαφορές στο γονιδίωμα, ο φαινότυπος βασίζεται στις διαφορές των παραγόμενων χαρακτηριστικών.

Οι γενότυποι και οι βιότυποι του BVDV προέρχονται από γενετικές μεταλλάξεις. Όμως, το είδος των μεταλλάξεων που προκαλούν την παραγωγή τους διαφέρει σημαντικά. Οι λανθασμένες ενσωματώσεις στο γονιδίωμα που προκαλούν γενετική παρέκκλιση, ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για την παραγωγή των γενότυπων και των υπότυπων. Αντίθετα, η παραγωγή των βιότυπων είναι αποτέλεσμα γενετικών μεταλλάξεων που προκαλούνται από ανασυνδυασμό. Θεωρείται ότι ο κυτταροπαθογόνος βιότυπος του BVDV προέρχεται από γενετικό ανασυνδυασμό μη-κυτταροπαθογόνων στελεχών.

2.6 ΕΠΙΖΩΟΤΙΟΛΟΓΙΑ

Ο BVDV ενδημεί στους πληθυσμούς των βοοειδών στις περισσότερες περιοχές της γης. Ο υψηλός επιπολασμός σε συνδυασμό με τις αρνητικές επιδράσεις στην αναπαραγωγή και τη γενική κατάσταση της υγείας στις μολυσμένες εκτροφές, έχει ως συνέπεια μεγάλες οικονομικές απώλειες για τη βοοτροφία σε παγκόσμια κλίμακα (Houe, 2003). Από μελέτες έχει εκτιμηθεί ότι ο επιπολασμός, σε παγκόσμια κλίμακα, των επίμονων μολύνσεων κυμαίνεται μεταξύ 1-2%, ενώ το ποσοστό των βοοειδών που ανιχνεύονται αντισώματα κατά του BVDV ανέρχεται σε 60-85% (Houe, 1999).

Δύο βασικά επιζωοτιολογικά χαρακτηριστικά του BVDV είναι ο δείκτης αναπαραγωγής της μόλυνσης, ατομικά και μεταξύ των εκτροφών.

2.6.1 Μετάδοση ατομικά σε μια εκτροφή.

Σε μια μολυσμένη εκτροφή υπάρχουν δύο κύριες αποθήκες του ιού: τα επίμονα μολυσμένα ζώα και τα ζώα με παροδική, οξεία μόλυνση. Την κύρια αποθήκη του BVDV στη φύση αποτελούν τα επίμονα μολυσμένα βοοειδή. Τα παροδικά μολυσμένα ζώα εμφανίζουν μια μικρή περίοδο αιμίας και απεκκρίνουν τον ιό από τη 4^η έως τη 15^η ημέρα μετά τη μόλυνση (Brownlie et al., 1987). Αντίθετα, τα επίμονα μολυσμένα ζώα συνήθως παρουσιάζουν υψηλή και επίμονη αιμία και ο BVDV απεκκρίνεται ισοβίως με όλες τις εκκρίσεις και απεκκρίσεις των μολυσμένων ζώων (Brock et al., 1998). Η οριζόντια μετάδοση του BVDV σε οροαρνητικά βοοειδή έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει μόλις 1 ώρα μετά την άμεση επαφή με επίμονα μολυσμένα βοοειδή (Traven et al., 1991).

2.6.1.1 Μετάδοση από επίμονα μολυσμένα ζώα

Στις μολυσμένες εκτροφές η άμεση και έμμεση διασπορά από τα επίμονα μολυσμένα ζώα αποτελεί την κύρια οδό μετάδοσης του BVDV (Wentink et al., 1991, Niskanen and Lindberg, 2003). Η πιθανότητα κάθετης μετάδοσης από επίμονα μολυσμένες αγελάδες πρακτικά ισούται με 1. Θεωρείται ότι δίνουν πάντα επίμονα μολυσμένους απογόνους (Moennig and Liess, 1995).

2.6.1.2 Μετάδοση από παροδικά μολυσμένα ζώα

Με βάση πολυάριθμα πειραματικά δεδομένα, θεωρείται ότι η πρωτογενής μόλυνση σπάνια μόνο εξαπλώνεται και τα ζώα με οξεία μόλυνση αποτελούν αδιέξοδο για τον BVDV, εκτός και αν τα ζώα είναι στην αρχή της εγκυμοσύνης (Niskanen et al., 2000, Niskanen et al., 2002). Η πιθανότητα κάθετης μετάδοσης μετά από οξεία μόλυνση είναι πολύ μεγαλύτερη από την πιθανότητα της οριζόντιας μετάδοσης. Οι περισσότερες νέες επίμονες μολύνσεις που ανιχνεύονται σε μια μολυσμένη εκτροφή είναι το αποτέλεσμα παροδικών μολύνσεων αγελάδων με φυσιολογικό ανοσοποιητικό σύστημα.

2.6.1.3 Άλλοι τρόποι μετάδοσης μέσα σε μια εκτροφή

Η πιθανότητα μετάδοσης του BVDV με άλλο τρόπο εκτός της άμεσης επαφής, εξαρτάται από τη δόση και το μέσο επαφής. Η δόση με τη σειρά της, εξαρτάται από τη διάρκεια της μόλυνσης. Σε φυσικές συνθήκες, θεωρείται ότι η διασπορά του BVDV με τον ατμοσφαιρικό αέρα ή η μετάδοση του με άλλους τρόπους είναι μικρής σημασίας (Lindberg and Houe, 2005).

2.6.2 Μετάδοση μεταξύ των εκτροφών

Στους παράγοντες κινδύνου μετάδοσης του BVDV περιλαμβάνονται:

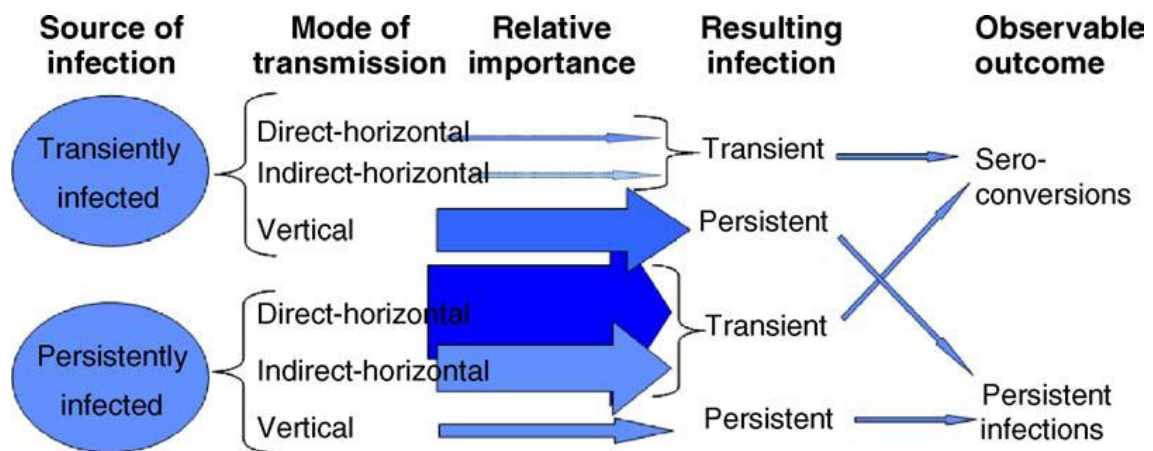
- Μέγεθος της εκτροφής
- Μέση απόσταση από γειτονικές εκτροφές
- Αριθμός μολυσμένων γειτονικών εκτροφών
- Κοινοί βοσκότοποι
- Επαφές ‘πάνω από το φράκτη’ (over the fence) μεταξύ των ζώων
- Αγορά ζώων χωρίς πιστοποιητικά
- Περιοχές με υψηλό επιπολασμό
- Απουσία προγραμμάτων ελέγχου

καθώς και άλλοι παράγοντες, όπως ύπαρξη μικτών εκτροφών με μικρά μηρυκαστικά ή άγρια ζώα που μοιράζονται τη βοσκή, επαναχρησιμοποίηση των βελονών μέσα σε λίγα λεπτά από τους κτηνιάτρους, χρήση μολυσμένου σπέρματος ή με αντικείμενα κατά την εμβρυομεταφορά κ.α. (Houe, 2005).

Οι μολυσμένες εκτροφές μπορούν να μολύνουν άλλες μέσω ανταλλαγών / μετακινήσεων μολυσμένων ζώων, παροδικά και επίμονα μολυσμένων (Moennig et al., 1990). Θεωρείται ότι με την ασφαλή μεταφορά ζώων, απαλλαγμένων από τον BVDV, μπορεί να μειωθεί η μετάδοση του ιού σε άνοσες, μη μολυσμένες εκτροφές έως 95% (EU thematic network, 2005). Από μια μολυσμένη εκτροφή μπορεί επίσης να μεταδίδεται ο BVDV μέσω διαφόρων άλλων οδών, όπως το σπέρμα ή τα έμβρυα (Fray et al., 2000). Επιπλέον, η παρουσία του BVDV σε βιολογικά προϊόντα, όπως τον ορό εμβρύου μόσχου (Fetal Calf Serum, FCS) και η χρήση τέτοιων προϊόντων για τη παρασκευή εμβολίων καθώς και στις τεχνικές τεχνητής γονιμοποίησης (*in vivo* και *in vitro* παραγωγή εμβρύων), αποτελούν επιπρόσθετους τρόπους μετάδοσης του BVDV, όταν ο ιός είναι ακόμη λοιμογόνος στο τελικό προϊόν.

Αντίθετα από την ενζωτική μόλυνση και μετάδοση των τοπικών στελεχών BVDV μεταξύ των βοοειδών μιας εκτροφής, η σοβαρότητα της νόσου και η διάρκεια της απέκκρισης είναι πολύ διαφορετική, μετά την είσοδο νέου ζώου σε μια εκτροφή. Η ικανότητα απέκκρισης και μετάδοσης του BVDV από ζώα με οξεία μόλυνση ποικίλλει σημαντικά, ανάλογα τη διασταυρούμενη ανοσία που έχει αποκτηθεί από προηγούμενες μολύνσεις συμπεριλαμβανομένων των εμβολίων (Bolin et al., 1991a) και της λοιμογόνου δύναμης του ιού.

Στα προγράμματα συστηματικού ελέγχου του BVDV πάντα περιλαμβάνονται και μέτρα για τον έλεγχο των διαφορετικών τρόπων μετάδοσης του ιού (Lindberg and Alenius, 1999).



Εικόνα 2.6.2.1. Ο ρόλος των ζώων με οξεία μόλυνση σε σχέση με τα επίμονα μολυσμένα, ως πηγές οριζόντιας και κάθετης μετάδοσης του BVDV (Lindberg and Houe, 2005).

2.6.2.1 Ρόλος της έμμεσης μετάδοσης

Γενικά, όσο μειώνεται ο επιπολασμός του BVDV, τόσο μειώνεται και ο κίνδυνος έμμεσης μετάδοσης. Ενέσιμα υλικά, μολυσμένα με μικρές ποσότητες ρινικών εκκρίσεων από επίμονα μολυσμένα ζώα, είναι μολυσματικά και αυτό αποτελεί μια σημαντική οδό με την οποία ο ιός μπορεί έμμεσα να μεταδοθεί μεταξύ των εκτροφών (Niskanen and Lindberg, 2003). Επιπλέον, αν ο ιός διατηρείται στο έκδοχο, π.χ., στο σπέρμα από ταύρους με επίμονη ή οξεία μόλυνση ή σε μολυσμένα έμβρυα, ο κίνδυνος μετάδοσης αυξάνεται (Lindberg et al., 2000, Grooms, 2004). Σε πειραματικές συνθήκες έχει αποδειχθεί ότι από διάφορα αντικείμενα (π.χ. ρινοσφικτήρα) μπορεί να μεταδοθεί η μόλυνση (Gunn, 1993, Lang-Ree et al., 1994).

2.6.2.2 Ρόλος βιολογικών προϊόντων

Ο κίνδυνος μετάδοσης του BVDV από μολυσμένα βιολογικά υλικά (εμβόλια, έμβρυα, σπέρμα) είναι πολύ σημαντικός και παγκόσμιος. Η αδρανοποίηση του ορού με θέρμανση, στους 56°C για 30min, δεν αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο εξουδετέρωσης του BVDV στον ορό (Rossi et al., 1980). Ο ιός επίσης ανιχνεύτηκε στο 20.6% των εμβρύων στα σφαγεία, που αποτελούν τη κύρια πηγή FCS (Bolin et al., 1991b). Λόγω της χαμηλότερης από 100% αποτελεσματικότητας των μεθόδων αδρανοποίησης του BVDV στο FCS, η χρήση του στη παραγωγή εμβολίων αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους κινδύνους για τα βοοειδή (EDQM, 2001).

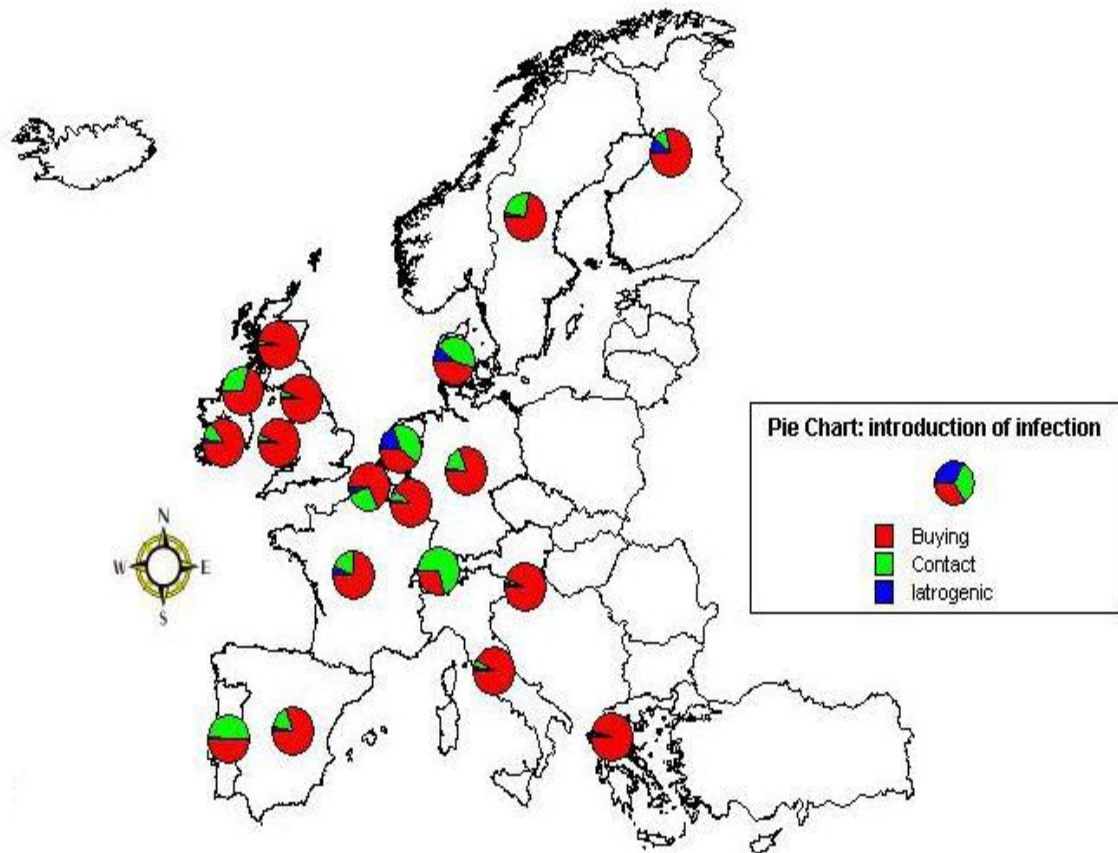
Η αντιγραφή και η επιμονή του BVDV στα συστήματα παραγωγής εμβρύων φαίνεται να είναι ειδική του στελέχους (Givens et al., 2000). Μεγάλες ποσότητες ιού έχουν ανιχνευτεί στον ορό (10^6 TCID₅₀/ml), στο βλεννογόνο της μήτρας (10^6

TCID₅₀/ml), στα ούρα (10⁴ TCID₅₀/ml), στα υγρά πλύσης της μήτρας (10² TCID₅₀/ml) και στα κόπρανα (10⁴ TCID₅₀/ml), σε επίμονα μολυσμένες μοσχίδες δότριες (Brock et al., 1991).

2.6.2.3 Ρόλος των ξενιστών, όχι βοοειδών

Σημαντική εμπλοκή παρατηρείται σε κοπάδια προβάτων και γιδιών που είναι σε στενή επαφή με βοοειδή, σε συγκεκριμένες συνθήκες διαχείρισης. Φαίνεται ότι υπάρχει μια επαρκώς στενή επιζωοτιολογική επαφή μεταξύ του BVDV και του BDV, που αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου για τη μεταξύ των ειδών μετάδοση του ιού. Θα πρέπει πάντοτε να λαμβάνονται υπόψη τα μικρά μηρυκαστικά στα οργανωμένα προγράμματα ελέγχου της ΙΔΒ / ΝΒ.

Στα άγρια είδη, οι ορολογικές δοκιμές απέδειξαν τη μόλυνση από BVDV σε περισσότερα από 50 είδη της τάξης των αρτιοδάκτυλων. Είναι δύσκολο να εκτιμηθούν οι επιπτώσεις στην υγεία των προσβεβλημένων ειδών, επειδή τα περισσότερα αποτελέσματα ελήφθησαν από ορολογικές μελέτες. Για να είναι ικανά τα άγρια ζώα να αποτελούν αποθήκες του ιού, απαιτείται η ικανότητα του ιού να μολύνει τα βοοειδή και να προκαλεί επίμονες μολύνσεις σε άγριους πληθυσμούς ζώων, χωρίς να επανεισάγεται.



Εικόνα 2.6.2.3.1. Σπουδαιότητα διαφόρων παραγόντων κινδύνου για την εισαγωγή του BVDV σε μη μολυσμένες εκτροφές Ευρωπαϊκών χωρών, σε ενδημικές συνθήκες (EU, Thematic network, 2001).

Ο BVDV ενζωοτεί σε όλες τις Ευρωπαϊκές χώρες στις οποίες δεν εφαρμόζονται προγράμματα συστηματικού ελέγχου. Σε τέτοιες συνθήκες, περίπου το 50% όλων των εκτροφών έχουν επίμονα μολυσμένα ζώα και το 90% των ζώων έχουν εκτεθεί στον ιό στη διάρκεια της ζωής τους.

2.7 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ BVDV ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

2.7.1 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ BVDV

Οι RNA ιοί, συμπεριλαμβανομένου του BVDV, αντιγράφονται και επιβιώνουν μέσω διάφορων γενετικών στρατηγικών και κύκλων ζωής, που εξαρτώνται από τη βιολογία και τη βιοχημεία των ξενιστών τους. Όπως και άλλοι ιοί, η μόλυνση των κυττάρων των ξενιστών από τον BVDV απολήγει στη τροποποίηση της έκφρασης των γονιδίων, που δρουν πλέον ευεργετικά για την αντιγραφή και την επιβίωση του ιού. Η ρύθμιση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες, υπεύθυνες για τη μετάφραση του ιού, καθώς και των πρωτεϊνών, των υπεύθυνων για την παραγωγή ενέργειας και τη δόμηση του ιϊκού σωματιδίου, έχει αποδειχθεί σε κύτταρα προσβεβλημένα από τον BVDV (Neill and Ridpath, 2003a, 2003b).

Ο κύκλος ζωής του BVDV περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. αλληλεπίδραση με τον ιϊκό υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή
2. ενδοκυττάρωση του ιϊκού σωματιδίου
3. σύντηξη της ιϊκής μεμβράνης
4. απελευθέρωση του ιϊκού RNA
5. μετάφραση του ιϊκού RNA μέσω της εσωτερικής θέσης σύνδεσης των ριβοσωματίων (Internal Ribosome Entry Site, IRES) και επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης
6. αναπαραγωγή του ιϊκού RNA μέσω της σύνθεσης συμπληρωματικού κλώνου αρνητικής πολικότητας
7. συγκρότηση νουκλεοκαψιδίων και απόκτηση φακέλου με μετάβαση σε μεμβρανικά κυστίδια
8. ωρίμανση και μεταφορά των ιϊκών σωματιδίων στην κυτταρική επιφάνεια
9. απελευθέρωση του ιού με εξωκυττάρωση

Η σύνδεση και η είσοδος του ιού μέσα στο κύτταρο είναι μία σύνθετη και πολυεπίπεδη διαδικασία, που ενεργοποιείται από την εξαρτώμενη από τους υποδοχείς ενδοκυττάρωση, μορίων της επιφάνειας του κυττάρου και των ιϊκών πρωτεϊνών E^{rns} και E2 (Schelp et al., 1995, Xue et al., 1997, Iqbal et al., 2000, Schelp et al., 2000). Οι γλυκοπρωτεΐνες του περιβλήματος που κωδικοποιούνται από τις κωδικές περιοχές για την E2 και την E^{rns}, έχει αποδειχθεί ότι συνδέονται ανεξάρτητα με τις κυτταρικές επιφάνειες (Hulst and Moorman, 1997, Iqbal et al., 2000). Η E2 πρωτεΐνη συνδέεται ασθενέστερα με την κυτταρική επιφάνεια και ο εναρκτήριο μηχανισμός σύνδεσης του ιού με το κύτταρο προκαλείται από τη σύνδεση E^{nrs} – γλυκοζαμινογλυκανών της κυτταρικής επιφάνειας.

Το στάδιο αυτό συμβαίνει σε ευαίσθητα και μη κύτταρα, γιατί οι υποδοχείς αυτοί είναι παρόντες στα περισσότερα κύτταρα. Φαίνεται ότι μόνο η σύνδεση με τους υποδοχείς, δεν επαρκεί για την πρόσληψη του ιού (Flores et al., 1996). Η είσοδος στο κύτταρο επιτυγχάνεται με τη σύνδεση της E2 πρωτεΐνης του φακέλου στους λιποπρωτεϊνικούς υποδοχείς χαμηλής πυκνότητας (low density lipoprotein receptors, LDLR) του κυττάρου και εσωτερίκευση μέσω ενδοκυττάρωσης. Αυτή αποτελεί πιθανά την εναλλακτική οδό, λόγω της σχετικής απουσίας των LDLR υποδοχέων, στα περισσότερα κύτταρα (Agnello et al., 1999). Ως τώρα, δεν μπορεί να αποκλειστεί η ύπαρξη άλλων μορίων κυτταρικών υποδοχέων.

Η ικανότητα του BVDV να προσβάλλει ένα σχετικά ποικίλο εύρος ξενιστών, καθώς και ο τροπισμός των ειδών των ζώων και των ιστών που μολύνονται από τον BVDV, έχει σχετιστεί με τη γλυκοπρωτεΐνη του ελύτρου E2 (Liang et al., 2003). Η E2 πρωτεΐνη, που μεταφράζεται από μια αρκετά μεταβλητή περιοχή του γονιδιώματος, μπορεί επίσης να συνεισφέρει στην ικανότητα του BVDV να αποφεύγει την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή (Ridpath, 2003).

Ο μηχανισμός ελευθέρωσης του γονιδιωματικού RNA μέσα στο κυτταρόπλασμα δεν είναι πλήρως γνωστός, αλλά πιθανότατα περιλαμβάνει οξείδωση των ενδοκυτταρικών κυστιδίων, με αποτέλεσμα την ελευθέρωση του ιϊκού RNA (Flores et al., 1996).

2.7.1.1 Μετάφραση και μεταγραφή

Το επόμενο κρίσιμο στάδιο, μετά την πρόσληψη και την ελευθέρωση του ιϊκού γονιδιώματος, είναι η παραγωγή των ιϊκών πρωτεϊνών, τόσο των απαραίτητων για την αντιγραφή, όσο και αυτών που αλληλεπιδρούν με τα μόρια του ξενιστή. Το γονιδίωμα του ιού δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του μολυσμένου κυττάρου, καθώς η αντιγραφή του ιϊκού γονιδιώματος συμβαίνει εξολοκλήρου στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου. Το γονιδιωματικό RNA του BVDV λειτουργεί ως mRNA, για την άμεση παραγωγή μιας μεγάλης ιϊκής πολυπρωτεΐνης, που κωδικοποιείται από το μοναδικό Ανοικτό Αναγνωστικό Πλαίσιο (Open Reading Frame, ORF) του ιού. Στη συνέχεια, η πολυπρωτεΐνη πρωτεολύεται με τη βοήθεια ιϊκών και κυτταρικών πρωτεασών στην περιοχή του ενδοπλασματικού δικτυωτού, σε δομικές και μη πρωτεΐνες. Οι γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου, E^{ms}, E1 και E2, μεταφέρονται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτυωτού. Οι E1 και E2 πρωτεΐνες εισέρχονται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτυωτού κατά την μετάβαση, ενώ η E^{ms} πρωτεΐνη παραμένει διαλυτή.

Οι 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές του ιϊκού γονιδιώματος παρουσιάζουν εκτεταμένη δευτεροταγή δομή και έχουν σημαντικό ρόλο στη μετάφραση καθώς και τον πολλαπλασιασμό του ιϊκού RNA. Η έναρξη της μετάφρασης της πολυπρωτεΐνης γίνεται μέσω του μηχανισμού εσωτερικής πρόσδεσης των ριβοσωμάτων (internal ribosome entry site, IRES), στο 5' μη μεταφραζόμενο άκρο του ιϊκού γονιδιώματος. Η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή καθορίζει σημαντικές λειτουργίες του κύκλου του ιού.

Είναι υπεύθυνη για την έναρξη της μετάφρασης του ιϊκού γονιδιώματος. Στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή εντοπίζονται επίσης ρυθμιστικά στοιχεία της αντιγραφής του ιϊκού γονιδιώματος, μια και η συμπληρωματική της αλληλουχία αποτελεί την περιοχή έναρξης της αντιγραφής για τη παραγωγή ιϊκού RNA, από το αρνητικής πολικότητας ενδιάμεσο μόριο. Το 3' μη μεταφραζόμενο άκρο είναι καθοριστικό για την έναρξη της αντιγραφής του ιϊκού RNA και τη μολυσματικότητα του ιού.

Η έναρξη της αντιγραφής σηματοδοτείται από το IRES. Έχει αποδειχτεί για τους ιούς του γένους pestivirus, ότι το IRES συνδέεται εκλεκτικά με τη 40S ριβοσωμική υπομονάδα, όταν δεν υπάρχουν επιπρόσθετοι παράγοντες έναρξης της μεταγραφής. Με τη συνεργασία των συστατικών του κυττάρου, οι μη δομικές πρωτεΐνες του ιού συμμετέχουν στο λειτουργικό σύμπλοκο που καταλύει τη μεταγραφή του θετικού RNA στην πλήρως εκπτυγμένη συμπληρωματική αρνητική αλυσίδα RNA. Η αρνητική RNA αλυσίδα λειτουργεί ως πρότυπο για το αντιγραφικό σύμπλοκο και τη σύνθεση θετικών RNA μορίων, με ένα ημισυντηρητικό ασύμμετρο πρότυπο αντιγραφής (Warrilow et al., 2000). Το μοντέλο αυτό περιλαμβάνει τρία ειδικά του ιού RNAs: ένα δίκλωνο πρότυπο αντιγραφής (RF), ένα μερικώς μονόκλωνο και μερικώς δίκλωνο ενδιάμεσο αντίγραφο (RI) και ένα μονόκλωνο ιϊκό RNA. Η αντιγραφή του ιού ξεκινά από ένα θετικό σύμπλοκο ρεπλικάσης που αποτελείται από συστατικά του ιού και των κυττάρων, που σχηματίζεται στο 3' άκρο του γονιδιώματος. Η εξέλιξη της διαδικασίας, από την έναρξη έως την επιμήκυνση πραγματοποιείται μετά τη σύνθεση εκκολαπτόμενων RNAs, μήκους 8-10 νουκλεοτιδίων (Sun and Kao, 1997). Η επιμήκυνση αποσπά το θετικό σκέλος από το RI πρότυπο, επιτρέποντας την επαναχρησιμοποίηση του προτύπου ενώ συνεχίζεται η επιμήκυνση των παραγόμενων θετικών σκελών. Ανά πρότυπο σχηματίζονται περίπου 6 εκκολαπτόμενα σκέλη (Gong et al., 1998). Το δίκλωνο αντίγραφο αποτελεί παράγωγο του ιϊκού RNA και χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τη σύνθεση μονόκλωνων αλυσίδων.

2.7.1.2 Ρύθμιση της μετάφρασης και της αντιγραφής

Ο ακριβής έλεγχος της μετάφρασης και της αντιγραφής είναι απαραίτητος στο κύκλο του BVDV, καθώς το ίδιο θετικής κατεύθυνσης RNA χρησιμοποιείται ως πρότυπο και για τις δύο διαδικασίες. Δομικές και λειτουργικές μελέτες του 5' τελικού τμήματος του γονιδιώματος του BVDV, συμπεριλαμβανομένης και της IRES θέσης, απέδειξαν δευτεροταγή δομή που επιτρέπει στο ιϊκό RNA να μεταπηδήσει από κύκλο μετάφρασης σε κύκλο αντιγραφής (Yu et al., 2000). Η συγκέντρωση των ιϊκών πρωτεϊνών, όπως της NS5A και της NS5B, που μπορούν να αναστείλουν την εξαρτώμενη από την IRES μεταγραφή, μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ρυθμιστικά στην αλλαγή από τη μεταγραφή στην αντιγραφή. Κινητική ανάλυση της μεταγραφής και της αντιγραφής, υποδεικνύουν ότι η ρύθμιση της αλλαγής από μεταγραφή σε αντιγραφή δεν είναι ειδική για το BVDV IRES, αλλά μπορεί να προκληθεί από ρυθμιστικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το ιϊκό γονιδίωμα εκτός του IRES, ή από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεταφραστικών πρωτεϊνικών συμπλόκων, του ιού και του ξενιστή (Li and McNally, 2001).

2.7.1.3 Σχηματισμός του ιού και εξωκυττάρωση

Δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για το σχηματισμό και την απελευθέρωση του βιρίου από τα μολυσμένα κύτταρα του ξενιστή. Τα βίρια του BVDV φαίνεται να ωριμάζουν σε ενδοκυτταρικά κυστίδια στη συσκευή του Golgi ή στο ενδοπλασματικό δικτυωτό, όπου ο λιπιδικός φάκελος προσαρμόζεται μετά την ανάπτυξή του μέσα στον αυλό του κυστιδίου. Η ωρίμανση του ιού, συμπεριλαμβανομένης και της μορφολογικής σταθεροποίησης του, και η μεταφορά του στη κυτταρική επιφάνεια, διευκολύνεται από ένζυμα και διαδικασίες στα κύτταρα του ξενιστή (Zitzmann et al., 1999, Durantel et al., 2001). Η διάδοος των ανώριμων μορίων μέσα από το ενδοπλασματικό δικτυωτό και τη συσκευή του Golgi καταλήγει στην ωρίμανση των μορίων αυτών, με την επεξεργασία και γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών του φακέλου. Τα κυστίδια που περιέχουν τον ιό μεταφέρονται μέσω του πλάσματος στην κυτταρική επιφάνεια, όπου τα κυστίδια συγχωνεύονται με τη μεμβράνη και το ιϊκό σωματίδιο ελευθερώνεται στο εξωκυττάριο περιβάλλον (Grummer et al., 2001, Bielefeldt – Ohmann and Block, 1982, Gray and Nettleton, 1987) και η ανίχνευσή τους είναι δυνατή 8 ώρες μετά τη μόλυνση (Nuttall, 1980).

2.7.1.4 Σημεία αντιγραφής

Ο BVDV αντιγράφεται στο κυτταρόπλασμα, παρόμοια με άλλους RNA ιούς. Η αντιγραφή γίνεται στην κυτταροπλασματική πλευρά του ενδοπλασματικού δικτυωτού (Zhang et al., 2003). Ο BVDV παρουσιάζει τροπισμό και ως προς το είδος και ως προς τα κύτταρα. Παρόλο που ο BVDV μπορεί να προσβάλλει μεγάλη ποικιλία κυτταρικών τύπων, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, παρουσιάζει εμφανή επιλογή για κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των T, των B, των μονοκυττάρων, των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων (Sopp et al., 1994). Οι βιότυποι του BVDV συμπεριφέρονται διαφορετικά, με τα μη κυτταροπαθογόνα στελέχη να παρουσιάζουν τροπισμό για τα λευκοκύτταρα, το λεμφοειδή ιστό, τους παρωτιδικούς αδένες, το εγγύς κόλον και τον αναπνευστικό σωλήνα. Τα κυτταροπαθογόνα στελέχη σχετίζονται, γενικά, με το γαστρεντερικό σωλήνα (Greiser – Wilke et al., 1993, Liebler et al., 1991) και αντιγράφονται στις ωοθήκες (Grooms et al., 1998).

2.7.2 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Για τη περιγραφή της παθογένειας του νοσήματος, έχουν κατηγοριοποιηθεί τα παρακάτω σύνδρομα: οξεία BVD λοίμωξη, διαπλακούντια / ενδομήτρια λοίμωξη, επίμονη μόλυνση και νόσος των βλεννογόνων. Ευαίσθητα ζώα όλων των ηλικιών, μπορούν να παρουσιάσουν μια πρωτογενή, παροδική μόλυνση από τον BVDV, που καλείται οξεία BVDV λοίμωξη, ανεξάρτητα από την εξέλιξη της (υποκλινική, σοβαρή οξεία ή παρατεταμένη). Η παροδική, οξεία μόλυνση μπορεί να έχει σοβαρές επιπλοκές, αν το προσβεβλημένο ζώο είναι έγκυο. Ο BVDV περνάει τον πλακούντα και προκαλεί

διαπλακούντια / ενδομήτρια λοίμωξη. Η μόλυνση του εμβρύου μπορεί να έχει διάφορη εξέλιξη. Η πιο σημαντική είναι η γέννηση επίμονα μολυσμένων μοσχαριών, που είναι το προαπαιτούμενο για τη νόσηση, αργότερα, από τη νόσο των βλεννογόνων. Τα επίμονα μολυσμένα ζώα και τα ζώα με νόσο των βλεννογόνων, είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση επιζωοτιών και οξειών λοιμώξεων BVDV.

2.7.2.1 Οξεία λοίμωξη

Οξεία λοίμωξη από τον BVDV προκαλείται όταν ευαίσθητα (οροαρνητικά) ανοσοϊκανά βοοειδή, μολυνθούν από τον ιό. Τα οροθετικά βοοειδή συνήθως δεν είναι ευαίσθητα. Ο πιο καθοριστικός παράγοντας στην πρόγνωση της οξείας λοίμωξης από τον BVDV, είναι η λοιμογόνος δύναμη του στελέχους του ιού που μολύνει. Η λοιμογόνος δύναμη δεν σχετίζεται με το βιότυπο, καθώς τόσο οι κυτταροπαθογόνοι όσο και οι μη κυτταροπαθογόνοι βιότυποι, αντιπροσωπεύονται στους γενότυπους 1 και 2 του BVDV και παρουσιάζουν ευρύ φάσμα λοιμογόνου δράσης.

Μετά από τον ενδορρινικό ενοφθαλμισμό βοοειδών, με στελέχη χαμηλής λοιμογόνου δύναμης των γενότυπων BVDV 1 και BVDV 2, τα ζώα δεν παρουσιάζουν εμφανή κλινικά συμπτώματα (Wilhelmsen et al., 1990, Traven et al., 1991, Bolin and Ridpath, 1992, Marshall et al., 1996, Brusckhe et al., 1998a, Liebler – Tenorio et al., 2003a). Παρατηρείται μόνο μια ελαφρά αύξηση της θερμοκρασίας για 1-2 ημέρες (Liebler – Tenorio et al., 2003a).

Από δοκιμές απομόνωσης και τιτλοποίησης διαπιστώθηκε ότι ο BVDV 1 αντιγράφεται αρχικά στις αμυγδαλές και στο ρινικό βλεννογόνο (Bruschke et al., 1998a). Ίικό αντιγόνο ανακαλύφθηκε αρχικά στις αμυγδαλές, στα λεμφογάγγλια και στις πλάκες του Peyer και κατόπιν στο σπλήνα και στο θύμο αδένα (Liebler – Tenorio et al., 2003a). Το ιϊκό αντιγόνο κυριαρχούσε στα λεμφοειδή θυλάκια και στο φλοιό του θύμου και η μόλυνση των ιστών επηρέαζε όλα τα παρόντα κύτταρα. Εκτός των λεμφοειδών ιστών, η πολυεστιακή μόλυνση του εντερικού βλεννογόνου, ήταν το μόνο σημείο που μπορούσε να ανεβρεθεί ιϊκό αντιγόνο, ενώ δεν ήταν ανιχνεύσιμο στο μυελό των οστών, σε καμία περίοδο. Η παρουσία του ιϊκού αντιγόνου δεν σχετίστηκε με αλλοιώσεις στους ιστούς. Η μεγαλύτερη εξάπλωση και ποσότητα ιϊκού αντιγόνου βρέθηκε την 6^η ημέρα μετά τη μόλυνση, που ακολουθήθηκε από γρήγορη απομάκρυνση του ιού και εξαφάνισή του από τα περισσότερα σημεία.

Τα συμπτώματα μετά από προσβολή από στελέχη υψηλής λοιμογόνου δύναμης είναι συνήθως σοβαρά αλλά μη ειδικά και περιλαμβάνουν υψηλό πυρετό, ανορεξία, κατάπτωση και συχνά διάρροια (Corapi et al., 1990, Bolin and Ridpath, 1992, Ellis et al., 1998, Odeon et al., 1999). Σε ορισμένες λοιμώξεις από πολύ λοιμογόνα στελέχη του BVDV, μπορεί από τα αρχικά στάδια της λοίμωξης να παρατηρείται θνησιμότητα. Σε ορισμένα ζώα αναπτύσσονται σοβαρές αιμορραγίες (Corapi et al., 1990), και αν και δεν αποτελούν σταθερό εύρημα, όταν εμφανίζονται αποτελούν το αιμορραγικό σύνδρομο. Σε πειραματικές μολύνσεις, ο υψηλός πυρετός αποτελεί σταθερό σύμπτωμα (Ridpath et al., 2000). Άλλα σταθερά κλινικά ευρήματα είναι η σοβαρή, προοδευτική λεμφοπενία

και η ήπια έως σοβαρή θρομβοκυτταροπενία (Marshall et al., 1996, Stoffregen et al., 2000, Liebler – Tenorio et al., 2002).

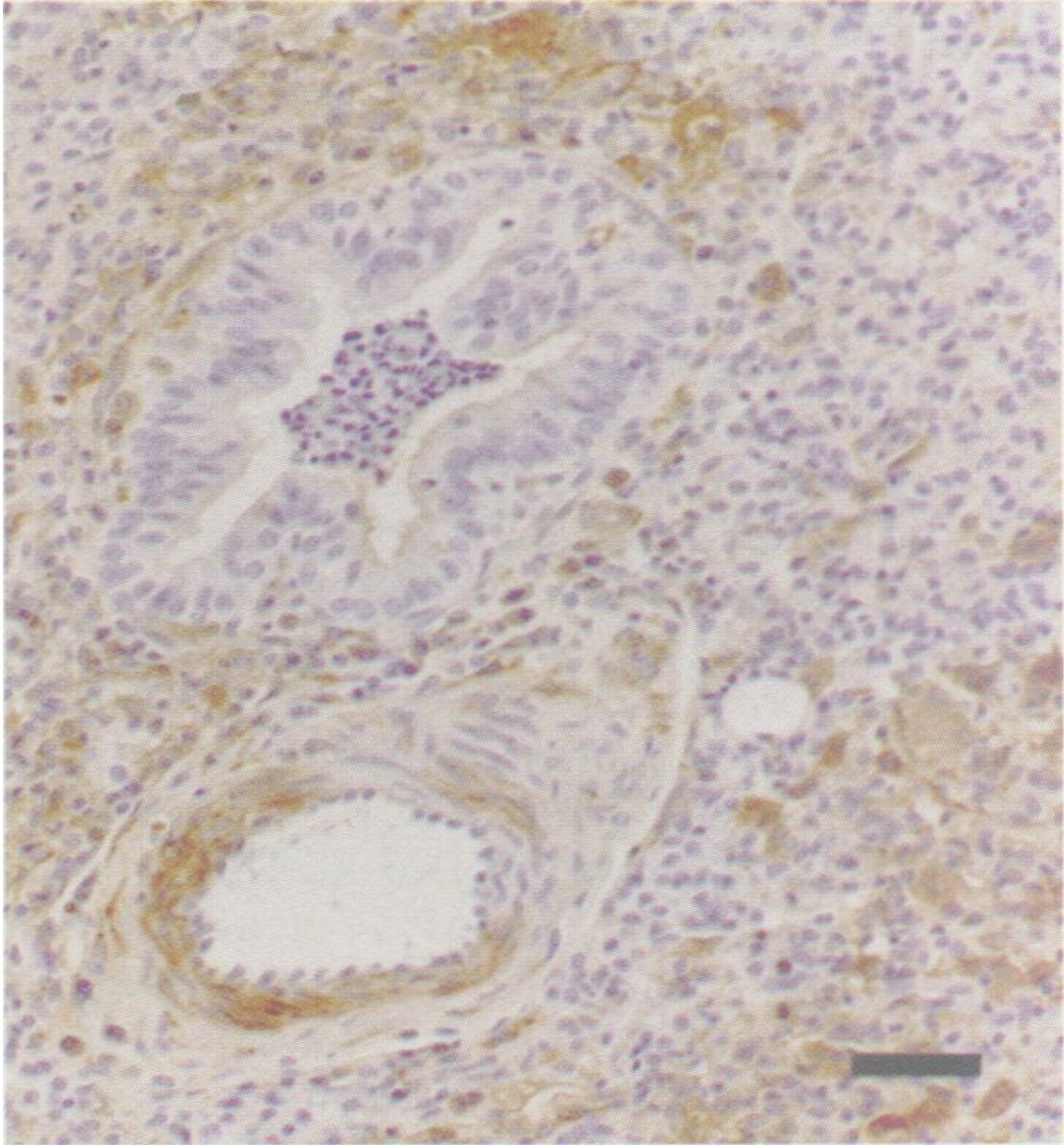
Αιμορραγία (αιμορραγική διάθεση) προκαλείται μόνο όταν τα θρομβοκύτταρα βρίσκονται σε πολύ μικρούς αριθμούς. Καθώς ο μυελός των οστών προσβάλλεται αργότερα από τους υπόλοιπους λεμφοαιματοποιητικούς ιστούς και η θρομβοκυτταροπενία αναπτύσσεται μετά την προσβολή του μυελού των οστών, ο θάνατος του ζώου μπορεί να συμβεί πριν από την ανάπτυξη της αιμορραγικής διάθεσης. Με τον τρόπο αυτό εξηγούνται οι διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης των αιμορραγιών που παρατηρούνται στα κλινικά περιστατικά και τις πειραματικές μολύνσεις, σε σοβαρή οξεία ΙΔΒ.

Η εμφάνιση θρομβοκυτταροπενίας σχετίζεται ευθέως με την προσβολή του μυελού των οστών από τον BVDV. Στο μυελό των οστών, ο ιός ανιχνεύεται σε όλα τα κυτταρικά στοιχεία, συμπεριλαμβανομένων των μεγακαρυοκυττάρων (Spragnuolo et al., 1997, Walz et al., 1999). Από τα μεγακαρυοκύτταρα προκύπτουν τα θρομβοκύτταρα και έτσι η προσβολή τους, θεωρείται κρίσιμη για την ανάπτυξη της θρομβοκυτταροπενίας. Ο υποκειμενικός παράγοντας πρόκλησης της θρομβοκυτταροπενίας δεν έχει πλήρως κατανοηθεί. Η νέκρωση των μεγακαρυοκυττάρων, η μειωμένη παραγωγή θρομβοκυττάρων από τα μεγακαρυοκύτταρα, η αυξημένη κατανάλωση των θρομβοκυττάρων στην περιφέρεια και λειτουργικά ελλείμματα των θρομβοκυττάρων, έχουν ενοχοποιηθεί ως αιτιολογικοί παράγοντες (Rebhun et al., 1989, Corapi et al., 1990, Walz et al., 1999, 2001).

Η αρχική μετάδοση γίνεται από το αναπνευστικό. Αρχικά προσβάλλονται οι αμυγδαλές και ο λεμφικός ιστός. Η παρουσία στελεχών υψηλής λοιμογόνου δύναμης, δεν περιορίζεται μόνο στα θυλάκια του λεμφοειδούς ιστού αλλά επεκτείνεται στις εξαρτώμενες από τα T-κύτταρα περιοχές. Τα στελέχη υψηλής λοιμογόνου δύναμης επεκτείνονται και στο μυελό των οστών. Η παρουσία τους στα μυελοειδή κύτταρα και τα μεγακαρυοκύτταρα, σχετίζεται με τη θρομβοκυτταροπενία.

Αντίθετα από τα στελέχη χαμηλής λοιμογόνου δύναμης που απομακρύνονται από τους προσβεβλημένους ιστούς, τα υψηλής λοιμογόνου δύναμης στελέχη συνεχίζουν να εξαπλώνονται και να κατανέμονται στους ιστούς, όπως έχει περιγραφεί στη σοβαρή οξεία μορφή (Marshall et al., 1996, Ellis et al., 1998, Odeon et al., 1999, Stoffregen et al., 2000). Αντιγόνα του BVDV, υψηλής λοιμογόνου δύναμης ανευρίσκονται στο λεμφοειδή ιστό, στο βλεννογόνο του ανώτερου και κατώτερου πεπτικού και αναπνευστικού σωλήνα και στους ενδοκρινείς αδένες. Τελικά, δεν υπάρχει κανένας ιστός που να μην περιέχει ιικό αντιγόνο, τουλάχιστον στη διάμεση ουσία. Ο ιός εξαπλώνεται αιματογενώς. Παρά την ευρεία εξάπλωση του ιού, οι αλλοιώσεις είναι περιορισμένες. Η διαφορά αυτή παρατηρείται ιδιαίτερα στις αρχικές φάσεις της μόλυνσης. Αρχικά, μεγάλος αριθμός προσβεβλημένων κυττάρων βρίσκονται στους λεμφοειδείς ιστούς, χωρίς αντίστοιχες μορφολογικές αλλοιώσεις. Οι αλλοιώσεις στο λεμφοειδή ιστό είναι καθυστερημένες. Στο θύμο αδένα, ιικό αντιγόνο είναι συγκεντρωμένο σε μεγάλες ποσότητες στα λόβια, αλλά οι αλλοιώσεις είναι πολυεστιακές. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στον εντερικό βλεννογόνο, όπου το

ϊικό αντιγόνο παρουσιάζεται διάχυτο, αλλά οι αρχικές αλλοιώσεις είναι πολυεστιακές. Στους πνεύμονες, παρατηρούνται συχνά εστίες οξείας, πυώδους βρογχοπνευμονίας, που δεν αντιστοιχούν στη κατανομή του ιού στο πνεύμονα.



Εικόνα 2.7.2.1.1. Μικροφωτογραφία πνεύμονα μοσχარიού. Το αντιγόνο του BVDV εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυψελιδικών μακροφάγων και των λείων μυϊκών ινών του μυϊκού χιτώνα των κυψελίδων. Χρώση με ABC Ανοσοϋπεροξειδάση για τον BVDV. Μπάρα, πλάτος 50μm (Ellis et al., 1998).

Πειραματική μόλυνση με στελέχη διαφορετικής λοιμογόνου δύναμης απέδειξαν ότι, είναι παρόμοια η αρχική μόλυνση και εξάπλωση, αλλά διαφέρουν στις ποσότητες του ιού που ανευρίσκονται στους ιστούς και στην ταχύτητα εξάπλωσης (Lieber – Tenorio et al., 2003b). Η κατάληξη είναι τελικά, η ευρεία κατανομή των λοιμογόνων στελεχών στους ιστούς σε μεταγενέστερα στάδια της λοίμωξης, αντίθετα από τη γρήγορη απομάκρυνση των στελεχών χαμηλής λοιμογόνου δύναμης από τους ιστούς. Τα στελέχη που προκαλούν τη σοβαρότερη ιαιμία, προκαλούν επίσης τα σοβαρότερα κλινικά συμπτώματα (Walz et al., 2001). Δηλαδή, οι διαφορές στην αντιγραφή του ιού και όχι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του BVDV και των κυττάρων του ξενιστή, έχουν τη μεγαλύτερη επίδραση στη λοιμογόνο δύναμη των διαφόρων στελεχών του BVDV.

2.7.2.2 Διαπλακούντια / ενδομήτρια μόλυνση

Η κύρια οικονομική επίδραση του BVDV προκαλείται από την ενδομήτρια λοίμωξη που προκαλεί δυσλειτουργία του γεννητικού συστήματος (Ross et al., 1986, Kirkbride, 1992, Dubovi, 1994, Moenning and Liess, 1995, Rufenacht et al., 2001). Η επίδραση αυτή οφείλεται στο ότι ο BVDV μπορεί να μολύνει το γεννητικό σύστημα των θηλυκών και αρσενικών ζώων, να περάσει τον πλακούντα και να προσβάλλει το έμβρυο. Η διαπλακούντια μόλυνση μπορεί να συμβεί στην πορεία οξέων λοιμώξεων λίγο πριν ή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, με αφροδίσια μετάδοση από μολυσμένο σπέρμα και με επίμονη μόλυνση. Ακόμη και υποκλινικές οξείες λοιμώξεις μπορούν να προσβάλλουν το γεννητικό σωλήνα και να προκαλέσουν διαπλακούντια μετάδοση (McGowan et al., 1993). Συνεπώς, κάθε μόλυνση πριν, ή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις στη λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος.

Το αποτέλεσμα της ενδομήτριας μόλυνσης εξαρτάται κύρια, από το χρόνο της μόλυνσης κατά την εγκυμοσύνη και συνεπώς από την ηλικία του εμβρύου. Μολύνσεις ακριβώς πριν, ή κατά τις πρώτες εβδομάδες της εγκυμοσύνης διαταράσσουν την ορμονική ισορροπία, προκαλούν μείωση του ρυθμού σύλληψης και έχουν απευθείας επίδραση στο έμβρυο. Σε όψιμα στάδια της εγκυμοσύνης, το αποτέλεσμα της μόλυνσης επηρεάζεται από την ανάπτυξη των κυττάρων – στόχων, τη φάση της οργανογένεσης και την ανάπτυξη του εμβρυϊκού ανοσοποιητικού συστήματος (Duffel and Harkness, 1985).

Το αποτέλεσμα της μόλυνσης καθορίζεται επίσης και από τις ιδιότητες του ιού, ειδικότερα το βιότυπο του BVDV. Και οι 2 βιότυποι μπορούν να προσβάλλουν το έμβρυο, αλλά το αποτέλεσμα της μόλυνσης διαφέρει. Μόλυνση με τον cp βιότυπο φαίνεται ότι προκαλεί μεγαλύτερες βλάβες στο νεαρό έμβρυο από τον ncp βιότυπο (Vanroose et al., 1998). Μόνο ο ncp βιότυπος μπορεί να προκαλέσει επίμονη ιαιμία (Brownlie et al., 1989). Έχει προταθεί ότι, η ικανότητα του BVDV να αναστέλλει τη παραγωγή της IFN-1, επιτρέπει στον ncp βιότυπο να προκαλεί επίμονη μόλυνση (Charleston et al., 2001).

Η διαπλακούντια μόλυνση έχει αναφερθεί και για τους 2 γενότυπους, BVDV 1 και 2 (Wittum et al., 2001). Έχει επίσης αναφερθεί διπλή μόλυνση από BVDV 1 και 2 (Brock and Chase, 2000).

Οξεία μόλυνση των αγελάδων κατά την προωοθυλακιορρηκτική περίοδο, μπορεί να προκαλέσει αιμία κατά τον οίστρο και μειωμένο ρυθμό σύλληψης. Αν η σύλληψη επιτευχθεί, στον τοκετό τα μοσχάρια είναι υγιή, οροαρνητικά και δεν απεκκρίνουν τον ιό (McGowan et al., 1993). Σε πειραματικές μολύνσεις και οι 2 βιότυποι του ιού, προκαλούν αλλοιώσεις στις ωοθήκες (Grooms et al., 1998b, 1998c). Με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους, ο ιός μπορεί να ανιχνευθεί στα κοκκιοκύτταρα και στο συνδετικό ιστό των ωοθηκών, 8 με 30 ημέρες μετά τη μόλυνση. Κατά την ιστολογική εξέταση παρατηρείται διάχυτη, μη πύωδη, διάμεση φλεγμονή, νέκρωση των κοκκιοκυττάρων και νέκρωση των ωοθυλακίων (Grooms et al., 1998c, Fray et al., 2000a, McGowan et al., 2003). Οι αλλοιώσεις των ωοθηκών εμφανίζονται 2-6 ημέρες μετά τον οίστρο και μπορούν να παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα (60 ημέρες), μετά τον ενοφθαλμισμό τους (Grooms et al., 1998c, McGowan et al., 2003).

Οι ωοθηκικές αλλοιώσεις προκαλούν δυσλειτουργία των ωοθηκών, που χαρακτηρίζεται από μειωμένη έκκριση γοναδοτροπινών και στεροειδών, ιδιαίτερα προγεστερόνης και απουσία ή μειωμένη φασική έκκριση LH (Fray et al., 2000a, 2002, McGowan et al., 2003). Η ορμονική ανισορροπία οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη των ωοθυλακίων, μειωμένο ρυθμό σύλληψης, μειωμένο αριθμό ωχρών σωματίων και αυξημένο αριθμό αγονιμοποιητών ωαρίων (McGowan et al., 2003). Οι αλλαγές αυτές διατηρούνται για όσο καιρό υπάρχουν αλλοιώσεις, για τουλάχιστον 2 οιστρικούς κύκλους μετά τη μόλυνση. Έτσι εξηγείται και ο μειωμένος ρυθμός σύλληψης (Grooms et al., 1998a).

Η δυσλειτουργία των ωοθηκών είναι ένας τρόπος με τον οποίο η μόλυνση από τον BVDV μειώνει το ρυθμό σύλληψης. Η μόλυνση των ωαρίων, κατά τη μόλυνση των ωοθηκών, θα επηρεάσει επίσης τη γονιμότητα (Bielanski et al., 1998). Η μόλυνση των ωοθηκών είναι πολυεστιακή και δεν επηρεάζει όλα τα ωάρια. Συνεπώς, αγελάδες που γονιμοποιούνται παρά τη μόλυνση, θα δώσουν φυσιολογικούς, οροαρνητικούς και μη αιμικούς απογόνους (McGowan et al., 1993). Ποσοστό έως 58% των εμβρύων που συλλέχθηκαν για *in vitro* γονιμοποίηση από παροδικά μολυσμένες αγελάδες, ήταν μολυσμένες από τον BVDV (Bielanski et al., 1998). Η μόλυνση των εμβρύων μπορεί να καταλήξει σε ελαφρά μειωμένα ποσοστά επιβίωσης και καθυστερημένη ανάπτυξη των εμβρύων (Bielanski and Hare, 1988, Kafi et al., 2002). Ο BVDV μπορεί να απομονωθεί από έμβρυα με καθυστέρηση στην ανάπτυξη (Kirkland et al., 1993).

2.7.2.2.1 Έκθεση της μήτρας στο BVDV κατά τη σπερματέγχυση

Η έκθεση της μήτρας στον BVDV κατά τη σπερματέγχυση προκαλεί μείωση του ρυθμού σύλληψης στις άνοσες αγελάδες, ενώ οι οροθετικές αγελάδες παρουσιάζουν φυσιολογικό ρυθμό σύλληψης (McGowan et al., 1993, Kirkland et al., 1994).

Πειραματικά, η νόσος έχει αναπαραχθεί, με απευθείας έγχυση BVDV ενδομητρικά (Grahn et al., 1984).

Το σπέρμα μπορεί να προέρχεται από επίμονα μολυσμένους ταύρους (Meyling and Jensen, 1988). Από την άλλη, το σπέρμα μπορεί να προέρχεται από ταύρους παροδικά μολυσμένους (Voges et al., 1998, Givens et al., 2003). Ακόμη και μετά από παροδική μόλυνση και απομάκρυνση του ιού από όλους τους ιστούς και το αίμα, ο BVDV μπορεί να ανιχνεύεται στο σπέρμα για πολλούς μήνες (Givens et al., 2003).

Ο μεγαλύτερος βαθμός αντιγραφής του ιού στο γεννητικό σύστημα του αρσενικού είναι στα σπερματικά κυστίδια και στον προστάτη και ο ιός απεκκρίνεται στο σπερματικό υγρό (Kirkland et al., 1991). Σπερματέγχυση με μολυσμένο σπέρμα σε άνοσες αγελάδες, θα προκαλέσει παροδική λοίμωξη (Kirkland et al., 1994).

Μελετήθηκε επίσης η επίδραση του BVDV στους γαμέτες και το νεαρό έμβryo. *In vitro* μελέτες, δεν απέδειξαν άμεση επίδραση των ncr και cpBVDV στην ωρίμανση των ωοκυττάρων σε βλαστοκύστες, παρόλο που ο BVDV αντιγραφόταν στα κύτταρα γύρω από το έμβryo (Kafi et al., 2002). *In vitro* γονιμοποίηση των ωοκυττάρων, παρουσία του BVDV, κατέληξε σε μειωμένους ρυθμούς σύλληψης (Kafi et al., 2002). Δεν παρατηρήθηκε πρόσληψη του BVDV από τα έμβρυα μετά από *in vitro* έκθεση τους στον ιό (Potter et al., 1984). Με την προοδευτική ανάπτυξή τους, τα έμβρυα καθίστανται ευαίσθητα στη μόλυνση (Vanroose et al., 1998).

2.7.2.3 Μόλυνση του εμβρύου

Περίπου 30 ημέρες από την αρχή της εγκυμοσύνης, το έμβryo είναι ευαίσθητο στη διαπλακούντια μόλυνση. Φαίνεται ότι υπάρχει αυξημένη αποτελεσματικότητα του ιού, από τη σύλληψη ως την 30^η ημέρα της εγκυμοσύνης (Kirkland et al., 1993). Αυτό συμφωνεί με την παρατήρηση ότι αυξάνονται προοδευτικά οι εμβρυϊκές απώλειες, από την 20^η έως την 77^η ημέρα μετά την τεχνητή σπερματέγχυση. Η ανάπτυξη του πλακούντα και ο σχηματισμός των πλακουντίων, ο σχηματισμός της τροφοβλάστης και η ανάπτυξη των εμβρυϊκών ιστών, καθορίζουν την ένταση της λοίμωξης (Kirkland et al., 1993).

Η πειραματική μόλυνση με εμβόλια ΕΛΔ, έδειξε ότι η λοίμωξη του εμβρύου μπορεί να προκαλέσει αποβολή, επίμονη μόλυνση, γέννηση θνησιγενών εμβρύων, τερατογόνο δράση και γέννηση φυσιολογικών μοσχάρων με αντισώματα κατά του BVDV. Παρόλο που και οι 2 βιότυποι μπορούν να προσβάλλουν το έμβryo, μόνο ο ncrBVDV μπορεί να προκαλέσει επίμονη μόλυνση (Brownlie et al., 1989). Η προσβολή από cpBVDV καταλήγει σε αποβολή ή γέννηση φυσιολογικών, οροθετικών μόσχων (Brownlie et al., 1989). Το έμβryo πριν γίνει πλήρως ανοσοϊκανό, επηρεάζεται σοβαρά από την ενδομήτρια μόλυνση από τον ιό. Η ενδομήτρια μόλυνση ενός ανοσοϊκανού εμβρύου καταλήγει σε παροδική μόλυνση του εμβρύου, παρόμοια με την οξεία ΙΔΒ. Το έμβryo μπορεί να προκαλέσει μια ανοσολογική απάντηση και ο ιός απομακρύνεται. Τα μοσχάρια είναι κλινικά υγιή και μη ιαμικά. Η παρουσία αντισωμάτων σε δείγματα ορού που συλλέχθηκαν πριν από τη χορήγηση

πρωτογάλακτος, υποδηλώνουν την ενδομήτρια έκθεση στον BVDV. Τα εξουδετερωτικά αντισώματα σε νεογέννητους μόσχους, ανιχνεύονται μετά από μολύνσεις, από την 90^η ημέρα έως το τέλος της εγκυμοσύνης (Liess et al., 1987).

Ο BVDV μπορεί να προκαλέσει αποβολές. Συχνότερα παρατηρούνται στα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης (λιγότερο από την 125^η ημέρα), παρόλο που έχουν αναφερθεί και στην τελευταία φάση της εγκυμοσύνης (Duffel et al., 1984, Roeder et al., 1986). Η αποβολή μπορεί να συμβεί όχι άμεσα μετά τη μόλυνση, αλλά εβδομάδες έως μήνες αργότερα (Duffel et al., 1984). Αυτό εξηγεί επίσης και την εμφάνιση των μουμιοποιημένων εμβρύων.

Η παθογένεια των αποβολών δεν είναι πλήρως γνωστή. Στις περισσότερες μελέτες έχουν καταγραφεί μικρές, μη ειδικές αλλοιώσεις στον πλακούντα και τα πλακούντια (Murray, 1991). Έχει επίσης διαπιστωθεί η παρουσία νεκρωτικής πλακουντίτιδας που σχετίζεται με την παρουσία ιϊκού αντιγόνου (Baszler et al., 1995). Φαίνεται ότι οι ήπιες αλλοιώσεις του πλακούντα μπορούν να επιτρέψουν σε ευκαιριακές μολύνσεις να τον περάσουν. Αντιγόνο του BVDV έχει προσδιοριστεί σε πολλούς ιστούς των αποβληθέντων εμβρύων, καθώς και σε αθροίσματα μονοκυττάρων σε αρκετούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων και του μυοκαρδίου (Done et al., 1980, Murray, 1991, Baszler et al., 1995). Συνεπώς, οι αλλοιώσεις στο έμβρυο θεωρούνται σημαντικός παράγοντας για τη πρόκληση της αποβολής.

Ιστοί εγκύων αγελάδων, μολυσμένων με pcpBVDV την 85-86^η ημέρα της εγκυμοσύνης, εξετάστηκαν ανοσοϊστοχημικά για την ανίχνευση ιϊκού αντιγόνου (Fredriksen et al., 1999a). Ο BVDV ανεβρέθηκε στον πνεύμονα και στο ήπαρ του εμβρύου από την 14^η ημέρα μετά τη μόλυνση και σε όλους τους άλλους ιστούς που εξετάστηκαν (πνεύμονα, ήπαρ, σπλήνα, έντερο και εγκέφαλο) από την 18-22^η ημέρα. Ο ιός ανιχνεύτηκε στους εμβρυϊκούς υμένες και τα πλακούντια από την 18-22^η ημέρα. Ο ιός δεν ανιχνεύτηκε στους μητρικούς ιστούς ή στον πλακούντα, από την 7^η έως την 22^η ημέρα, μετά τον ενοφθαλμισμό. Αυτό σημαίνει ότι μόλυνση του εμβρύου μπορεί να συμβεί χωρίς να υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις του ιού στη μήτρα ή τον πλακούντα των προσβεβλημένων αγελάδων και αυτό αποτελεί την πιθανότερη αιτία πρόκλησης αποβολής, παρά η αντιγραφή του ιού στον πλακούντα.

Η αποβολή δεν αποτελεί τη μοναδική κατάληξη της μόλυνσης από τον BVDV, το πρώτο τρίμηνο της κυοφορίας. Η μόλυνση του εμβρύου από pcpBVDV μπορεί να προκαλέσει τη γέννηση μοσχαριών, επίμονα μολυσμένων. Η γέννηση PI μόσχων μεγιστοποιείται όταν η μόλυνση συμβεί μεταξύ της 30^{ης} και 90^{ης} ημέρας της κυοφορίας, ενώ μειώνεται η συχνότητα εμφάνισης τους, όσο πλησιάζει η 125^η ημέρα της εγκυμοσύνης (Roeder et al., 1986, Radostits and Littlejohns, 1988, Moenning and Liess, 1995). Επίμονη μόλυνση έχει προκληθεί και με τους 2 γενότυπους του ιού (1 και 2). Στα PI έμβρυα, υπάρχει μεγάλη εξάπλωση του ιού στους ιστούς. Οι βλάβες στο έμβρυο είναι περιορισμένες και έτσι η κυοφορία διατηρείται. Το έμβρυο δεν είναι ανοσοϊκανό κατά το χρόνο της μόλυνσης και δεν παράγει αντίδραση στο στέλεχος του BVDV που προκαλεί τη μόλυνση. Η συνεχής παρουσία μεγάλων ποσοτήτων του ιού στους εμβρυϊκούς ιστούς προκαλεί την ανοσοανοχή, όταν πλέον ολοκληρώνεται η δημιουργία

του ανοσοποιητικού. Έτσι, το στέλεχος του ιού που μολύνει δεν αναγνωρίζεται ως ξένο και δεν παράγεται ανοσολογική απάντηση σ' αυτό.

Η επίδραση του ιού στο έμβρυο και το νεογέννητο ποικίλλει. Η επίμονη μόλυνση μπορεί να καταλήξει στη γέννηση φυσιολογικών μοσχαριών, φαινομενικά υγιών μοσχαριών με διάφορα λειτουργικά ελαττώματα και τη γέννηση μοσχαριών με εμφανή ελαττώματα. Τα περισσότερα χαρακτηρίζονται ως 'root-doers'. Είναι πιθανή η γέννηση θνησιγενών μοσχαριών ή ο θάνατος τους τις πρώτες ώρες ή ημέρες. Όσα επιζούν, συχνά παρουσιάζουν νανισμό και καθυστερημένη ανάπτυξη. Ακόμη και φαινομενικά υγιή ζώα, παρουσιάζουν μεγαλύτερη θνησιμότητα από υγιή μοσχάρια, επειδή παρουσιάζουν προδιάθεση σε δευτερογενείς λοιμώξεις, με εντονότερα συμπτώματα (Munoz-Zanzi et al., 2003). Αυτό, πιθανότατα οφείλεται στη λειτουργική διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος και την επακόλουθη ανοσοκαταστολή (Roth et al., 1981, 1986). Η επίμονη μόλυνση μπορεί επίσης να προκαλέσει λειτουργικές διαταραχές και στο ενδοκρινικό σύστημα. Σε επίμονα μολυσμένα ζώα έχει επανειλημμένα αναφερθεί Σακχαρώδης Διαβήτης (Tanigawa et al., 1995, Buckner, 1997, Murondoti et al., 1999). Έχει προταθεί ότι, τα διαφορετικά κλινικά συμπτώματα που σχετίζονται με την επίμονη μόλυνση επηρεάζονται κύρια από το χρόνο μόλυνσης του εμβρύου, με την πρόωρη μόλυνση να καταλήγει συχνότερα στη γέννηση φυσιολογικών μοσχαριών, φορέων του ιού (Moening and Liess, 1995).

Συγγενείς ανωμαλίες έχουν περιγραφεί μετά τη μόλυνση του εμβρύου, από την 80^η έως την 150^η ημέρα της κυοφορίας. Το έμβρυο φαίνεται να είναι πολύ ευαίσθητο στην τερατογόνο δράση του BVDV, κατά το χρόνο που αρχίζει να αναπτύσσεται το ανοσοποιητικό, η ικανότητα αντίδρασης σε φλεγμονή και η οργανογένεση (Duffel and Harkness, 1985).

Ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης και μειωμένη ωρίμανση παρατηρείται σε πολλούς ιστούς του εμβρύου, συμπεριλαμβανομένων του εγκεφάλου, του θύμου, των μυών, των οστών και των πνευμόνων (Done et al., 1980). Οι αλλοιώσεις στον εγκέφαλο και τους οφθαλμούς είναι οι συχνότερες, επειδή βρίσκονται στη τελευταία φάση της οργανογένεσης την 80^η με 150^η ημέρα της κυοφορίας (Duffel and Harkness, 1985). Μεταβολές που επηρεάζουν και τα δύο συστήματα, αναφέρονται ως το οφθαλμοπαρεγκεφαλιδικό σύνδρομο (Bielefeldt Ohmann, 1984). Οι παρακάτω ανωμαλίες του κεντρικού νευρικού συστήματος έχουν περιγραφεί: μικρεγκεφαλία, υποπλασία ή απλασία της παρεγκεφαλίδας, πορεγκεφαλία, υδρανγκεφαλία, εσωτερικός υδροκέφαλος και δυσμυελινογένεση (Brown et al., 1973). Νευρολογικά συμπτώματα, όπως μυϊκός τρόμος, αταξία, ραιβόκρανο και οπισθότονος, μπορούν να παρατηρηθούν σε νεογέννητα μοσχάρια. Οι οφθαλμικές αλλοιώσεις χαρακτηρίζονται από ατροφία του αμφιβληστροειδούς, οπτική νευρίτιδα, καταρράκτη, μικροθφαλμία και δυσπλασία του αμφιβληστροειδή (Brown et al., 1975). Ένα άλλο όργανο που συχνά επηρεάζεται είναι ο θύμος αδένας, που παρουσιάζει μειωμένο μέγεθος κατά τον τοκετό (Done et al., 1980). Άλλες συγγενείς ανωμαλίες είναι η αρθρογρύπωση και η αλωπεκία / υποτρίχωση (Bielefeldt – Ohmann, 1984). Συχνά ο BVDV δεν μπορεί να ανιχνευθεί ή να απομονωθεί από μη PI ζώα, με ανωμαλίες σχετιζόμενες με τον BVDV. Στις λίγες

περιπτώσεις που ο BVDV ανιχνεύεται, ο ιός ανευρίσκεται τοπικά στον εγκέφαλο και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Liess et al., 1987).

2.7.2.4 Επίμονη μόλυνση

Η ικανότητα του ιού να εγκαθιστά παρατεταμένη αντιγραφή του ιού *in vivo*, είναι σημαντική, τόσο για την επιζωοτιολογία όσο και για την παθογένεια των λοιμώξεων από BVDV. Υπάρχουν 2 μορφές παρατεταμένης αντιγραφής του ιού. Η πρώτη χαρακτηρίζεται από επίμονη αιμία μετά από ενδομήτρια μόλυνση, που καταλήγει σε εφόρου ζωής απέκκριση του ιού. Η δεύτερη συμβαίνει σε ορισμένα, αλλά όχι σε όλα τα ζώα, μετά από οξεία λοίμωξη. Στην περίπτωση αυτή, τα προσβεβλημένα ζώα απεκκρίνουν τον ιό για μήνες, μετά τη μόλυνση. Όμως, τα ζώα αυτά ανταποκρίνονται ανοσολογικά και απομακρύνουν τον ιό από τον οργανισμό, με την πάροδο του χρόνου.

Η πιο σοβαρή μορφή παρατεταμένης αντιγραφής του ιού, προέρχεται από την ενδομήτρια μόλυνση, μη – ανοσοϊκανών εμβρύων επειδή,

- Τα επίμονα μολυσμένα ζώα είναι η κύρια δεξαμενή του ιού για την εγκατάσταση οξέων λοιμώξεων.
- Οι επίμονα μολυσμένες μητέρες, είναι σημαντικές για τη δημιουργία επίμονα μολυσμένων οικογενειών, με τη συνεχή κάθετη μετάδοση.
- Η επίμονη μόλυνση παίζει σημαντικό ρόλο στην εγκατάσταση της νόσου των βλεννογόνων.

Τα επίμονα μολυσμένα ζώα χαρακτηρίζονται από ευρεία κατανομή του ιού στους ιστούς, μη – σχετιζόμενες με τον ιό μορφολογικές αλλοιώσεις και μη ανοσολογική ανταπόκριση στο στέλεχος του ιού. Η ανοσολογική ανοχή περιορίζεται αυστηρά στο στέλεχος του ιού που προκάλεσε την ενδομήτρια μόλυνση. Μολύνσεις με ετερόλογα στελέχη του ιού προκαλούν ανοσολογική απάντηση (Fulton et al., 2003). Ακόμη και μία αλλαγή στην αλληλουχία των αμινοξέων του DNA του ιού, μπορούν να προκαλέσουν την ανοσολογική ανταπόκριση του ζώου σε ετερόλογο στέλεχος του ιού (Collen et al., 2000). Τα επίμονα μολυσμένα ζώα έχουν φυσιολογική χυμική και κυτταρική ανοσία σε άλλα αντιγόνα (Houe and Heron, 1993). Οι πρόσφατες μελέτες επικεντρώνονται στους ανοσολογικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στη διατήρηση της ανοσοανοχής. Έχει αναγνωριστεί ότι η ανοσολογική ανοχή προκαλείται από τα μη αντιδρώντα CD4+ T-λεμφοκύτταρα, ενώ τα B-λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα που παρουσιάζουν τα αντιγόνα λειτουργούν φυσιολογικά (Fray et al., 2000b, Glew and Howard, 2001).

Ορισμένα PI μοσχάρια, γεννώνται χωρίς να παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα της νόσου, καθώς επίσης και χωρίς να εμφανίζουν μακροσκοπικές ή μικροσκοπικές αλλοιώσεις (Done et al., 1980, Roeder et al., 1986). Τα ζώα αυτά αποτελούν μια σημαντική πηγή για την οριζόντια και την κάθετη μετάδοση του ιού. Αποδείχθηκε πειραματικά ότι, η μετάδοση του BVDV σε άνοσα ζώα ήταν πολύ πιο αποτελεσματική

όταν προερχόταν από ζώα επίμονα μολυσμένα (Traven et al., 1991, Niskanen et al., 2000). Στα επίμονα μολυσμένα ζώα, ο BVDV ανευρίσκεται σε όλα τα όργανα και τους ιστούς και συνεπώς μεγάλης κλίμακας απέκκριση του ιού προέρχεται από πολλά σημεία των ζώων αυτών (Bielfeldt Ohmann, 1988). Ο ιός ανευρίσκεται στα απολεπισμένα δερματικά κύτταρα, τις ρινικές και στοματικές εκκρίσεις, τα κόπρανα, το ούρο, το σπέρμα και το πρωτόγαλα / γάλα των επίμονα μολυσμένων ζώων. Το ιικό αντιγόνο βρίσκεται μόνιμως στο αίμα, παρόλο που τα επίπεδα της ιαιμίας μπορεί να μεταβάλλονται (Brock et al., 1998). Έτσι, η ιατρογενής μετάδοση από μολυσμένες βελόνες ή χειρουργικά εργαλεία, είναι πιθανή.

Οι επίμονα μολυσμένες αγελάδες μπορούν να συλλάβουν και να γεννήσουν μοσχάρια. Παρουσιάζουν μειωμένη αναπαραγωγική λειτουργία που προκαλείται από σημαντικές μορφολογικές αλλαγές στις ωοθήκες, που οδηγούν σε μειωμένη ωρίμανση των ωοθυλακίων (Grooms et al., 1996). Τα μοσχάρια που γεννώνται από επίμονα μολυσμένες αγελάδες, είναι πάντα επίμονα ιαιμικά, μεταδίδουν τον ιό στις επόμενες γενιές, δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό οικογένειες επίμονα μολυσμένων ζώων.

Παρατεταμένη απέκκριση του ιού μπορεί προκληθεί μετά από οξεία λοίμωξη, ανοσοϊκανών ζώων. Η ιατρογενής ανοσοκαταστολή ή το στρες κατά τη διάρκεια της λοίμωξης, μπορεί να προκαλέσει την απέκκριση του ιού, ακόμη και 80 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό (Sandvik et al., 2000). Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο ιός 'κρύβεται' σε ανοσολογικά προνομιακά σημεία, ακόμη και αν έχει απομακρυνθεί από τους άλλους ιστούς. Αυτού του είδους η παρατεταμένη αντιγραφή έχει περιγραφεί για το γεννητικό σύστημα του αρσενικού, όπου σπέρμα μολυσμένο με BVDV ανιχνεύτηκε ακόμη και 7 μήνες μετά την οξεία λοίμωξη (Kirkland et al., 1991, Voges et al., 1998, Niskanen et al., 2002a, Givens et al., 2003).

2.7.2.5 Νόσος των βλεννογόνων

Η νόσος των βλεννογόνων αποτελεί την πιο δραματική εκδήλωση της λοίμωξης από BVDV και προκαλεί χαρακτηριστικές αλλοιώσεις. Η νόσος στα βοοειδή προκαλεί έντονες διαβρώσεις, εξελκώσεις και αιμορραγίες στις επιφάνειες των βλεννογόνων του ρύγχους, της στοματικής κοιλότητας, του οισοφάγου, των προστομάχων, του ηνύστρου και του λεπτού και του παχέος εντέρου. Περαιτέρω, παρατηρούνται έντονες αλλοιώσεις στο σπλήνα, στα λεμφογάγγλια και στο θύμο αδένα. Η νόσος είναι θανατηφόρος και τα προσβεβλημένα ζώα συνήθως πεθαίνουν 2 εβδομάδες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων.

Ο Gillespie et al. (1960) απέδειξε ότι ο ιός που προκαλεί τη νόσο των βλεννογόνων είναι παρόμοιος με τον ιό που προκαλεί την ΙΔΒ. Ο ενοφθαλμισμός ανοσοϊκανών βοοειδών με τον BVDV προκάλεσε οξεία λοίμωξη, αλλά όχι νόσο των βλεννογόνων. Παρόλο που οι οξείες BVDV λοιμώξεις συχνά καταλήγουν σε σοβαρή νόσο με αλλοιώσεις στους βλεννογόνους, τείνουν να είναι πιο περιορισμένες και λιγότερο σοβαρές από τη νόσο των βλεννογόνων. Η παθογένεια της νόσου των βλεννογόνων παρέμεινε αδιευκρίνιστη για αρκετές δεκαετίες. Μόνο όταν

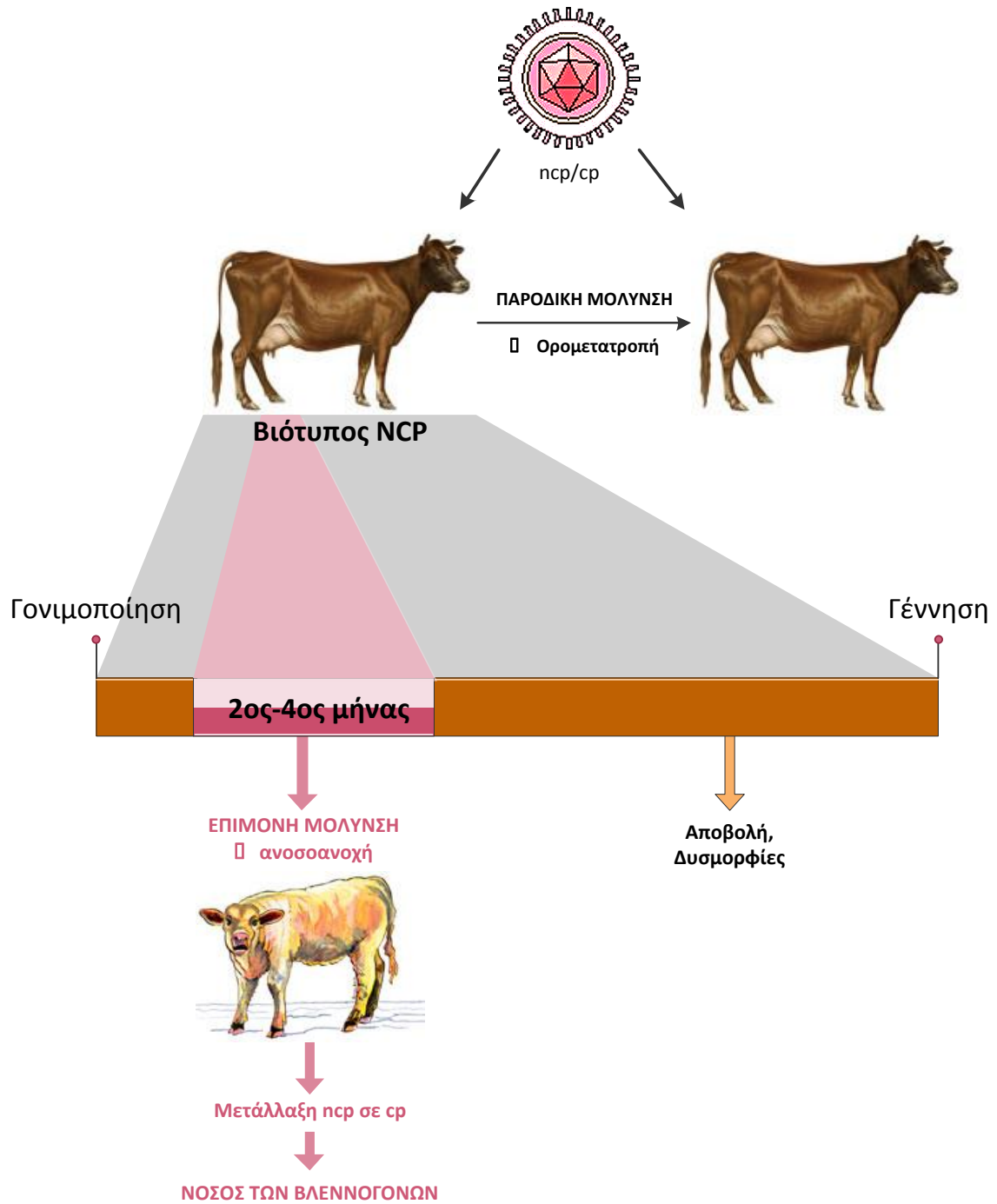
ανακαλύφθηκε ότι η ανοχή στον ιό μετά από ενδομήτρια μόλυνση του εμβρύου με ncr BVDV στέλεχος αποτελεί προαπαιτούμενο για τη εμφάνιση της νόσου των βλεννογόνων (Coria and McClurkin, 1978, McClurkin et al., 1984), οι ερευνητές κατόρθωσαν να προκαλέσουν τη νόσο. Οι δύο πρώτες ερευνητικές ομάδες που προκάλεσαν νόσο των βλεννογόνων πειραματικά, χρησιμοποίησαν ελαφρά διαφορετικές τεχνικές:

- Η μία ομάδα ενοφθάλμισε έγκυες, άνοσες αγελάδες το πρώτο τρίμηνο της κυοφορίας με το ncrBVDV, που προερχόταν από ένα ncr / cpBVDV ζευγάρι στελεχών, που είχε απομονωθεί από ασθενή με νόσο των βλεννογόνων. Αυτό κατέληξε στη γέννηση PI μόσχων (McClurkin et al., 1984). Όταν οι μόσχοι αυτοί ενοφθαλμίστηκαν με το cp στέλεχος του BVDV ζευγαριού, πέθαναν από τη νόσο των βλεννογόνων (Bolin et al., 1985b).

- Η άλλη ερευνητική ομάδα αναγνώρισε ένα κοπάδι στο οποίο υπήρχαν επίμονα μολυσμένα ζώα. Ένα από αυτά ανέπτυξε τυχαία νόσο των βλεννογόνων. Ένα cpBVDV στέλεχος απομονώθηκε από το ζώο με τη νόσο των βλεννογόνων. Όταν τα υπόλοιπα επίμονα μολυσμένα ζώα ενοφθαλμίστηκαν με το cpBVDV στέλεχος από το ασθενές ζώο, παρουσίασαν τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της νόσου των βλεννογόνων και πέθαναν σε 2-3 εβδομάδες (Brownlie et al., 1984).

Από προηγούμενες έρευνες είχε ανακαλυφθεί ότι δεν προκαλούν όλες οι πειραματικές μολύνσεις με cpBVDV στέλεχος τη νόσο των βλεννογόνων (Harkness et al., 1984). Η σύγκριση των cp / ncrBVDV ζευγών από ασθενή ζώα με νόσο των βλεννογόνων, έδειξε ότι υπάρχει στενή αντιγονική σχέση μεταξύ των cp και ncr στελεχών στα περισσότερα ζεύγη ιών (Howard et al., 1987). Συνεπώς, υποτέθηκε ότι μόνο cpBVDV με στενή αντιγονική ομοιότητα (ομόλογα στελέχη), μπορούν να προκαλέσουν τη νόσο των βλεννογόνων (Brownlie and Clarke, 1993).

Εκτός της ομολογίας μεταξύ των cp και ncrBVDV στελεχών και άλλοι παράγοντες επηρεάζουν το αποτέλεσμα της μόλυνσης. Σε φυσικές συνθήκες, η οριζόντια μετάδοση της νόσου είναι δυνατή, ειδικά από ζώα στο τελικό στάδιο της νόσου των βλεννογόνων, τα οποία εκκρίνουν και τους 2 βιότυπους του ιού. Η ενδογενής ανάπτυξη του cpBVDV σε PI ζώα έχει περιγραφεί ως ένας εναλλακτικός τρόπος μόλυνσης (Brownlie and Clarke, 1993, Fricke et al., 2001). Όταν αναπτυχθεί ομόλογο cp στέλεχος σε PI ζώο, θα προκληθεί νόσος των βλεννογόνων. Κατά τη διάρκεια του νοσήματος, εκκρίνεται cpBVDV και μολύνονται και άλλα μέλη του κοπαδιού. Τα οροθετικά ζώα έχουν ανοσία, τα οροαρνητικά θα αναπτύξουν οξύ BVD και όσα μέλη του κοπαδιού είναι επίμονα μολυσμένα, θα αναπτύξουν νόσο των βλεννογόνων. Σε ένα επίμονα μολυσμένο βοοειδές μπορεί να αναπτυχθεί μόλυνση από cpBVDV με γενετικό ανασυνδυασμό του ίδιου του ιού, με μεταφορά γενετικού υλικού από ετερόλογο στέλεχος, ή με έκθεση σε εντελώς νέο cp ή ncr στέλεχος.



Εικόνα 2.7.2.5.1. Παθογενετικός μηχανισμός πρόκλησης της νόσου των βλεννογόνων

Στις αρχικές μελέτες, τα πρώτα συμπτώματα της νόσου των βλεννογόνων αναπτύχθηκαν 2-3 εβδομάδες μετά τον ενοφθαλμισμό με το cpBVDV. Όμως, σε μεταγενέστερες μελέτες, περιγράφηκε η ανάπτυξη MD αρκετούς μήνες, έως χρόνια μετά τον ενοφθαλμισμό με cpBVDV (Brownlie and Clarke, 1993). Θεωρήθηκε ότι η πορεία του νοσήματος επηρεάζεται από το βαθμό της ομολογίας ανάμεσα στον επίμονο ncBVDV και τον cpBVDV (Brownlie and Clarke, 1993). Από πειραματικές μολύνσεις ανακαλύφθηκε ότι η πορεία του νοσήματος δεν μπορεί να προβλεφθεί (Loehr et al., 1998). Το ακόλουθο πρότυπο παρατηρήθηκε σε ζώα που ανέπτυξαν NB μήνες μετά τον ενοφθαλμισμό του cpBVDV. Αρχικά, τα ζώα εμφάνισαν παροδική, οξεία λοίμωξη από BVDV, από το cp μολύνον στέλεχος και κατόπιν ακολούθησε μια μακρά περίοδος χωρίς κλινικά συμπτώματα και παρουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων για τον cpBVDV. Η τελική φάση του νοσήματος εκδηλώθηκε με την ξαφνική εκδήλωση των χαρακτηριστικών συμπτωμάτων της NB (Loehr et al., 1998).

Ο Moennig et al. (1993), συνέκρινε το αρχικό cpBVDV στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό και το cpBVDV στέλεχος που επαναπομονώθηκε από το μολυσμένο ζώο, από ζώα που είχαν υποκύψει στη νόσο των βλεννογόνων, μήνες έως έτη μετά την πειραματική μόλυνση. Ανακαλύφθηκε ότι το επαναπομονωθέν cpBVDV στέλεχος ήταν προϊόν ανασυνδυασμού του αρχικού cpBVDV στελέχους που χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό, με το επίμονο ncBVDV στέλεχος. Ο ανασυνδυασμός επιβεβαιώθηκε εργαστηριακά με την εύρεση της αλληλουχίας (sequencing) των E2 και NS2/3 πρωτεϊνών, των εμπλεκόμενων ιών (Fritzemeier κ.α., 1995, 1998). Το ίδιο φαινόμενο περιγράφηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν ζωντανά τροποποιημένα εμβόλια (MLVs) με το cpBVDV (Ridpath and Bolin, 1995). Τέτοια φαινόμενα ανασυνδυασμού μπορούν να συμβούν ακόμη και μεταξύ των BVDV 1 και BVDV 2 γενότυπων (Ridpath and Bolin, 1995).

Βάση αυτών των ευρημάτων, η πρόωμη και η καθυστερημένη εμφάνιση της MD μπορεί να διακριθεί ως εξής:

Η πρόωμη εμφάνιση παρατηρείται 2-3 εβδομάδες μετά την αρχική έκθεση σε cpBVDV στέλεχος και το επαναπομονωθέν cp στέλεχος είναι πανομοιότυπο με το στέλεχος που προκάλεσε τη μόλυνση. Η καθυστερημένη εμφάνιση παρατηρείται μήνες έως έτη μετά την έκθεση και το επαναπομονωθέν στέλεχος είναι προϊόν ανασυνδυασμού ανάμεσα στο επίμονο ncBVDV και το αρχικό cp στέλεχος. Η διαφοροποίηση αυτή είναι δυνατή μόνο κάτω από πειραματικές συνθήκες, γιατί στο φυσικό περιβάλλον η ταυτότητα του αρχικού cpBVDV στελέχους δεν μπορεί να προσδιοριστεί, ούτε και ο χρόνος της αρχικής μόλυνσης. Τα κλινικά συμπτώματα, ανεξάρτητα του χρόνου εμφάνισης της MD είναι πανομοιότυπα και παρατηρούνται μόνο λεπτές διαφορές στις ιστικές αλλοιώσεις, στα ζώα που υποκλύπτουν στη νόσο (Moennig et al., 1993, Liebler-Tenorio et al., 2000).

Στα κλινικά περιστατικά της NB, το αντιγόνο του BVDV μπορεί να ανιχνευτεί ανοσοϊστοχημικά, από πολλά όργανα και ιστούς. Η εξέταση ζώων με νόσο των βλεννογόνων, αποκάλυψε ότι ο cpBVDV ανιχνεύεται κυρίως σε σημεία που

παρατηρείται εκτεταμένη καταστροφή των ιστών (Liebler et al., 1991). Τα σημεία αυτά περιλαμβάνουν,

- προσβεβλημένα λεμφοζύδια των αμυγδαλών, λεμφογάγγλια, το σπλήνα, το λεμφοειδή ιστό του πεπτικού και του αναπνευστικού
- το φλοιό του θύμου
- το βλεννογόνο του ανώτερου πεπτικού και τις επιθηλιακές κρύπτες του λεπτού και του παχέος εντέρου

Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνουν ότι ο cpBVDV δεν είναι μόνο σημαντικός για την παθογένεια της νόσου των βλεννογόνων, αλλά και για την εκδήλωση του νοσήματος στους βλεννογόνους και το λεμφικό ιστό. Φαίνεται ότι η αντιγραφή του cpBVDV σχετίζεται με τις αλλοιώσεις.

Στα αρχικά στάδια της NB, η αύξηση του ρυθμού του κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) και οι αλλαγές στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των αλλοιώσεων στους ιστούς και το επιθήλιο. Η απόπτωση φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην καταστροφή του εντερικού βλεννογόνου. Οι μεταβολές στο λεμφικό ιστό του εντέρου δεν προκαλούν μόνο την καταστροφή των ιστών τοπικά, αλλά επηρεάζουν ολόκληρο τον εντερικό βλεννογόνο.

Ένα κοινό εύρημα σε ετοιμοθάνατα ζώα, στην τελική φάση της NB, είναι η πολυεστιακή έως διάχυτη προσβολή του εντερικού βλεννογόνου από cpBVDV. Στο βλεννογόνο των ζώων αυτών, παρατηρείται μεγάλος αριθμός εντερικών κρυπτών χωρίς επιθηλιακά κύτταρα. Καθώς η συνεχής απώλεια των γερασμένων κυττάρων από τις λάχνες δεν αντισταθμίζεται από τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των κρυπτών, αναπτύσσεται ατροφία και εξέλκωση του βλεννογόνου. Στο στάδιο αυτό τα συμπτώματα της διάρροιας είναι εμφανή. Η προοδευτική δημιουργία των αλλοιώσεων εξηγεί την αδυναμία αποτελεσματικής θεραπείας, στα εμφανώς ασθενή ζώα.

2.8 ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ BVDV

Το κλινικό αποτέλεσμα της μόλυνσης από τον BVDV εξαρτάται από την ανοσολογική κατάσταση του ζώου και το χρόνο της μόλυνσης. Ο ιός σχετίζεται άμεσα με την αποδιάταξη του ανοσοποιητικού συστήματος, επειδή επηρεάζει τα ανοσοποιητικά κύτταρα του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων που παρουσιάζουν αντιγόνα, τα μακροφάγα και τα Β- και Τ-κύτταρα. Ο ιός έχει την ικανότητα να αποφεύγει την αναγνώριση και εξουδετέρωση του από το ανοσοποιητικό σύστημα, που είναι ιδιαίτερα πρόδηλο κατά τη μόλυνση των εμβρύων, όπου προκαλεί ανοσοανοχή και επίμονη μόλυνση. Ακόμη, ο ιός μπορεί να παραμένει σε απομονωμένα σημεία του οργανισμού, όπως στους όρχεις και στις ωοθήκες. Ο ιός παρουσιάζει αξιοσημείωτη γενετική και αντιγονική διαφοροποίηση λόγω της μεγάλης πλαστικότητας του και η ποικιλομορφία αυτή επηρεάζει την αναγνώριση του ιού από το ανοσοποιητικό σύστημα.

2.8.1 Πρωτογενής ανοσολογική αντίδραση

Η πρωτογενής / φυσική (όχι ειδική του αντιγόνου) ανοσολογική αντίδραση μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα της μόλυνσης από τον BVDV. Ο ιός προσβάλλει τα κύτταρα του πρωτογενούς (innate) ανοσοποιητικού συστήματος (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα) και επηρεάζει τη λειτουργία τους (Potgieter, 1995, Peterhans et al., 2002, Glew et al., 2003). Η προσβολή από BVDV μπορεί να προκαλέσει εξασθένηση της κυτταροτοξικής, χημειοτακτικής και της εξαρτώμενης από τα αντισώματα, κυτταροτοξικότητας των ουδετερόφιλων (Potgieter, 1995). Στα μονοκύτταρα, η μόλυνση από τον cpBVDV μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωσή τους (Glew et al., 2003). Μετά από μόλυνση από BVDV ισχυρής λοιμογόνου δύναμης, μπορεί να παρατηρηθεί μείωση 30-70% του αριθμού των μονοκυττάρων (Archambault et al., 2000). *In vitro* ή *in vivo* προσβολή των κυψελιδικών μακροφάγων με τον BVDV, μπορεί να προκαλέσει μείωση της φαγοκυττάρωσης, της έκφρασης του Fc (FcR) τμήματος και των υποδοχέων του συμπληρώματος (C3R), της μικροβιοκτόνου δραστηριότητας και των παραγόντων χημειοταξίας (Liu et al., 1999, Peterhans et al., 2002).

Συγκεκριμένοι διαλυτοί παράγοντες που ελευθερώνονται από τα προσβεβλημένα μονοκύτταρα και μακροφάγα, προκαλούν την απόπτωση των κυττάρων όταν εισάγονται σε φυσιολογικά κύτταρα (Adler et al., 1997). Η κυτταρική απόπτωση θεωρείται ότι είναι ο υπεύθυνος μηχανισμός πρόκλησης βλαβών στο λεμφικό ιστό, που παρατηρείται στη νόσο των βλεννογόνων και την οξεία μόλυνση από στελέχη BVDV μεγάλης λοιμογόνου δύναμης (Liebler-Tenorio et al., 2003, Liebler-Tenorio et al., 2002, Stroffregen et al., 2000).

Η Ιντερφερόνη (IFN) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες ενδογενείς, αμυντικές, αντιϊκές κυτταροκίνες. Η Ιντερφερόνη τύπου I, αποτελείται από δύο ορολογικά διακριτές πρωτεΐνες, την IFN- α που παράγεται από τα φαγοκύτταρα και την IFN- β που παράγεται από τους ινοβλάστες. Η μόλυνση από ιό, συμπεριλαμβανομένου και του BVDV, ενεργοποιεί ισχυρά τη παραγωγή IFN τύπου I, που αυξάνει την κυτταροτοξικότητα των φυσικών φονικών κυττάρων (NK cells). Η χορήγηση υψηλών (10^4 μονάδες / ml) δόσεων ανθρώπινης IFN- α , απέτρεψε την αντιγραφή, τόσο του ncp, όσο και του cpBVDV *in vitro*, ενώ η χορήγηση ανθρώπινης IFN- β , TNF- α και TNF- β , δεν είχε καμία επίδραση (Sentsui et al., 1998). Η μόλυνση του εμβρύου με cpBVDV προκαλεί την παραγωγή IFN, που αποτρέπει πιθανώς την εγκατάσταση επίμονης μόλυνσης. Η μόλυνση του εμβρύου με ncpBVDV δεν προκαλεί αύξηση της παραγωγής IFN- α , παρόλο που αυξήθηκαν σημαντικά οι συγκεντρώσεις όλων των IFN (α , β και γ), σε αξενικούς μόσχους (Charleston et al., 2002).

Τα κύτταρα παρουσίασης αντιγόνων (δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και μονοκύτταρα), αφομοιώνουν και παρουσιάζουν το αντιγόνο στα T-βοηθητικά κύτταρα, με τη βοήθεια της IFN- γ και της IL-12. Η μόλυνση των παραπάνω κυττάρων με τον BVDV προκαλεί μείωση της έκφρασης των υποδοχέων Fc και C3, που είναι απαραίτητοι για τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα (Adler et al., 1996). Μειώνεται επίσης η ικανότητα των μονοκυττάρων, να παρουσιάζουν τα αντιγόνα στα T-βοηθητικά κύτταρα (Glew et al., 2003).

2.8.2 Χυμική ανοσία

Παρόλο που η ενεργητική και η παθητική ανοσία δρουν προστατευτικά, διαφέρουν στη διάρκεια και την ικανότητά τους να ενεργοποιούν την ανοσολογική αντίδραση μετά από ανοσολογικό ερέθισμα. Αντισώματα κατά του BVDV ανιχνεύονται 2-3 εβδομάδες μετά τη μόλυνση και αγγίζουν το μέγιστο, 10 με 12 εβδομάδες μετά τη μόλυνση (Howard et al., 1992). Η χυμική ανοσία, όπως ανιχνεύεται από την παρουσία αντισωμάτων στον ορό κατά του BVDV, μπορεί να προκληθεί από έκθεση στο ιικό αντιγόνο (ενεργητική ανοσοποίηση), ή από το πρωτόγαλα (παθητική ανοσοποίηση). Τρεις γλυκοπρωτεΐνες του BVDV (οι: gp53/E2, gp48/E0 και gp25/E1), προκαλούν την παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων, με την E2 πρωτεΐνη να παίζει κυρίαρχο ρόλο (Bolin and Ridpath, 1990). Αντισώματα έναντι πολλών άλλων ιικών αντιγόνων (115, 90, 48 και 25kDa) έχουν επίσης ανιχνευθεί σε ορισμένα βοοειδή (Bolin and Ridpath, 1990, Boulanger et al., 1991).

2.8.3 Μητρική ανοσία

Τα αντισώματα, στα βοοειδή, δεν περνούν τον πλακούντα. Έτσι, τα μοσχάρια ανοσοποιούνται παθητικά, με την απορρόφηση, μέσω του πεπτικού συστήματος, ανοσοσφαιρινών που περιέχονται στο πρωτόγαλα. Όμως, τα μοσχάρια μπορούν να προσλάβουν αντισώματα μόνο τις πρώτες 24-48 ώρες της ζωής τους. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις αντισωμάτων κατά του BVDV στο πρωτόγαλα, ανιχνεύονται μόνο τις πρώτες ημέρες της γαλουχίας μετά τον τοκετό και κατόπιν η συγκέντρωσή τους μειώνεται δραματικά. Η παθητική ανοσοποίηση παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία από τον BVDV στα νεογέννητα μοσχάρια. Όμως η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων μητρικών αντισωμάτων μπορεί να μπλοκάρει την ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων, μετά από εμβολιασμό. Συνεπώς, ο εμβολιασμός πρέπει να διενεργείται όταν μειώνεται η συγκέντρωση των μητρικών αντισωμάτων.

Η παθητική ανοσοποίηση δεν είναι πάντοτε ασφαλής. Παράγοντες όπως: η συγκέντρωση του ιού, η φτωχή διατροφή, η έκθεση σε αντίξοες καιρικές συνθήκες, ο κακός αερισμός, το στρες της μεταφοράς και η αύξηση της πυκνότητας του πληθυσμού, μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της μόλυνσης από τον ιό, παρά τη χορήγηση πρωτογάλακτος. Επιπλέον, η αντιγονική διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών του ιού μπορεί να καταλήξει σε ανεπαρκή προστασία και το πρωτόγαλα μπορεί να διαφέρει, στην ποιότητα και στην ποσότητα των διαθέσιμων αντιγόνων. Η διατροφή και το εμβολιακό status της μητέρας, επηρεάζουν την ανοσολογική ποιότητα και την ποσότητα του πρωτογάλακτος. Για παράδειγμα, εμβολιασμός με αδρανοποιημένο εμβόλιο τον τελευταίο μήνα της κυοφορίας, θα βελτιώσει την ποσότητα των διαθέσιμων αντισωμάτων του πρωτογάλακτος. Εμβολιασμός με ζωντανά, τροποποιημένα εμβόλια κατά τη διάρκεια της κυοφορίας, θα αυξήσει επίσης την ποσότητα των αντισωμάτων στο πρωτόγαλα, αλλά η μέθοδος αυτή εμβολιασμού συνιστάται μόνο όταν προϋπάρχουν εξουδετερωτικά αντισώματα στη μητέρα. Επιπλέον, εκτός των αντισωμάτων, ευεργετικά δρουν και τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα που περιέχονται στο πρωτόγαλα. Για το λόγο αυτό, συνιστάται η χορήγηση νωπού και όχι κατεψυγμένου πρωτογάλακτος.

2.8.4 Κυτταρική ανοσία

Η μόλυνση από BVDV καταλήγει σε ήπια (10-20% μείωση), ή σοβαρή λεμφοπενία (50-60% μείωση), ανάλογα με τη λοιμογόνο δύναμη του στελεχούς του ιού που προκαλεί τη μόλυνση (Brodersen and Kelling, 1999, Archambault et al., 2000). Τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα (CD8+) επηρεάζονται περισσότερο από τα Τ-βοηθητικά κύτταρα (CD4+), ενώ δεν επηρεάζονται, ή επηρεάζονται λίγο, τα κυκλοφορούντα γ / δ Τ-κύτταρα (Brodersen and Kelling, 1999, Ellis et al., 1988). Η ελάττωση των CD4+ αυξάνει την περίοδο απέκκρισης του ιού, ενώ αντίθετα δεν επηρεάζεται από τα CD8+ και γ / δ κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι τα CD4+ βοηθητικά κύτταρα παίζουν κυρίαρχο ρόλο στο συντονισμό της κυτταρικής ανοσίας, στα αρχικά στάδια της προσβολής. Τα CD4+ κύτταρα δρουν κυρίως κατά των NS3 και E2

πρωτεϊνών (Lambot et al., 1997, Collen and Morrison, 2000, Collen et al., 2000, Collen et al., 2002), καθώς επίσης και κατά της πρωτεΐνης του καψιδίου (C), της γλυκοπρωτεΐνης E^{ms}, της αμινο-τερματικής πρωτεΐνάσης (N^{pro}) και της μη δομικής πρωτεΐνης NS2-3 (Collen et al., 2002). Τα πολλαπλασιαζόμενα CD8+ κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (CTL), παράγουν IL-2 και IFN-γ, υποδηλώνοντας μια τύπου 1 απάντηση μνήμης στα BVDV-οροθετικά βοοειδή (Howard et al., 1992, Rhodes et al., 1999).

Η μείωση της IFN-γ που προκαλείται στην οξεία λοίμωξη από τον ncpBVDV αναστέλλει την κυτταρική απάντηση στο *Mycobacterium bovis*, που μπορεί να καταλήξει στην αδυναμία αναγνώρισης της φυματίωσης (Charleston et al., 2001). Η καθυστερημένου τύπου αντίδραση ευαισθησίας, αποτελεί μια κυτταρική ανοσολογική αντίδραση που συμβαίνει περίπου 18 ώρες μετά την έκθεση σε αντιγόνο και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της κυτταρικής ανοσίας. Η αντίδραση αυτή χαρακτηρίζεται από σκλήρυνση και οίδημα στο σημείο έγχυσης του αντιγόνου, όπως του αντιγόνου του *Mycobacterium*. Μετά την έκθεση στον BVDV, η καθυστερημένου αντίδραση ευαισθησίας στο *Mycobacterium* αναστέλλεται. Συνεπώς, ο BVDV, προκαλεί γενική και μη ειδική αναστολή της κυτταρικής ανοσίας στα βοοειδή (Thoen and Waite, 1990) και μπορεί να επιπλέξει τη διάγνωση της φυματίωσης των βοοειδών (Charleston et al., 2001b).

2.8.5 Ανοσολογική ανταπόκριση των επίμονα μολυσμένων ζώων

Τα επίμονα μολυσμένα βοοειδή παρουσιάζουν ανοσοανοχή στο στέλεχος του BVDV που προκαλεί τη μόλυνση, αλλά μπορούν να προκαλέσουν ανοσολογική απάντηση σε ετερόλογο BVDV. Έχει αποδειχθεί ότι μοσχίδες, που κυοφορούν επίμονα μολυσμένα έμβρυα, αναπτύσσουν τίτλους BVDV αντισωμάτων, 5-10 φορές υψηλότερες από τις μοσχίδες με φυσιολογικά έμβρυα (Brownlie et al., 1998). Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες για να κατανοηθούν τα ανοσολογικά ελαττώματα στα επίμονα μολυσμένα ζώα (Chase, 2004). Η ανικανότητα των ncpBVDV να προκαλέσουν την παραγωγή IFN-α στο έμβρυο, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους ανοσολογικούς μηχανισμούς υπεκφυγής, που επιτρέπουν στον BVDV να εγκαταστήσει ανοχή (Charleston et al., 2002).

2.8.6 Ανοσοκαταστολή και δευτερογενείς λοιμώξεις

Παρόλο που οι περισσότερες λοιμώξεις σε ανοσοϊκανά βοοειδή είναι παροδικές και αυτο-περιοριζόμενες, είναι αποδεκτό ότι όταν προκληθεί λοίμωξη από άλλους μικροοργανισμούς, ο BVDV μπορεί να συνεισφέρει στην εμφάνιση της νόσου (Baker, 1995). Οι περισσότερες πειραματικές και φυσικές μελέτες έχουν αποδείξει τη σχέση ανάμεσα στον BVDV και άλλους λοιμογόνους παράγοντες, υποδηλώνοντας ότι ο

BVDV μπορεί να προκαλέσει ανοσοκαταστολή σε ανοσοϊκανά ζώα. Η εξασθένιση και η μείωση του αριθμού των ουδετερόφιλων και των λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία και τους λεμφικούς ιστούς, καθώς και περιβαλλοντικοί ή / και στρεσογόνοι παράγοντες, μπορούν να συνεισφέρουν στην πρόκληση της ανοσοκαταστολής (Potgieter, 1995).

Η αυξημένη ευαισθησία σε δευτερογενείς μολύνσεις είναι επακόλουθο της προκαλούμενης από τον BVDV ανοσοκαταστολής. Ο BVDV αυξάνει την ευπάθεια στις δευτερογενείς μολύνσεις, επειδή τα λεμφοκύτταρα των προσβεβλημένων από τον ιό ζώων, έχουν μειωμένη λειτουργία μνήμης για άλλα αντιγόνα και τον BVDV (Lamontagne et al., 1989). Έχει αποδειχθεί ότι η μόλυνση από BVDV παίζει σημαντικό ρόλο σε νοσήματα πολλαπλής αιτιολογίας. Το Αναπνευστικό Σύνδρομο των Βοοειδών (Bovine Respiratory Disease Complex, BRDC) είναι ένα παράδειγμα.

Δεν είναι ξεκάθαρο αν η προκαλούμενη από τον BVDV ανοσοκαταστολή ή η πρωτογενής μόλυνση του αναπνευστικού συστήματος, ευθύνεται για την πρόκληση της αναπνευστικής νόσου των βοοειδών. Ο BVDV, σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, παίζει κυρίαρχο ρόλο στην πρόκληση του συνδρόμου (Potgieter, 1997). Ο BVDV απομονώνεται συχνά από τους πνεύμονες των μολυσμένων βοοειδών (Greig et al., 1981). Ο BVDV, απομονώνεται συχνότερα από άλλους ιούς, σε εξάρσεις αναπνευστικών νοσημάτων, πολλαπλής αιτιολογίας (Richer et al., 1988). Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις για πολλά στελέχη του ιού, ότι είναι πνευμονοτρόπα.

Ο BVDV απομονώνεται συχνά και από σύμμεικτες μολύνσεις, όπως με BHV-1 (Greig et al., 1981), PI-3 (Fulton et al., 2000), BCV (bovine respiratory corona virus), BRSV (Brodersen and Kelling, 1998, 1999), *Mannheimia haemolytica* (Fulton et al., 2002), *Pasteurella multocida* (Fulton et al., 2002), *Mycoplasma bovis* (Haines et al., 2001) και *Haemophilus somnus*.

Επιπλέον της πρόκλησης ανοσοκαταστολής, ο BVDV μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλα παθογόνα και να αυξήσει τη λοιμογόνο δύναμη τους. Συνδυασμένη μόλυνση των κυψελιδικών μακροφάγων με BVDV και BRSV, προκαλεί συνεργική βλάβη στη λειτουργία των μακροφάγων (Liu et al., 1999). Η ταυτόχρονη μόλυνση από BVDV και BRSV προκαλεί στα βοοειδή σοβαρότερη εντερική και αναπνευστική νόσο και τα ζώα αυτά απεκκρίνουν μεγαλύτερες ποσότητες του BVDV με τις ρινικές εκκρίσεις (Brodersen and Kelling, 1998). Έχει επίσης αποδειχθεί και συνεργική δράση με τον BHV-1 (Greig et al., 1981). Για την απόδειξη της συνεργικής δράσης προκλήθηκε πειραματική μόλυνση. Μοσχάρια ενοφθαλμίστηκαν με BVDV 7 ημέρες πριν τον ενοφθαλμισμό του στελέχους Cooper του BHV-1 και προκλήθηκε σοβαρή νόσος, με ανίχνευση του ιού και σε άλλους ιστούς εκτός του αναπνευστικού, όπως στο πεπτικό και στους οφθαλμούς, συγκριτικά με μόσχους που ενοφθαλμίστηκε μόνο ο BHV-1 (Greig et al., 1981). Από τις παραπάνω παρατηρήσεις προκύπτει ότι η αρχική BVDV μόλυνση εξασθένησε την ικανότητα των μοσχαριών να απομακρύνουν τον BHV-1 από τους πνεύμονες και να τον συγκρατήσουν τοπικά, στο σημείο έγχυσης.

Η ικανότητα του BVDV να ενεργεί συνεργικά με άλλους ιούς δεν περιορίζεται μόνο στο αναπνευστικό σύστημα, καθώς έχει αναφερθεί συνεργική δράση του BVDV και με εντερικά παθογόνα (Kelling et al., 2002a, Woods et al., 1999). Από πειραματικές μολύνσεις σε μοσχάρια, αποδείχθηκε ότι ο BVDV και οι rotavirus μπορούν να δράσουν συνεργικά και να προκαλέσουν σοβαρότερη κλινική νόσο (Kelling et al., 2002a). Συνεργική δράση έχει επίσης αποδειχθεί και μεταξύ του BVDV και του ιού της μεταδοτικής γαστρεντερίτιδας (TGV), που προκάλεσε γενικευμένη λεμφοκυτταρική βλάβη στο λεμφικό σύστημα και ατροφία των λαχνών, σε πειραματικά μολυσμένους χοίρους (Woods et al., 1999).

2.9 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Η μόλυνση των βοοειδών με τον BVDV μπορεί να εκδηλωθεί με ένα μεγάλο εύρος κλινικών συμπτωμάτων, από αφανείς υποκλινικές λοιμώξεις μέχρι θανατηφόρα κρούσματα (Baker, 1995). Η κλινική απάντηση στη λοίμωξη είναι σύνθετη και επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, που αφορούν τον ξενιστή και τον ιό. Συνήθως το 85% των ζώων που προσβάλλονται, παρουσιάζουν παροδική ιαιμία και αποκτούν ανοσία έως την ηλικία αναπαραγωγής. Το υπόλοιπο 15% όμως, βρίσκεται σε κίνδυνο, κατά το χρόνο της έναρξης της αναπαραγωγής. Έχει εκτιμηθεί, ότι το 6 με 10% των αποβολών, προκαλούνται από τον BVDV (Duboni, 1994). Η κυρίαρχη μορφή της μόλυνσης από τον BVDV είναι η συγγενής (Munoz-Zanzi et al., 2003). Το έμβρυο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο μεταξύ των ημερών 45 έως 125 της εγκυμοσύνης (Duboni, 1994). Είναι αναμφισβήτητο, ότι σε κάθε εκτροφή που μολύνεται από τον ιό της ΙΔΒ, τα κλινικά συμπτώματα είναι επαναλαμβανόμενα. Είναι ασύνηθες να παρουσιάζονται πολλαπλά κλινικά συμπτώματα σε εκτροφές που παρουσιάζουν ΙΔΒ. Τα συμπτώματα όμως αυτά μπορούν να διαφέρουν αρκετά μεταξύ των εκτροφών. Νέα συμπτώματα της ΙΔΒ συνεχίζουν να εμφανίζονται και θα συνεχίζουν όσο περισσότερα νέα στελέχη εμπλέκονται.

Το νόσημα μεταδίδεται με αερολύματα (aerosols) που προσβάλλουν το ρινικό βλεννογόνο. Τα αερολύματα μπορούν να παγιδευτούν στον περιβαλλοντικό αέρα και να διατηρήσουν τη λοιμογόνο δύναμη τους για αποστάσεις από 1.5 έως 10 μέτρα (Niskanen and Lindberg, 2003). Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος μετάδοσης του BVDV είναι με την απευθείας επαφή. Ο ιός πολλαπλασιάζεται στα επιχώρια λεμφογάγγλια και από εκεί μεταφέρεται στο αίμα. Η ιαιμία μπορεί να ανιχνευθεί 24 ώρες μετά την προσβολή (Mills and Luginbuhl, 1968), καθώς και η παρουσία του ιού στα ούρα, 48 ώρες αργότερα. Η ιαιμία και η παρουσία του ιού στα ούρα εξαρτώνται από την παρουσία ή μη, μητρικών αντισωμάτων. Τα μητρικά αντισώματα, του πρωτογάλακτος, θεωρείται ότι διατηρούνται έως την ηλικία των 6 μηνών και γι' αυτό τα περισσότερα κρούσματα εκδηλώνονται μετά την ηλικία αυτή (Baker, 1995, Bolin, 1995).

2.9.1 Οξεία ΙΔΒ

Έχει εκτιμηθεί ότι το 70 με 90% των προσβολών από BVDV, σε ανοσοϊκανά, οροαρνητικά βοοειδή, συμβαίνουν χωρίς την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων (Ames, 1986). Τα τυπικά συμπτώματα, σε στενή παρακολούθηση, περιλαμβάνουν ήπιο πυρετό, λευκοπενία και την παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες σχετίζεται με μείωση της γαλακτοπαραγωγής (Moerman et al., 1994). Η αντιγραφή του ιού φαίνεται να συμβαίνει στον ανώτερο αναπνευστικό σωλήνα και στα επιχώρια λεμφογάγγλια (Meehan et al., 1998).

Η οξεία λοίμωξη από BVDV είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει το κλινικό νόσημα που εμφανίζεται σε ανοσοϊκανά, μη επίμονα μολυσμένα ζώα.

Τυπικά, παρατηρείται σε οροαρνητικά βοοειδή, ηλικίας από 6 -24 μηνών. Το νόσημα μπορεί να εκδηλωθεί και σε οροθετικά ζώα, όταν αυτά μολυνθούν με ετερόλογο στέλεχος ως προς αυτό που προκάλεσε την ορομετατροπή. Η νοσηρότητα και η θνησιμότητα ποικίλουν στην οξεία ΙΔΒ, αλλά συνήθως κυμαίνονται από 10 έως 30%. Σποραδικές επιζωοτίες, με αρκετά υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας, ξεσπούν σε άνοσες ή έντονα στρεσσαρισμένες ομάδες βοοειδών. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό, ανορεξία, λήθαργο, λευκοπενία, ρινικό και οφθαλμικό έκκριμα, διαβρώσεις και έλκη στη στοματική κοιλότητα, διάρροια και μειωμένη γαλακτοπαραγωγή στις αγελάδες. Διαβρώσεις του επιθηλίου μπορεί να παρατηρηθούν στο μεσοδακτύλιο διάστημα, τη στεφάνη, τις θηλές και το αιδοίο. Η παρατηρούμενη ταχύπνοια σχετίζεται με τον πυρετό ή άλλους λόγους που δεν σχετίζονται με το αναπνευστικό.

Στην αρχή της δεκαετίας του '90 καταγράφηκε μια άτυπη και πολύ σοβαρή μορφή της BVDV, στις Η.Π.Α και τον Καναδά (Corapi et al., 1990, Pellerin et al., 1994, Carman et al., 1998). Περιγράφηκε μια πολύ σοβαρή, υπεροξείας μορφής εκδήλωση της νόσου, με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα, σε όλες τις ηλικίες. Επίσης συχνές ήταν και οι αποβολές. Οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις ομοιάζαν με αυτές τις νόσου των βλεννογόνων. Οι ιοί που απομονώθηκαν από τα κρούσματα αυτά ορίστηκαν ως BVDV τύπου 2 (Ridpath et al., 1994). Πρέπει να τονιστεί ότι όλοι οι BVDV τύπου 2, δεν ευθύνονται για την εκδήλωση σοβαρής νόσου. Αντίθετα, τύπου 1 ιοί μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή νόσο.

Το αιμορραγικό σύνδρομο αποτελεί μια μορφή του σοβαρού, οξέος BVDV και φαίνεται να σχετίζεται με ncp, τύπου 2 στέλεχος BVDV. Τα προσβεβλημένα βοοειδή παρουσιάζουν υψηλή θρομβοκυτταροπενία, πετέχειες και εκχυμώσεις στους βλεννογόνους, επίσταξη, αιματηρή διάρροια, αιμορραγίες από σημεία εγχύσεων ή τραυματισμούς, πυρετό, λευκοπενία και θάνατο (Corapi et al., 1990). Πρέπει να τονιστεί ότι, ενώ όλα τα ζώα με αιμορραγικό σύνδρομο παρουσιάζουν σοβαρή οξεία νόσο, όλα τα ζώα με σοβαρή οξεία νόσο δεν εξελίσσονται σε αιμορραγικό σύνδρομο.

Η οξεία λοίμωξη των νεογνών από τον BVDV μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα εντερίτιδας ή πνευμονίας. Οι εκδηλώσεις αυτές σχετίζονται περισσότερο με έλλειψη μητρικών αντισωμάτων, καθώς η παθητική ανοσία θεωρείται προστατευτική. Η ανεπαρκής παθητική ανοσοποίηση σε συνδυασμό με την ανοσοκατασταλτική δράση του BVDV, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη δευτερογενών λοιμώξεων. Οι οξείες λοιμώξεις από BVDV καταλήγουν σε βλάβη του πεπτικού, του αναπνευστικού επιθηλίου και του δέρματος (Blowey and Weaver, 2003).

Η διαφορική διάγνωση, στα ενήλικα βοοειδή, περιλαμβάνει τη Σαλμονέλλωση, τη Δυσεντερία του χειμώνα, την Παραφυματίωση, τα παράσιτα, τον Κακοήθη Καταρροϊκό Πυρετό (Malignant Catarrhal Fever, MCF), τη δηλητηρίαση από Αρσενικό, τις Μυκοτοξινώσεις και την έλλειψη χαλκού (Blowey and Weaver, 2003, Kahrs, 2001). Η διαφορική διάγνωση για τα νοσήματα που προκαλούν αλλοιώσεις στη στοματική κοιλότητα περιλαμβάνουν τον Κακοήθη Καταρροϊκό Πυρετό, τη νόσο Blue tongue, τη φουσαλιδώδη στοματίτιδα, τη βλατιδώδη στοματίτιδα, τον αφθώδη πυρετό και την Πανώλη των Βοοειδών. Η διαφορική διάγνωση για τα νοσήματα που προκαλούν

διάρροια στα νεογέννητα περιλαμβάνει λοιμώξεις από rota- και coronavirus, Κρυπτοσποριδίωση, *E. coli*, Σαλμονέλλωση και Κοκκιδίωση. Η διαφορική διάγνωση για τα αναπνευστικά νοσήματα περιλαμβάνει τον Αναπνευστικό Συγκυτιακό Ιό των Βοοειδών (Bovine Respiratory Syncytial Virus, BRSV), *Pasteurella sp.*, *Mannheimia sp.*, *Hemophilus sp.*, *Salmonella sp.* και *Mycoplasma sp.*



Εικόνα 2.9.1.1. Μοσχάρι προσβεβλημένο από BVDV με χαρακτηριστικό οφθαλμικό και ρινικό έκκριμα (Al-Afaleq A et al., 2006).

2.9.2 Νόσος των βλεννογόνων

Τυπικά, στις ανεπτυγμένες κτηνοτροφικά χώρες, η νόσος των βλεννογόνων εμφανίζεται σποραδικά και επηρεάζει λιγότερο από το 5% των εκτροφών (Houe, 2005). Σε ξεσπάσματα της νόσου, προσβάλλονται πολλά ζώα παρόμοιων ηλικιών. Σε τέτοιες επιζωοτίες μπορεί να μολυνθεί το 25% του κοπαδιού.

Τα κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό, ανορεξία, ταχυκαρδία, πολύπνοια, μειωμένη γαλακτοπαραγωγή και άφθονη υδαρή διάρροια. Η διάρροια συχνά χαρακτηρίζεται από την παρουσία βλέννης, ινών, αίματος και δυσάρεστη οσμή. Παρόμοια με την οξεία μορφή συμπτώματα μπορεί να παρατηρηθούν και είναι πιο εμφανή. Μπορεί να παρατηρηθούν διαβρώσεις και έλκη στη γλώσσα, την υπερώα και τα ούλα. Οι θηλές της γλώσσας μπορεί να είναι αιμορραγικές. Εμφανείς επιθηλιακές διαβρώσεις μπορούν να παρατηρηθούν στα μεσοδακτύλια διαστήματα, τη στεφάνη, τις θηλές, το αιδοίο και την ακροποσθία. Επιπλέον κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνουν ρινικό και οφθαλμικό έκκριμα, οίδημα του κερατοειδούς, σιελόρροια, μειωμένο ρυθμό συσπάσεων της μεγάλης κοιλίας και τυμπανισμό. Κλινικά, συχνά παρατηρείται λευκοπενία και θρομβοκυτταροπενία. Δευτερογενείς βακτηριακές επιπλοκές μπορεί να περιλαμβάνουν πνευμονία, μαστίτιδα και μητρίτιδα. Η θνησιμότητα μπορεί να αγγίξει το 100%. Ορισμένα όμως ζώα μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτύξουν τη χρόνια μορφή της νόσου των βλεννογόνων.

Νεκροτομικά, παρατηρούνται πολλαπλές περιοχές με έλκη και διαβρώσεις σε όλο το πεπτικό (οισοφάγο, μεγάλη κοιλία, ήνυστρο, λεπτό έντερο, τυφλό και το κόλον). Διαβρώσεις μπορούν να παρατηρηθούν και στους ρώθωνες και το ανώτερο αναπνευστικό. Οι πλάκες του Peyer στο λεπτό έντερο είναι συχνά νεκρωτικές και αιμορραγικές. Το περιεχόμενο του εντέρου είναι υδαρές και δύσοσμο. Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει τα ίδια νοσήματα με αυτά που αναφέρθηκαν για την οξεία μορφή του νοσήματος. Παρόλο που τα κλινικά συμπτώματα του αιμορραγικού συνδρόμου και της νόσου των βλεννογόνων μπορεί να είναι παρόμοια, η υποστηρικτική αγωγή μπορεί να βελτιώσει την κλινική εικόνα ζώων με αιμορραγικό σύνδρομο, ενώ αντίθετα τα ζώα δεν ανταποκρίνονται στη νόσο των βλεννογόνων.

Ένα μικρός αριθμός ζώων που επιβιώνουν της οξείας μορφής της νόσου των βλεννογόνων, παρουσιάζουν τη χρόνια μορφή. Τυπικά, παρατηρείται διαλείπουσα διάρροια. Ακόμη, παρατηρούνται, κακή όψη του τριχώματος, ήπια ανορεξία, χρόνιος τυμπανισμός, διαβρώσεις του μεσοδακτύλιου διαστήματος και μη ιάσιμες διαβρώσεις του δέρματος. Επίσης, μπορούν να παρατηρηθούν ρινικό και οφθαλμικό έκκριμα. Μπορεί να αναπτυχθούν αλωπεκία και εστίες υπερκεράτωσης, ειδικά στον αυχένα και το κεφάλι. Μπορεί να παρατηρηθεί και χωλότητα. Τα εργαστηριακά ευρήματα περιλαμβάνουν την αναιμία, ουδετεροπενία και θρομβοκυτταροπενία.

2.9.3 Συμπτώματα από το αναπαραγωγικό σύστημα

Ο BVDV εμπλέκεται σε σοβαρά προβλήματα στην αναπαραγωγή, όπως στη μειωμένη γονιμότητα και στον πρώιμο εμβρυϊκό θάνατο. Όλα τα όργανα του

αναπαραγωγικού συστήματος του θηλυκού μπορούν να προσβληθούν από τον BVDV και η κατανομή του ιού είναι ίδια, μεταξύ της οξείας μορφής και της νόσου των βλεννογόνων (Fray et al., 2000).

Η μόλυνση μιας ανοσοϊκανής εγκύου αγελάδας μπορεί να εκδηλωθεί με τα κλινικά συμπτώματα που περιγράφηκαν παραπάνω, δηλαδή υποκλινική έως σοβαρή οξεία νόσο ή αιμορραγικό σύνδρομο. Τα πρόσθετα προβλήματα αφορούν τη διαπλακούντια μετάδοση του ιού. Ο BVDV περνά τον πλακούντα με 100 % αποτελεσματικότητα, συνεπώς θα πρέπει να θεωρείται δεδομένη η μόλυνση του εμβρύου (Duffel and Harkness, 1985). Ο κύριος παράγοντας που καθορίζει το αποτέλεσμα της μόλυνσης του εμβρύου, είναι η ηλικία του κατά τη μόλυνση.

Η μόλυνση της μητέρας κατά την περίοδο πριν την εγκατάσταση και αναγνώριση της εγκυμοσύνης (<40^η ημέρα), αυξάνει την εμβρυϊκή θνησιμότητα, ενώ η μόλυνση μεταξύ της 40^{ης} έως 125^{ης} ημέρας της εγκυμοσύνης μπορεί να προκαλέσει εμβρυϊκό θάνατο, αποβολή, μουμιοποίηση, γέννηση επίμονα μολυσμένων μοσχारीών και σε μικρότερο βαθμό τερατογενέσεις. Μόλυνση του εμβρύου στο μέσο της εγκυμοσύνης (125^η με 180^η), καταλήγει σε αύξηση της εμφάνισης συγγενών ανωμαλιών (Baker, 1995). Η εμφάνιση αποβολών είναι χαμηλή στα ανοσοποιημένα κοπάδια και αυξάνει στα άνοσα (Sanderson and Gnad, 2002). Επιπρόσθετα, εξάρσεις οξείας νόσου που οφείλονται στο γενότυπο 2, σχετίζονται με αύξηση της συχνότητας των αποβολών (Grooms et al., 2002).

Οι συγγενείς ανωμαλίες προκαλούνται από τη διαπλακούντια μετάδοση του ιού. Έχει αποδειχθεί ότι ο BVDV μπορεί να έχει τερατογόνο δράση (Mickelsen and Evermann, 1994). Η διαπλακούντια μόλυνση του εμβρύου από τον BVDV, ανάμεσα στην 100^η με 180^η ημέρα της εγκυμοσύνης, μπορεί να προκαλέσει συγγενείς ανωμαλίες. Μερικές από αυτές περιλαμβάνουν ανωμαλίες του ΚΝΣ (υποπλασία της παρεγκεφαλίδας, υδροκέφαλο, υπομυελινογένεση), οφθαλμικές ανωμαλίες (ατροφία και δυσπλασία του αμφιβληστροειδούς, καταρράκτη, μικροφθαλμία), υποπλασία του θύμου, καθυστερημένη ανάπτυξη, υποπλασία των πνευμόνων, αλωπεκία, υποτρίχωση, βραχυγναθισμό, αρθρογύπωση και άλλες σκελετικές ανωμαλίες (Baker, 1995).

Ο Kafi et al., (2002), απέδειξε ότι ο BVDV έχει καταστροφικές επιδράσεις στην *in vitro* γονιμοποίηση και στην πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.

2.9.4 Διάρκεια και σοβαρότητα των συμπτωμάτων

Η περίοδος επώασης διαρκεί 5-7 ημέρες (Grooms et al., 2002). Κατόπιν ακολουθούν πυρετός, λήθαργος, ανορεξία, οφθαλμικές αλλοιώσεις, οφθαλμορινικό έκκριμα, διάρροια και μειωμένη γαλακτοπαραγωγή στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες. Η ιαιμία μπορεί να διαρκέσει έως 15 ημέρες. Η διάρκεια των κλινικών συμπτωμάτων συνεπώς διαφέρει, και εξαρτάται από τη διάρκεια της ιαιμίας, τη λοιμογόνο δύναμη του ιού, την παρουσία δευτερογενών λοιμώξεων και τη φυσιολογική, αναγεννητική ικανότητα των προσβεβλημένων ιστών. Γενικά, η αποκατάσταση των βλαβών των επιθηλίων απαιτεί 1-2 εβδομάδες, ενώ η αποκατάσταση των αλλοιώσεων στο

βλεννογόνο του πεπτικού συντελείται σε περίπου 3-5 ημέρες. Η αποκατάσταση των ιστών παρατείνεται όσο αυξάνει η λοιμογόνος δύναμη του ιού (Liebler – Tenorio et al., 2003b).

Οι επιμολύνσεις επηρεάζουν τη διάρκεια και τη σοβαρότητα της νόσου. Το γεγονός ότι ο BVDV προκαλεί ανοσοκαταστολή, ευνοεί τις επιμολύνσεις. Διατροφικές ανεπάρκειες, όπως στην έλλειψη Σεληνίου, προδιαθέτουν σε πιο έντονες μολύνσεις από BVDV καθώς και στην ταυτόχρονη μόλυνση από τον *Haemophilus somnus*.

Βοοειδή που νοσούν από οξύ BVDV και δεν παρουσιάζουν δευτερογενείς μολύνσεις, συνήθως αναρρώνουν. Ο χρόνος ανάρρωσης εξαρτάται από τη διάρκεια της ιαιμίας καθώς και από τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων. Αν υπάρχουν δευτερογενείς μολύνσεις, ο χρόνος ανάρρωσης εξαρτάται από τη σοβαρότητά τους. Βοοειδή που εμφανίζουν νόσο των βλεννογόνων συνήθως καταλήγουν σε 3-10 ημέρες και στην περίπτωση που επιβιώσουν εμφανίζουν τη χρόνια μορφή της νόσου των βλεννογόνων, στην οποία η επιβίωση δεν ξεπερνά τους 18 μήνες (Bolin, 1995)

2.10 ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Έχουν δημοσιευτεί μελέτες για μόλυνση του ανθρώπου από τον BVDV (Giangaspero et al., 1993). Ο επιπολασμός των αντισωμάτων κατά του BVDV σε ανθρώπους, σε μελέτη που έγινε στη Ζάμπια, κυμαινόταν από 14,75% σε υγιείς μη μολυσμένους από τον HIV ανθρώπους, έως 19,2% σε θετικούς στον HIV που παρουσίαζαν χρόνια διάρροια. Η στατιστικά σημαντική ορομετατροπή που παρατηρήθηκε στους ασθενείς αυτούς προέτρεψε τους συγγραφείς να υποθέσουν ότι υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ HIV και BVDV. Όμως, ένας σημαντικός αριθμός παραγόντων καθιστά μη πιθανή τη μετάδοση του BVDV στον άνθρωπο:

- Δεν έχει δημοσιευτεί άλλη μελέτη ορομετατροπής για BVDV σε ανθρώπους που δουλεύουν εργαστηριακά τον ιό, ή που εργάζονται κοντά σε ζώα μολυσμένα από τον ιό

Ο BVDV δεν έχει αναπτυχθεί επιτυχώς σε κύτταρα πρωτεύοντων, γεννώντας αμφιβολίες για τη δυνατότητα μόλυνσης ή ορομετατροπής σε πρωτεύοντες οργανισμούς.

2.11 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση του BVDV μπορεί, σε ορισμένες περιπτώσεις να γίνει από το ιστορικό, τα κλινικά συμπτώματα και τη νεκροτομική εξέταση. Όμως, τα κλινικά συμπτώματα ποικίλλουν σημαντικά, ανάλογα με το στέλεχος του ιού, την ηλικία και την ανοσολογική κατάσταση του ζώου, καθώς επίσης και από το αναπαραγωγικό στάδιο και την παρουσία και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. Με βάση όλη την παραπάνω συμπτωματολογία δεν μπορεί να τεθεί διάγνωση από το ιστορικό και τα κλινικά συμπτώματα και η ακριβής και οριστική διάγνωση του BVDV εξαρτάται από την εργαστηριακή διάγνωση. Για την οριστική διάγνωση, είναι απαραίτητες οι εργαστηριακές εξετάσεις. Οι τεχνικές ανίχνευσης του ιού έχουν βελτιωθεί σημαντικά. Αρκετές μέθοδοι είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση του ιού, των αντισωμάτων ή των συστατικών του ιού (αντιγόνο και νουκλεϊκό οξύ). Αρκετά παραγωγικές μέθοδοι διατίθενται για τον έλεγχο εκτροφών και την απομάκρυνση των PI ζώων.

Η διαθεσιμότητα γρήγορων και αξιόπιστων εργαστηριακών δοκιμών δεν είναι απαραίτητη μόνο για τα προγράμματα ελέγχου, αλλά και για την πρόγνωση, την παρακολούθηση και την επιζωοτιολογία των BVDV λοιμώξεων. Μία άλλη σημαντική παράμετρος για την οποία απαιτείται ακριβής διάγνωση, είναι η παρουσία του ιού ή των αντισωμάτων του σε βιολογικά υλικά βόειας προέλευσης, όπως στο ορό εμβρύου μόσχου ή σε κυτταροκαλλιέργειες. Ο ορός εμβρύου μόσχου (FCS) και ο βόειος ορός χρησιμοποιούνται σε κυτταροκαλλιέργειες ως μη ειδικά θρεπτικά συστατικά και είναι συχνά μολυσμένα από τον BVDV (Bolin et al., 1991, Potts et al., 1989). Η χρήση μολυσμένου βόειου ορού μπορεί να καταλήξει σε μόλυνση των κυτταροκαλλιεργειών, προκαλώντας προβλήματα, όπως π.χ., την παραγωγή μολυσμένων εμβολίων, με αποτέλεσμα την ορομετατροπή ή τη νόσηση εμβολιασμένων ζώων (Levings and Wessman, 1991, Wessman and Levings, 1999). Υπερλοιμογόνες λοιμώξεις στην Ολλανδία και την Ιταλία, αποδόθηκαν στη μόλυνση από τον BVDV, των BHV-1 σημασμένων εμβολίων (Falcone et al., 1999). Η χρήση μολυσμένου ορού ή κυτταροκαλλιεργειών μπορεί ακόμη να παρεμποδίσει τη διάγνωση άλλων ιογενών νοσημάτων.

Για τους σκοπούς της *in vitro* παραγωγής εμβρύων, συλλέγονται από τα σφαγεία, τμήματα του γεννητικού συστήματος των θηλυκών ζώων. Συγκεκριμένος αριθμός των συλλεχθέντων αυτών ιστών είναι δυνατό να είναι μολυσμένοι από BVDV και η χρήση τους είναι πιθανό να συμβάλει στη μετάδοση του ιού. Συνεπώς, όλα τα υλικά ζωικής προέλευσης που χρησιμοποιούνται για τεχνητή γονιμοποίηση, πρέπει να ελέγχονται για BVDV (Givens et al., 2002). Είναι σημαντικό να ελέγχονται συνεχώς οι FCS, οι κυτταροκαλλιέργειες και τα ζωντανά εμβόλια για τον BVDV. Οι ακτινοβολίες γ, η έκθεση σε υπεριώδεις ακτινοβολίες και η αδρανοποίηση με β-προπιολακτόνη, έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση του BVDV από το FCS (Zabal et al., 2000).

Για τον προσδιορισμό των αντιγόνων, των αντισωμάτων και των ιϊκών συστατικών (αντιγόνο και νουκλεϊκό οξύ) του BVDV, χρησιμοποιούνται διάφορες

διαγνωστικές δοκιμασίες. Κάθε μέθοδος έχει πλεονεκτήματα, μειονεκτήματα και εφαρμοσιμότητα. Παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα μιας μεθόδου περιλαμβάνουν την αντιγονική ή / και τη γενετική ποικιλομορφία του ιού, διακυμάνσεις στην ποσότητα του ιού και διαγνωστική σύγχυση με αντισώματα που προέρχονται από το πρωτόγαλα. Μέθοδοι που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα (Mabs), μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαχωριστούν ιοί του γένους pestiviruses (BVDV, η νόσος Border των προβάτων και η κλασική πανώλη του χοίρου). Υπάρχουν ακόμη μέθοδοι για το διαχωρισμό του ιού στους υπότυπους 1a, 1b και 2.

2.11.1 ΑΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ

Οι μέθοδοι για την ανίχνευση των αντιγόνων σε δείγματα, είναι γρήγορες και ίδιας ευαισθησίας με τις άλλες μεθόδους. Όμως, η παρουσία των ιϊκών αντιγόνων στους ιστούς, συχνά δεν σχετίζεται με αλλοιώσεις, ειδικά στις υποκλινικές και τις επίμονες λοιμώξεις. Στις επίμονες μολύνσεις και τη νόσο των βλεννογόνων, ο ιός μπορεί να απομονωθεί από όλους σχεδόν τους ιστούς. Ομοίως, μόλυνση από τον υψηλής λοιμογόνου δύναμης γενότυπο 2, καταλήγει στην εξάπλωση του ιού σε όλους τους ιστούς. Οι δοκιμασίες που μπορούν να εφαρμοστούν για την άμεση ανίχνευση του αντιγόνου, σε νωπούς, κατεψυγμένους ή σταθερούς ιστούς, περιλαμβάνουν τη δοκιμασία ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA), την ανοσοϊστοχημεία (Immunohistochemistry, IHC) (συμπεριλαμβανομένων της χρώσης με ανοσοϋπεροξειδάση των περιφερικών λευκοκυττάρων και των βιοψιών του δέρματος) και τον ανοσοφθορισμό.

2.11.1.1 Ανοσοφθορισμός

Σε μία μελέτη, η μέθοδος δεν ήταν τόσο επιτυχής (Werding et al., 1989a).

2.11.1.2 Ανοσοϊστοχημεία των περιφερικών λευκοκυττάρων

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση BVDV σε επιχρίσματα κυττάρων από το buffy coat (Saino et al., 1994).

2.11.1.3 Ανοσοϊστοχημεία των βιοψιών του δέρματος

Η διαγνωστική, ανοσοϊστολογική εξέταση βιοψιών του δέρματος (δείγμα από εντομές στο δέρμα του ωτός), χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό των επίμονα μολυσμένων ζώων. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε ιστούς νεκρών ζώων, του θυρεοειδή, του δέρματος, του στοματικού βλεννογόνου, του οισοφάγου και του ηνύστρου, ως δείγματα για ανοσοϊστοχημική εξέταση (Thur et al., 1996). Η

ανοσοϊστοχημική εξέταση, αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για την ανίχνευση του BVDV και θεωρείται καλύτερη από την ιστοπαθολογική εξέταση των δειγμάτων (Haines and Ellis, 1994, Hewicker-Trautwein et al., 1995). Ο Bolin et al., (1994), σε μια μελέτη για τον έλεγχο 41 κυτταρικών σειρών για την παρουσία αντιγόνου ή RNA του BVDV, βρήκε εξαιρετική συσχέτιση ανάμεσα στην IHC και την RT-PCR. Η παρουσία των ληφθέντων με το πρωτόγαλα μητρικών αντισωμάτων, δεν αλληλεπιδρά με την IHC των βιοψιών του δέρματος (Grooms and Keilen, 2002).

Το μονοκλωνικό αντίσωμα (Mab) που χρησιμοποιείται για την IHC πρέπει να επιλέγεται πολύ προσεκτικά, επειδή μόνο 1 από τα 32 Mabs κατά των πρωτεϊνών και γλυκοπρωτεϊνών του BVDV, μπόρεσε να ανιχνεύσει τον BVDV με IHC (Haines et al., 1992). Αυτό το Mab (οριζόμενο ως 15C5), χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση των ιικών αντιγόνων στην IHC (Baszler et al., 1995, Ellis et al., 1995).

2.11.1.4 ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ (ELISA)

Πολλές τεχνικές ανίχνευσης αντιγόνου ELISA (AC-ELISA) έχουν αναπτυχθεί για την άμεση ανίχνευση των BVDV αντιγόνων σε κύτταρα του buffy coat, τον ορό και από το αυτί (ear notch samples). Μία μέθοδος που θα ανίχνευε όλα τα έως τώρα κυκλοφορούντα στελέχη του BVDV, είναι η επιθυμητή. Ο ορός αποτελεί καλό δείγμα για την ανίχνευση επίμονα μολυσμένων ζώων με την AC-ELISA. Τα ζώα με την οξεία μορφή του νοσήματος σπάνια ανιχνεύονται, γιατί ο ιός βρίσκεται στο αίμα για μικρό χρονικό διάστημα. Μονοκλωνικά αντισώματα κατά της μη δομικής πρωτεΐνης των pestiviruses (NS2/3), χρησιμοποιούνται στην AC-ELISA. Με τη τεχνική αυτή, έχει προσδιοριστεί ότι τα αποτελέσματα σχετίζονται με τη τεχνική της απομόνωσης του ιού (virus isolation) (Sandvik and Krogsrud, 1995, Greiser-Wilke et al., 1992).

2.11.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ

Η πιο αξιόπιστη μέθοδος ανίχνευσης της μόλυνσης από BVDV είναι η απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες και κατόπιν η ταυτοποίηση του με ανοσοφθορισμό ή ανοσοϊεροξείδωση (IPMA, Werdin et al., 1989a) ή με RT-PCR (Ridpath et al., 2002). Κατά τη διάρκεια της ιαμίας, ο ιός μπορεί να απομονωθεί από το ρινικό έκκριμα, τα κύτταρα του buffy coat (PBLs), τους πνεύμονες και τα κόπρανα. Η παρουσία αντι-BVDV αντισωμάτων μπορεί να επιπλέξει τα αποτελέσματα, σε δείγματα ορού και κυττάρων από το buffy coat.

Πολλά διαφορετικά κύτταρα βόειας προέλευσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη του BVDV, αλλά τα βόεια κύτταρα των ρινικών κογχών είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα για την απομόνωση του ιού, επειδή είναι τα πιο ευαίσθητα στην κυτταροπαθογόνο δράση του ιού, ώστε να είναι ευκολότερη η διαφοροποίηση ανάμεσα στα κυτταροπαθογόνα και μη κυτταροπαθογόνα στελέχη του BVDV.

Ο ιός από την καλλιέργεια μπορεί να ταυτοποιηθεί με άμεσο ανοσοφθορισμό (DFA), δοκιμή της ανοσοϋπεροξειδάσης, AC-ELISA και RT-PCR.

Πίνακας 2.11.2.1. Διαθέσιμα διαγνωστικά τεστ για την ανίχνευση του BVDV ή του ιϊκού αντιγόνου

Τεστ	Ατομικά ή ομαδικά	Ανάγκες	Ανίχνευση	Ερμηνεία
Χρώση με ανοσοϋπεροξειδάση	Ατομικά	Αίμα ή δείγμα ιστών	Ιϊκό αντιγόνο	Δίνει θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα
Ac-ELISA	Ατομικά	Αίμα	Ιϊκό αντιγόνο	Δίνει θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα
Απομόνωση του ιού	Ατομικά	Αίμα	Ζωντανός ιός	Δίνει θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα
PCR στη δεξαμενή του γάλακτος	Ανάμειξη δειγμάτων έως 100 ζώων	300ml φρέσκου γάλακτος	Ιϊκό RNA	Το θετικό αποτέλεσμα υποδηλώνει την παρουσία ενός τουλάχιστον PI ζώου, από την ομάδα των αρμεγόμενων ζώων, κατά το χρόνο της δειγματοληψίας

2.11.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Μια έμμεση μέθοδος ανίχνευσης της μόλυνσης από ιό, είναι η ανίχνευση των ειδικών κατά του ιού αντισωμάτων, στον ορό. Όμως, συχνά είναι δύσκολο να διαφοροποιηθούν τα αντισώματα που παράγονται ως απάντηση σε οξεία λοίμωξη, εμβολιασμό ή τα προερχόμενα από το πρωτόγαλα. Στα βοοειδή, τα μοσχάρια γεννώνται συνήθως χωρίς αντισώματα, τα οποία παρέχονται με το πρωτόγαλα από τη μητέρα. Η παθητική αυτή ανοσοποίηση διαρκεί για 3 με 8 μήνες. Έτσι, η ανεύρεση αντισωμάτων σε μοσχάρια στα οποία δεν χορηγήθηκε πρωτόγαλα αποδίδεται, είτε σε οξεία μόλυνση (*in utero* ή μετεμβρυϊκή), είτε σε εμβολιασμό. Η ορομετατροπή σε ζώα δείκτες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως απόδειξη για πιθανή έκθεση τους σε επίμονα μολυσμένα ζώα. Πολλές διαγνωστικές δοκιμασίες είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση των αντι-BVDV αντισωμάτων, όπως η δοκιμή εξουδετέρωσης του ιού (Virus Neutralisation, VN), η μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού (Indirect Immunofluoresence, IIF) και οι διαγνωστικές δοκιμασίες ELISA (Sandvik, 1999).

2.11.3.1 Δοκιμή εξουδετέρωσης του ιού (VN)

Η δοκιμή εξουδετέρωσης του ιού (VN), γνωστή επίσης και ως οροεξουδετέρωση (Serum Neutralisation, SN), θεωρείται ότι είναι η μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση των αντι-BVDV αντισωμάτων και χρησιμοποιείται παγκόσμια (Rossi and Kiesel, 1971). Στη μέθοδο αυτή, διπλά, αραιωμένα δείγματα του ορού, ενοφθαλμίζονται με σταθερή ποσότητα του ιού (200-500 TCID₅₀) και επωάζονται για 1 ώρα και ακολουθεί η προσθήκη κυττάρων δεικτών. Μετά από επώαση στους 37°C για 4-5 ημέρες, γίνεται η ανάγνωση. Η υψηλότερη αραιώση του ορού που αναστέλλει την κυτταροπαθογόνο δράση του ιού, στο 50% των ενοφθαλμισμένων κυττάρων, θεωρείται ο τίτλος αντισωμάτων του ορού. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και των δύο γενότυπων του ιού, ανάλογα το ιικό στέλεχος που χρησιμοποιείται. Στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται cp στελέχη του ιού. Μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν και ncr στελέχη του ιού και στην περίπτωση αυτή η αναστολή της ιϊκής μολυσματικότητας ανιχνεύεται με τη χρώση με ανοσοϋπεροξειδάση των μολυσμένων κυττάρων (Fulton et al., 1997).

Οι τίτλοι αντισωμάτων που προέρχονται από οξεία λοίμωξη μπορούν να διαφοροποιηθούν από τους εμβολιακούς τίτλους, με τη χρήση ζευγών ορών. Στη περίπτωση αυτή παρατηρείται τετραπλασιασμός του τίτλου των αντισωμάτων. Τα εξουδετερωτικά αντισώματα εμφανίζονται συνήθως 3-4 εβδομάδες μετά τη μόλυνση και ανιχνεύονται για χρόνια. Οι εμβολιακοί τίτλοι μπορούν επίσης να ανιχνεύονται για χρόνια. Τα μητρικά αντισώματα μειώνονται μετά από 105 έως 230 ημέρες (αλλά μπορούν να παραμείνουν για περισσότερο από ένα έτος).

2.11.3.2 ELISA

Πολλές διαγνωστικές δοκιμασίες ELISA έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση των αντι-BVDV αντισωμάτων στο ορό. Τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες ELISA περιλαμβάνουν ολόκληρα ιϊκά αντιγόνα, μη δομικές πρωτεΐνες, μονοκλωνικά αντισώματα και πεπτίδια. Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα των δοκιμών ELISA, π.χ., αντιγόνο, συνδεδεμένο αντίσωμα, το δείγμα κλπ (Schrijver and Kramps, 1998). Η τεχνική που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του ολόκληρου αντιγόνου, μπορεί να επηρεάσει την ειδικότητα και την ευαισθησία της δοκιμής ELISA.

Η ειδικότητα της οροδιάγνωσης έχει βελτιωθεί σημαντικά με τη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων στις ανταγωνιστικές ELISA και μπορεί να βελτιωθεί ακόμη περισσότερο με τη χρήση συγκεκριμένων αντιγόνων που προέρχονται από τεχνικές ανασυνδυασμού του DNA (Haines and Ellis, 1994).

2.11.3.3 Ανοσοϋπεροξειδάση και ανοσοφθορισμός

Σήμερα έχουν αντικατασταθεί από τις παραπάνω τεχνικές.

2.11.3.4 RT-PCR

Εξαιτίας της υψηλής της ευαισθησίας, η RT-PCR θεωρείται καλή εναλλακτική μέθοδος ανίχνευσης του ιού, ειδικά σε δείγματα διαλογής, όπως στις δεξαμενές γάλακτος. Λόγω της αντιγονικής ποικιλομορφίας του BVDV, είναι απαραίτητο να επιλέγονται σωστά και να ελέγχονται οι εκκινητές. Η ανίχνευση του ιού με την RT-PCR έχει βρεθεί ότι είναι πιο γρήγορη και πιο ευαίσθητη από τις δοκιμές ανίχνευσης του ιού. Επιπλέον, αντίθετα από αυτές, η RT-PCR δεν επηρεάζεται από τη παρουσία μητρικών αντισωμάτων.

Η χρήση της RT-PCR δεν είναι, όμως, χωρίς μειονεκτήματα. Για παράδειγμα, η μέθοδος δεν διαφοροποιεί μεταξύ του νουκλεϊκού οξέος που προέρχεται από ζωντανό ή αδρανοποιημένο ιό και μπορεί να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ένα προαπαιτούμενο για την ορθή εκτέλεση της RT-PCR είναι η απλή και αποτελεσματική προετοιμασία των δειγμάτων.

2.11.4 ΤΟ ΓΑΛΑ ΩΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ

Ο έλεγχος δειγμάτων γάλακτος από τη δεξαμενή του γάλακτος για την ανίχνευση αντισωμάτων ή αντιγόνου, είναι ένα υποσχόμενο διαγνωστικό εργαλείο, για τον εντοπισμό επίμονα μολυσμένων ζώων. Το γάλα φυγοκεντρείται για την απομάκρυνση του λίπους και αναραιώτο, αποβουτυρωμένο γάλα, ελέγχεται συνήθως με ELISA. Λόγω της ευκολίας στη δειγματοληψία, η μέθοδος αυτή προτιμάται για μεγάλης κλίμακας επιζωοτιολογικές μελέτες και για τον έλεγχο κοπαδιών. Σύμφωνα με το σχήμα του Alenius, τα δείγματα μπορούν να ταξινομηθούν σε 4 κατηγορίες, ανάλογα με τα επίπεδα των αντισωμάτων. Δείγματα που ταξινομούνται στη κλίμακα 0-1 είναι σπάνια θετικά στον ιό, ενώ δείγματα της κατηγορίας 2-3 είναι πιθανώς θετικά (Meier et al., 2003). Η παραπάνω είναι μέθοδος ρουτίνας στις Σκανδιναβικές χώρες.

Η RT-PCR έχει αποδειχθεί ευαίσθητη και οικονομική μέθοδος για την ανίχνευση BVDV σε δεξαμενές γάλακτος, ακόμη και ενός επίμονα μολυσμένου ζώου, σε ολόκληρο κοπάδι (Renshaw et al., 2000), επειδή συνήθως οι τίτλοι του ιού είναι υψηλότεροι στο γάλα από τον ορό. Σε μια συγκριτική μελέτη, ο BVDV επιτεύχθηκε να ανιχνευτεί, τόσο με την τεχνική απομόνωσης του ιού, όσο και με την RT-PCR, όταν γάλα από ένα επίμονα μολυσμένο ζώο αραιώθηκε 1:600 φορές, με γάλα από οροαρνητική εκτροφή. Ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ των δύο τεχνικών ήταν 95,9% (Renshaw et al., 2000).

2.11.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΕΠΙΜΟΝΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΖΩΑ

Τα επίμονα μολυσμένα ζώα θεωρούνται ‘εργοστάσια του ιού’ για τα υπόλοιπα. Απεκκρίνουν ισοβίως μεγάλες ποσότητες του ιού και πρέπει να ανιχνεύονται και να

απομακρύνονται από το κοπάδι άμεσα. Μετά τον εντοπισμό και την απομάκρυνση των PI ζώων από μια εκτροφή, όσα ζώα εισάγονται θα πρέπει να απομονώνονται μέχρι να πιστοποιηθούν ως απαλλαγμένα από BVDV (Duffel and Harkness, 1985).

Άλλη σημαντική πηγή του ιού, που δεν πρέπει να παραγνωρίζεται, είναι οι οξείες λοιμώξεις ανοσοϊκανών ζώων. Οι περισσότερες από τις διαγνωστικές δοκιμασίες είναι σχεδιασμένες για την ανίχνευση των PI ζώων. Καθώς οι οξείες λοιμώξεις μπορούν να δώσουν θετικά αποτελέσματα σε δείγματα ορού, buffy coat, σπέρματος και από βιοψίες του δέρματος, είναι σημαντικό να διαχωριστούν από τις επίμονες μολύνσεις (Njaa et al., 2000, Ridpath et al., 2002). Η επιβεβαίωση των επίμονων μολύνσεων γίνεται με την εξέταση δειγμάτων ζευγών ορών, με διαφορά 3-4 εβδομάδων ανάμεσα στις δύο δειγματοληψίες.

Η ανοσοϊστοχημική χρώση δειγμάτων από το περύγιο του ωτός μοσχарιών, θεωρείται αποτελεσματική μέθοδος για την ανίχνευση PI ζώων. Η λήψη των δειγμάτων αυτών είναι εύκολη και είναι σχετικά σταθερή, και η δοκιμή δεν επηρεάζεται από τη παρουσία μητρικών αντισωμάτων.

Σε μία μελέτη ορόσημο, χρησιμοποιήθηκε IHC χρώση, σε δείγματα από βιοψίες δέρματος, ενσωματωμένα σε παραφίνη και μονιμοποιημένα σε φορμαλίνη, για τον εντοπισμό επίμονα μολυσμένων ζώων. Από τα 42 δείγματα που ήταν θετικά, επίμονα μολυσμένα, στην απομόνωση του ιού, τα 41 ήταν θετικά και στην IHC χρώση των βιοψιών του δέρματος. Βασισμένοι στον εντοπισμό του σημείου της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, οι συγγραφείς κατόρθωσαν να διαχωρίσουν την οξεία από την επίμονη μόλυνση. Η χρώση στα PI ζώα ήταν συγκεντρωμένη στα κερατινοκύτταρα, στο επιθήλιο του θυλάκου των τριχών, στη μήτρα των βολβών των τριχών και στις δερματικές θηλές. Στις οξείες λοιμώξεις, μικρές εστίες χρώσης παρατηρήθηκαν στην μη-θυλακική επιδερμίδα και στην περιφέρεια των θυλάκων (Njaa et al., 2000).

Ο ορός συχνά προτιμάται ως υλικό για την απομόνωση του ιού, επειδή ο ιός επιβιώνει περισσότερο στον ορό και μπορεί να συλλεχθεί και να αποθηκευτεί ευκολότερα από το buffy coat (Saliki et al., 2000). Όμως, η παρουσία αντισωμάτων στον ορό μπορεί να επιπλέξει τα αποτελέσματα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η δειγματοληψία διαλογής μπορεί να αποτελεί τη μέθοδο εκλογής. Δειγματοληψία διαλογής των ορών εφαρμόζεται στο εθελοντικό πρόγραμμα ελέγχου στο γερμανικό κρατίδιο της Σαξωνίας (Gaede et al., 2003). Αρχικά, τα δείγματα εξετάζονται με RT-PCR. Ατομικά, τα επίμονα μολυσμένα ζώα, από τους θετικούς ορούς, ταυτοποιούνται με E^{ms}-antigen-ELISA. Σε μία περίοδο 3 ετών, η συχνότητα των επίμονα μολυσμένων ζώων βρέθηκε 0,2%.

Δεν υπάρχει η δυνατότητα προγεννητικού ελέγχου για PI ζώα, παρόλο που έγινε προσπάθεια για την απομόνωση του ιού, με τη λήψη δειγμάτων εμβρυϊκών υγρών διαδερμικά, σε αγελάδες στο τελευταίο στάδιο της εγκυμοσύνης (Callan et al., 2002). Η μέθοδος αποδείχτηκε πολύ εντατική και όχι πολύ ασφαλής.

Ορισμένοι κλινικοί χρησιμοποιούν τα ζεύγη ορών για τον έλεγχο για PI ζώα. Η μέθοδος συνίσταται στη λήψη οροδειγμάτων στην εκτροφή, η ταυτοποίηση των ζώων

χωρίς τίτλο εξουδετερωτικών αντισωμάτων, ο επανεμβολιασμός και η εκ νέου δειγματοληψία. Τα ζώα που ορομετατρέπουν μετά τον εμβολιασμό ή εμφανίζουν MD, θεωρούνται PI ζώα. Πρέπει να τονιστεί ότι η παραπάνω μέθοδος δεν είναι αξιόπιστη. Αν το εμβολιακό στέλεχος είναι σημαντικά ετερόλογο από το επίμονο στέλεχος, το PI ζώο μπορεί να εμφανίσει ορομετατροπή μετά τον εμβολιασμό και να μην αναγνωριστεί ως PI (Werdin et al., 1989a). Και άλλοι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, π.χ., η παθητική ανοσοποίηση, το μικρό ιϊκό φορτίο και τα λάθη τεχνικής.

Η ELISA σε δείγματα γάλακτος ή ορού είναι καλή. Εκτροφές με λίγα ή καθόλου αντισώματα στο γάλα και αρνητικούς ορούς σε νεαρά ζώα, θεωρούνται απαλλαγμένες. Από την άλλη, υψηλοί τίτλοι στο γάλα και παρουσία ή όχι θετικών ορολογικά νεαρών ζώων, θεωρείται απόδειξη ότι η εκτροφή είναι θετική και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, για τον εντοπισμό και την απομάκρυνση των επίμονα μολυσμένων ζώων. Η χρήση RT-PCR σε δείγματα από τον ορό και οι IHC ή RT-PCR σε βιοψίες του δέρματος, έχουν βελτιώσει σημαντικά τη διάγνωση του BVDV. Με τις παραπάνω μεθόδους, είναι δυνατή η εφαρμογή εθνικών προγραμμάτων ελέγχου.

2.12 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ

Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα, επικρατούσε η αντίληψη ότι ο συστηματικός έλεγχος του BVDV ήταν αδύνατος, λόγω της μεγάλης εξάπλωσης του ιού και των δυσκολιών που υπήρχαν στη διάγνωση του. Επιπλέον, οι ζημιές που προκαλούνταν από τον ιό δεν γίνονταν αντιληπτές και δεν κρινόταν σκόπιμη η εφαρμογή συστηματικών ελέγχων. Με την πρόοδο που επιτεύχθηκε σταδιακά στην κατανόηση της παθογένειας του νοσήματος, έγινε αντιληπτό το μεγάλο εύρος των κλινικών εκδηλώσεων του. Την τελευταία εικοσαετία, οι προσπάθειες ελέγχου του BVDV επικεντρώθηκαν, είτε στους εμβολιασμούς, είτε στον εντοπισμό και την απομάκρυνση των επίμονα μολυσμένων ζώων (Harkness, 1987). Παράλληλα, η ανάπτυξη φθηνών και αξιόπιστων διαγνωστικών δοκιμών, καθώς και η βελτίωση των εμβολίων και των εμβολιακών πρωτοκόλλων, βοηθούν στην ανάπτυξη και εφαρμογή στρατηγικών για τον αποτελεσματικό συστηματικό έλεγχο του BVDV, που περιλαμβάνουν και εμβολιασμούς, ως συστατικό τους.

Οι οικονομικές απώλειες σε εκτροφές μολυσμένες από τον BVDV, σχετίζονται με τη μειωμένη γαλακτοπαραγωγή, τη μείωση των αναπαραγωγικών δεικτών, την αυξημένη επίπτωση των αναπνευστικών προβλημάτων, καθώς και αποβολές, εμφάνιση συγγενών ανωμαλιών και καθυστέρηση της ανάπτυξης (Baker, 1995). Ο υπολογισμός των απωλειών είναι σύνθετος και εξαρτάται από την αρχική ανοσολογική κατάσταση των εκτροφών, την κατάσταση αναπαραγωγής των ζώων τη στιγμή της μόλυνσης και τη λοιμογόνο δύναμη του ιού (Houe, 1999). Έχουν πλέον αναπτυχθεί οικονομικά μοντέλα υπολογισμού των οικονομικών επιπτώσεων του BVDV και από μελέτες ανάλυσης κόστους, έχει αποδειχθεί ότι οι συστηματικές προσπάθειες ελέγχου πλεονεκτούν (Moennig et al., 2005a). Οι οικονομικές απώλειες λόγω της κλασικής εμφάνισης της νόσου, όπου τα περισσότερα περιστατικά είναι υποκλινικά και οι περισσότερες απώλειες σχετίζονται με την αναπαραγωγή και τις επίμονες μολύνσεις, έχουν υπολογισθεί ότι κυμαίνονται από 21-135€/αγελάδα/εκτροφή (Houe, 2003). Αντίθετα, οι απώλειες σε επιζωotίες, λόγω της ταυτόχρονης εμφάνισης του BVDV με άλλες λοιμώξεις, ή τη μόλυνση με πολύ λοιμογόνα στελέχη, ανέρχονται σε 340€/αγελάδα/εκτροφή (Houe, 2003).

Τα πρώτα προγράμματα εξάλειψης του BVDV χωρίς την εφαρμογή εμβολιασμών, εφαρμόστηκαν το 1993-1994 στη Δανία, Φινλανδία, Νορβηγία και Σουηδία. Μετά από 10 χρόνια εφαρμογής των προγραμμάτων, σήμερα βρίσκονται στην τελική τους φάση και η Νορβηγία θεωρείται η πρώτη χώρα που θα επιτευχθεί η εξάλειψη του ιού (Rikula et al., 2005). Στην Αυστρία ακολούθησαν την εφαρμογή του μοντέλου των Σκανδιναβικών χωρών και μετά από 7 έτη εφαρμογής του σε τοπικό επίπεδο, από το 2004 επεκτάθηκε σε ολόκληρη τη χώρα. Συστηματικά προγράμματα ελέγχου έχουν εφαρμοστεί και σε άλλες περιοχές της Ευρώπης, όπως στις νήσους Σέτλαντ, όπου ο BVDV έχει εξαλειφθεί (Synge et al., 1999), καθώς και στη Βρετανία της Γαλλίας (Joly

et al., 2005), την Ολλανδία (Moen et al., 2005), περιοχές της Ιταλίας (Ferrari et al., 1999, Luzzago et al., 2004) και της Γερμανίας (Moennig et al., 2005b). Στα παραπάνω προγράμματα, πλην της Γερμανίας, δεν περιλαμβάνονται εμβολιασμοί, αν και επιτρέπεται η κυκλοφορία εμβολίων. Οι μόνες προσπάθειες για τον έλεγχο του BVDV που είναι επιτυχείς, είναι αυτές που βασίζονται στη λήψη μέτρων βιοασφάλειας, ιδιαίτερα στις επαφές μεταξύ των ζώων, με ή χωρίς τη συμπληρωματική χρήση εμβολιασμών.

Είναι χρήσιμο να γίνει διάκριση μεταξύ μη συστηματικών και συστηματικών στρατηγικών ελέγχου / εξάλειψης του BVDV. Ο μη συστηματικός έλεγχος αναφέρεται σε κάθε μέτρο που εφαρμόζεται σε επίπεδο εκτροφής, ενώ τα προγράμματα συστηματικού ελέγχου, που υλοποιούνται σε τοπικό ή εθνικό επίπεδο έχουν ως στόχο τη μείωση της επίπτωσης και του επιπολασμού του BVDV (Lindberg and Houe, 2005, Moennig et al., 2005a). Η παρακολούθηση και η εκτίμηση της προόδου της διαδικασίας αποτελούν βασικά συστατικά των στρατηγικών αυτών (Houe et al., 2006).

2.12.1 Μη συστηματικός έλεγχος – εμβολιασμοί

Στις μη συστηματικές προσπάθειες ελέγχου, συνήθως δεν γίνεται προσπάθεια εντοπισμού και απομάκρυνσης των επίμονα μολυσμένων ζώων. Αντίθετα, σε πολλές περιπτώσεις τα επίμονα μολυσμένα ζώα δεν απομακρύνονται σκόπιμα από τις εκτροφές, επειδή θεωρούνται φυσικοί ‘εμβολιαστές’. Η πρακτική αυτή, πέρα από το ότι δεν είναι αποτελεσματική, εγείρει και θέματα ευζωίας. Τα επίμονα μολυσμένα ζώα θεωρείται ότι ασκούν πολύ ισχυρή πίεση στα υπόλοιπα ζώα με τη συνεχή απέκκριση του ιού, ώστε να διατηρείται συνεχώς ο κύκλος της μόλυνσης.

Για να διατηρηθεί ο κύκλος της μόλυνσης του BVDV σε μια εκτροφή, θα πρέπει κάθε επίμονα μολυσμένο ζώο να δημιουργεί τουλάχιστον ένα δευτερογενές περιστατικό επίμονης μόλυνσης. Όταν υπάρχει ένα επίμονα μολυσμένο ζώο σε μια εκτροφή, ο αριθμός των ζώων που βρίσκονται στην αρχή της κυοφορίας και είναι ευαίσθητα στη μόλυνση θα τείνει να μειώνεται, συνεπώς και ο αριθμός νέων επίμονων μολύνσεων που μπορούν να προκληθούν από ένα επίμονα μολυσμένο ζώο θα τείνει εξίσου να μειωθεί. Αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές σε μικρές μονάδες και εξηγεί γιατί ο ιός εξαλείφεται από πολλές μονάδες μικρού μεγέθους χωρίς να λαμβάνονται μέτρα ελέγχου. Το φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και σε αρκετές μονάδες μεγάλου μεγέθους, στις οποίες όμως εφαρμόζονται περιορισμοί στις διακινήσεις των ζώων (Viltrop et al., 2002). Σε συνθήκες εκτροφής, ο αυτοπεριορισμός του ιού επηρεάζεται από τους ίδιους παράγοντες που επηρεάζουν τον επιπολασμό των επίμονα μολυσμένων ζώων, τον επιπολασμό των ευαίσθητων ζώων στα αρχικά στάδια της κυοφορίας και το βαθμό επαφής μεταξύ αυτών των ομάδων (Viet et al., 2005).

2.12.1.1 Εμβολιασμοί

Σε περιοχές με υψηλή πυκνότητα και διακινήσεις ζωικού κεφαλαίου, ο επιπολασμός του BVDV είναι συνήθως αυξημένος. Η έλλειψη υποχρεωτικής νομοθεσίας για την αντιμετώπιση του BVDV, καθιστά τις απαλλαγμένες εκτροφές που συμμετέχουν σε εθελοντικά και μη συστηματικά προγράμματα ελέγχου του BVDV ευαίσθητες στο συνεχή κίνδυνο επαναμόλυνσης τους από τον ιό. Σε τέτοιες καταστάσεις, μια μέθοδος τόνωσης της ανοσίας των εκτροφών είναι διαμέσου των εμβολιασμών. Ο εμβολιασμός για τον έλεγχο και την πρόληψη της ΙΔΒ, είναι σήμερα πραγματοποιήσιμος και οικονομικά αποδοτικός (Brownlie et al., 2000). Δεν υπάρχουν πάντως ενδείξεις ότι μόνο με τον εμβολιασμό μπορεί να μειωθεί ο επιπολασμός του BVDV. Τα μη συστηματικά προγράμματα ελέγχου μπορούν να βελτιώσουν την υγεία των ζώων και να προλάβουν τις συνέπειες μιας μόλυνσης. Η αποτελεσματικότητά τους όμως περιορίζεται σε επίπεδο εκτροφής, συνήθως για περιορισμένο χρονικό διάστημα και δεν πρέπει να αναμένεται μείωση του επιπολασμού του BVDV. Η συστηματική διενέργεια εμβολιασμών σε παγκόσμιο επίπεδο τις τελευταίες 4 δεκαετίες, δεν έχει προκαλέσει τη μείωση του επιπολασμού του BVDV (O' Rourke, 2002).

Πολλά εμβόλια ή συνδυασμοί εμβολίων είναι εμπορικά διαθέσιμα. Στις Η.Π.Α τα εγκεκριμένα εμβόλια περιέχουν τον BVDV σε συνδυασμό με άλλα παθογόνα που προσβάλλουν το αναπνευστικό και το γεννητικό σύστημα των βοοειδών και χρησιμοποιούνται στο 80% των εκτροφών. Χρησιμοποιούνται αδρανοποιημένα ή ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης (ΕΛΔ) εμβόλια που περιέχουν και BVDV1 και BVDV2 στελέχη. Τα εμβόλια ΕΛΔ που περιέχουν στελέχη BVDV1, προλαμβάνουν τη σοβαρή νόσο που προκαλείται από τα στελέχη BVDV2 (Thibaunlt et al., 1993). Εξαιτίας της αντιγονικής πολυμορφίας των στελεχών του BVDV, η επιλογή του κατάλληλου εμβολίου και του πρωτοκόλλου εφαρμογής του είναι πολύ κρίσιμη. Ο κύριος στόχος των εμβολιασμών είναι η πρόληψη της εμβρυϊκής μόλυνσης, αλλά λίγα μόνο εμβόλια έχουν αποδειχθεί ικανά να επιτύχουν το σκοπό αυτό (van Oirschot et al., 1999).

Στην Ελλάδα, τα εμπορικά διαθέσιμα εμβόλια είναι συνήθως πολυδύναμα και χρησιμοποιούνται για την προφύλαξη των ζώων από περισσότερους του ενός λοιμογόνους παράγοντες. Έτσι, τα εμβόλια για τον BVDV προστατεύουν ταυτόχρονα και κατά της Λοιμώδους Ρινοτραχειίτιδας των Βοοειδών (Infectious Bovine Rhinotracheitis, IBR), της PI-3 (Bovine Respiratory Parainfluenza-3, PI-3) και του Βόειου Αναπνευστικού Συγκυτιακού Ιού (Bovine Respiratory Syncytial Virus, BRSV), που αποτελούν τους κύριους αιτιολογικούς παράγοντες πρόκλησης του αναπνευστικού συνδρόμου των μόσχων. Τα αδρανοποιημένα εμβόλια διατίθενται σε υγρή μορφή, ενώ τα ζωντανά σε λυόφιλη μορφή και απαιτείται η ανασύστασή τους με τον ειδικό διαλύτη. Η καλύτερη θερμοκρασία χορήγησης τόσο των αδρανοποιημένων όσο και των ζωντανών εμβολίων είναι μεταξύ +15 και +25°C. Η οδός χορήγησης τους είναι είτε ενδομυϊκά (ΙΜ) στους μυς του τραχήλου, είτε υποδόρια (SC) στη λαμυρίδα και η δόση είναι 3ml ανά ζώο, ανεξάρτητα από την ηλικία και το σωματικό βάρος.

Είναι σημαντική η συνεχής εκπαίδευση των εκτροφέων για την τήρηση σημαντικών κανόνων βιοασφάλειας, όπως τη μετακίνηση / είσοδο ζώων, τη χρήση των βοσκότοπων, την περιφράξη κ.λ.π. Ένας τεκμηριωμένος κίνδυνος με τη χρήση εμβολίων προκύπτει από τη λανθασμένη πεποίθηση των εκτροφέων ότι είναι προστατευμένοι, αυξάνοντας έτσι τη πιθανότητα μόλυνσης (Vannier et al., 1997).

Επαρκής λήψη πρωτογάλακτος από οροθετικές μητέρες, παρέχει προστασία από κλινική νόσο, σε νεαρά μοσχάρια (Cortese et al., 1998b, Ridpath et al., 2003). Ο εμβολιασμός των νεαρών μοσχαριών έχει επίσης αποδειχθεί ότι μειώνει την κλινική νόσο και τη θνησιμότητα, μετά από πειραματική μόλυνση (Cortese et al., 1998b). Η μόλυνση του εμβρύου μπορεί να προληφθεί αν το ανοσοποιητικό σύστημα των ζώων μιας εκτροφής είναι τόσο ισχυρό ώστε να εξουδετερώνει αποτελεσματικά τον ιό πριν αυτός περάσει τον πλακούντα και μολύνει το έμβρυο. Τα ευρήματα από παλιότερες και πιο πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η μητρική ανοσία παρέχει κάποια προστασία στο έμβρυο, παρόλο που αυτή δεν εκτείνεται στο 100% των εμβρύων (Kelling et al., 2000). Όντως, η αποτελεσματικότητα των μητρικών εμβολιασμών κυμαίνεται από 25 – 100%, όταν χρησιμοποιηθούν αδρανοποιημένα εμβόλια (Meyling et al., 1987, Harkness et al., 1987, Brownlie et al., 1995) και από 58 – 88%, για τα ΕΛΔ εμβόλια (Cortese et al., 1998a, Brock and Cortese, 2001). Η παρουσία ανιχνεύσιμων επιπέδων αντισωμάτων κατά του BVDV μετά από εμβολιασμό, φαίνεται ότι προστατεύει το έμβρυο και είναι σημαντική για ένα σχεδιασμένο πρόγραμμα ελέγχου του BVDV. Πρέπει όμως να τονιστεί, ότι μια σημαντική ποσότητα του ιού είναι ικανή να διαφύγει της εξουδετερωτικής δραστηριότητας των κυκλοφορούντων αντισωμάτων σε ορισμένα ζώα και να προκαλέσουν διαπλακούντια μόλυνση, αποβολή και την ανάπτυξη επίμονης μόλυνσης. Συνεπώς, τα εμβολιακά προγράμματα από μόνα τους, είναι ανεπαρκή για τον έλεγχο του BVDV (Cortese et al., 1998a, Brock and Cortese, 2001, Brownlie et al., 1995).

Οι λοιμώξεις από τον BVDV προκαλούν τη δημιουργία ισχυρής και μακροχρόνιας ανοσίας στα βοοειδή, που βασίζεται στη χυμική και την κυτταρική ανοσία (Collen et al., 2002). Το έμβρυο θεωρείται ότι προστατεύεται επαρκώς. Ομοίως, τα περισσότερα εμβόλια ΕΛΔ προκαλούν τη δημιουργία ισχυρής ανοσίας (Cortese et al., 1998).

Όταν όμως δεν τηρείται το πρωτόκολλο εφαρμογής τους, μπορούν να επιδράσουν στην κυοφορία και να προκαλέσουν τη δημιουργία επίμονα μολυσμένων μοσχαριών και άλλων προβλημάτων στην αναπαραγωγή (Bolin, 1995). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στις ΗΠΑ αποδείχθηκε ότι, παρόλο που στη πλειοψηφία των εκτροφών εφαρμόζονταν εμβολιασμοί, λιγότερο από το 30% διενεργούνταν σωστά (Quaife, 1996). Τα εμβόλια ΕΛΔ, υπάρχει ο κίνδυνος να μολυνθούν από άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς, ιδιαίτερα τον BVDV. Θεωρείται ότι ο εμβολιασμός με εμβόλιο ΕΛΔ προκαλεί παροδική ανοσοκαταστολή, όμοια με αυτή που παρατηρείται και κατά τις φυσικές μολύνσεις (Roth and Kaeberle, 1983). Πολλά εμβόλια ΕΛΔ βασίζονται σε cpBVDV στελέχη, καθώς τα στελέχη αυτά δεν μπορούν να περάσουν το φραγμό του πλακούντα. Αν όμως χορηγηθούν σε επίμονα μολυσμένα ζώα, υπάρχει ο

κίνδυνος να αναπτυχθεί οξεία ή καθυστερημένη NB. Λόγω των σοβαρών προβλημάτων που μπορούν να δημιουργηθούν στην ευζωία από την εφαρμογή των εμβολίων ΕΛΔ, πρέπει να λαμβάνονται μέτρα ώστε να αποφεύγεται ο εμβολιασμός επίμονα μολυσμένων ζώων, με εμβόλια που περιέχουν cpBVDV στελέχη.

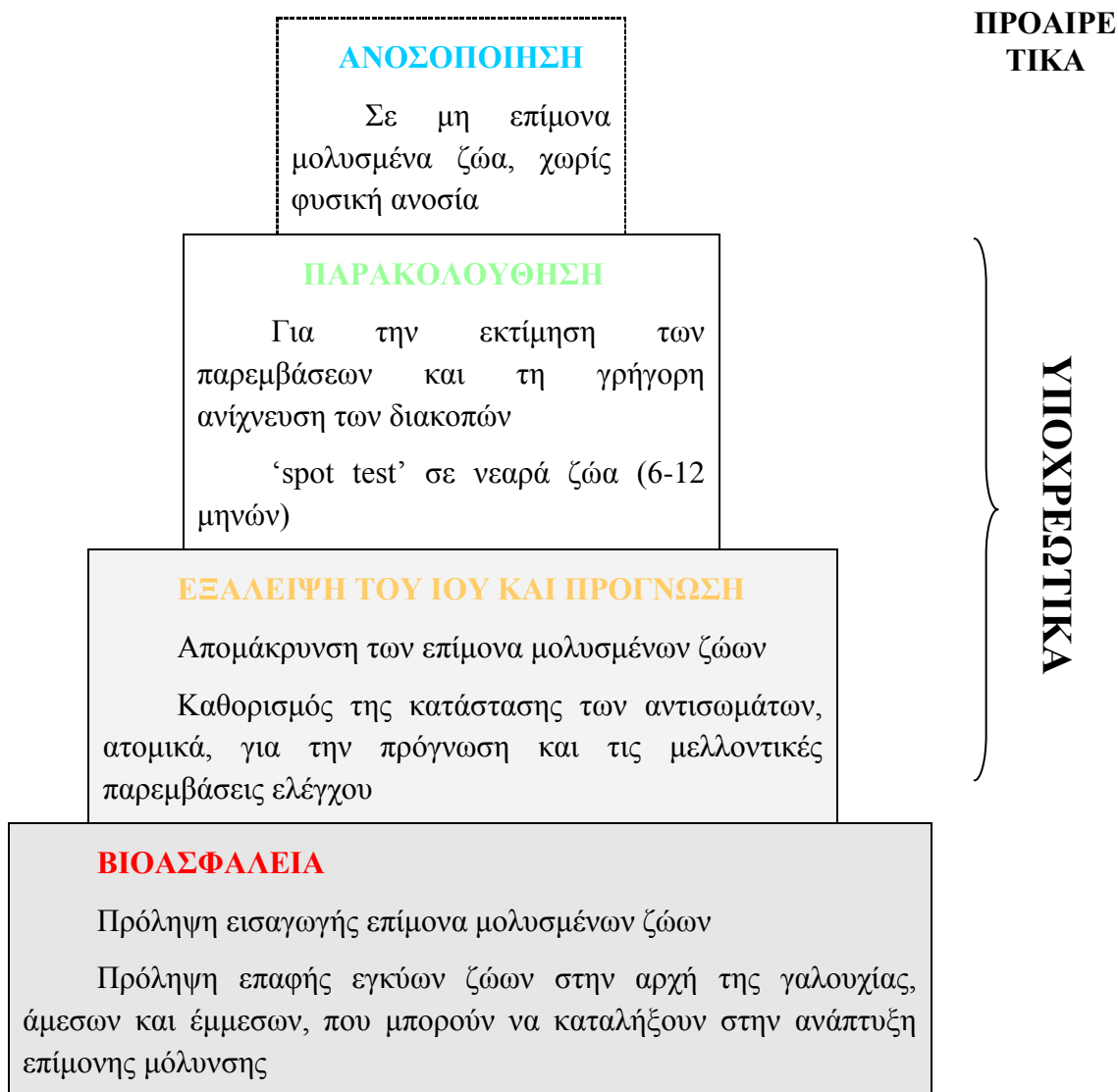
Τα αδρανοποιημένα εμβόλια προκαλούν κυρίως χυμική ανοσολογική ανταπόκριση, που είναι κάπως ασθενέστερη και μικρότερης διάρκειας σε σχέση με τα εμβόλια ΕΛΔ. Τα αδρανοποιημένα εμβόλια είναι ασφαλέστερα σε σχέση με τα εμβόλια ΕΛΔ και η χορήγηση τους μπορεί να γίνει σε οποιοδήποτε στάδιο της κυοφορίας. Απαιτούνται όμως συχνοί επαναληπτικοί εμβολιασμοί και δεν είναι ξεκάθαρη η ένταση και η διάρκεια της διασταυρούμενης προστασίας του εμβρύου (Graham et al., 2004).

Στην Αμερική και τον Καναδά, παρατηρήθηκαν επιζωοτίες σε βοοειδή όλων των ηλικιών, που χαρακτηρίστηκαν από ασυνήθιστα αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα (Pellerin et al., 1994). Οι επιζωοτίες αυτές σχετίστηκαν με προηγούμενες μολύνσεις από στελέχη BVDV2 (Pellerin et al., 1994). Στις χώρες αυτές, η χρήση εμβολίων ΕΛΔ κατά του BVDV είναι εκτεταμένη (Bolin, 1995). Σε χώρες που χρησιμοποιούνται παρόμοια εμβόλια, όπως στο Βέλγιο και τη Γερμανία, έχει επίσης αναφερθεί ο εντοπισμός στελεχών BVDV2. Αντίθετα, σε χώρες που οι εμβολιασμοί απαγορεύονται, όπως στη Σουηδία και αλλού, δεν έχουν εντοπιστεί παρόμοια στελέχη. Συνεπώς, φαίνεται να υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ της χρήσης εμβολίων ΕΛΔ και τη παρουσία στελεχών BVDV2, στον πληθυσμό των βοοειδών (Ridpath, 2003).

Κατά τα τελευταία 3 έτη, παρατηρήθηκε σε αρκετές Ευρωπαϊκές χώρες αιμορραγική διάθεση σε μοσχάρια μικρότερα των 4 εβδομάδων, διαφόρων φυλών. Χαρακτηρίζεται από εσωτερικές και εξωτερικές αιμορραγίες λόγω της σοβαρής προσβολής του μυελού των οστών και της προκαλούμενης πανκυτταροπενίας. Ένα κρίσιμο επιζωοτιολογικό εύρημα προκύπτει από το ιστορικό εμβολιασμών των μητέρων με συγκεκριμένο εμβόλιο κατά της ΙΔΒ, σε 361 από τα 365 επιβεβαιωμένα περιστατικά (Friedrich et al., 2010).

2.12.2 Συστηματικός έλεγχος

Ένα γενικό μοντέλο για τον έλεγχο του BVDV παρατίθεται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 2.12.2.1. Γενικό μοντέλο για το συστηματικό έλεγχο του BVDV.

Το σχήμα αυτό περιλαμβάνει τρία βασικά στοιχεία: βιοασφάλεια, εξάλειψη του ιού και παρακολούθηση του ιού.

Τη βάση του μοντέλου αποτελεί η βιοασφάλεια, που περιλαμβάνει όλα τα απαιτούμενα μέτρα για τη μείωση του ρυθμού μετάδοσης μεταξύ των εκτροφών, με ισχυρή έμφαση στην πρόληψη της μετάδοσης / εισαγωγής επίμονα μολυσμένων ζώων, ή εγκύων ζώων που κυοφορούν τέτοια ζώα.

Η δεύτερη φάση συνίσταται στην εξάλειψη του ιού από τις μολυσμένες εκτροφές, με τη συστηματική απομάκρυνση των επίμονα μολυσμένων ζώων. Είναι απαραίτητο να

είναι διαθέσιμη η ορολογική κατάσταση ολόκληρης της εκτροφής κατά τον ίδιο χρόνο, ώστε να μπορεί να εκτιμηθεί η κατάσταση και να δοθεί πρόγνωση.

Η Τρίτη φάση περιλαμβάνει την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των εφαρμοζόμενων προγραμμάτων εξάλειψης του BVDV, καθώς και τη συστηματική παρακολούθηση των μολυσμένων εκτροφών, για τον εντοπισμό νέων μολύνσεων. Η παρακολούθηση είναι απαραίτητη για την εκτίμηση, συνολικά, της προόδου ενός προγράμματος ελέγχου.

Η τελευταία αναφερόμενη φάση του σχήματος είναι προαιρετική και αναφέρεται στην ενεργητική ανοσοποίηση, με την πραγματοποίηση εμβολιασμών, ή με την υποχρεωτική επαφή με επίμονα μολυσμένα ζώα που τυχόν υπάρχουν στην εκτροφή.

Είναι σημαντικό να υπάρχουν καθορισμένοι κανόνες για τον τρόπο με τον οποίο μια περιοχή ή μια χώρα ή και μεμονωμένες εκτροφές, ορίζονται ως απαλλαγμένες από τον BVDV και ποια μέτρα πρέπει να λαμβάνονται ώστε να διατηρείται το καθεστώς αυτό. Η ταυτόχρονη λήψη μέτρων σε μια περιοχή έχει μεγάλη επίδραση στον επιπολασμό και την επίπτωση νέων μολύνσεων, ανεξάρτητα από τον αρχικό επιπολασμό και τη πυκνότητα των εκτροφών πριν την εφαρμογή του προγράμματος (Lindberg, 1996).

Η επιτυχία των προγραμμάτων αυτών εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την αναγνώριση και προστασία των μη μολυσμένων εκτροφών, την ταυτοποίηση και απομάκρυνση των επίμονα μολυσμένων ζώων από τις μολυσμένες εκτροφές, την τήρηση αυστηρών κανόνων βιοασφάλειας και την τακτική παρακολούθηση των εκτροφών.

2.12.2.1 Συστηματικός έλεγχος χωρίς εμβολιασμούς

Ένα γενικό μοντέλο ελέγχου του BVDV περιλαμβάνει 3 φάσεις:

1) διαχωρισμό του πληθυσμού σε μη μολυσμένες και μολυσμένες εκτροφές, 2) παρακολούθηση / πιστοποίηση των μη μολυσμένων εκτροφών και 3) εξάλειψη του ιού από τις μολυσμένες εκτροφές (Lindberg and Alenius, 1999).

Κατά την έναρξη ενός προγράμματος ελέγχου, συστήνεται ισχυρά η ορολογική διερεύνηση όλων των ζώων της εκτροφής. Εξαιρούνται τα ζώα μικρότερα των 10 εβδομάδων, στα οποία κυκλοφορούν ακόμη τα μητρικά αντισώματα (Palfi et al., 1993). Οι παρακάτω διαγνωστικές τεχνικές είναι αποτελεσματικές σε επίπεδο εκτροφής:

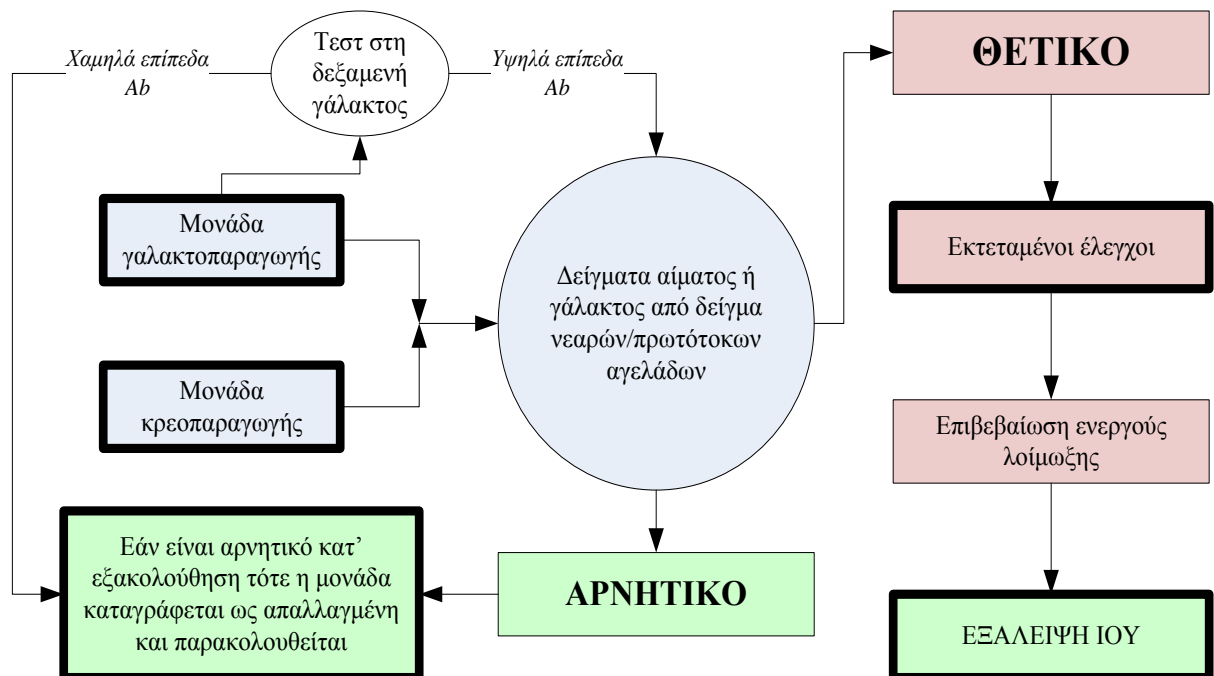
- Ανίχνευση αντισωμάτων στη δεξαμενή του γάλακτος
- Ανίχνευση αντισωμάτων σε ατομικά ή ομαδικά (pooled) δείγματα ορού από νεαρά ζώα ή ομαδικά δείγματα (γάλακτος ή ορού) από πρωτότοκες αγελάδες
- Ανίχνευση του ιού στη δεξαμενή του γάλακτος (συνήθως με PCR)

Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται μια εικόνα για την κατάσταση της εκτροφής και ενημερώνεται και ο παραγωγός για την πρόγνωση. Στην αρχική αυτή ορολογική

διερεύνηση θα πρέπει να γίνεται τεστ ανίχνευσης του ιού σε όσα ζώα δεν ανιχνεύτηκαν αντισώματα και να απομακρύνονται άμεσα από την εκτροφή αν είναι επίμονα μολυσμένα.

Η ανίχνευση των αντισωμάτων αποτελεί ένα έμμεσο τρόπο εντοπισμού επίμονα μολυσμένων ζώων. Για την ανίχνευση των αντισωμάτων χρησιμοποιούνται διάφοροι μέθοδοι ELISAs, είτε σε δείγματα από τη δεξαμενή του γάλακτος (Niskanen et al., 1991), είτε σε δείγματα ορού ή γάλακτος από μια μικρή ομάδα ζώων, συγκεκριμένου ηλικιακού εύρους (spot test, Lindberg, 1996). Η ανίχνευση θετικού αποτελέσματος σε spot test που προέρχεται από δείγμα από νεαρό ζώο, αποτελεί ένδειξη πρόσφατης ή ενεργής μόλυνσης. Αντίθετα, αν δεν εντοπιστούν αντισώματα σε spot test, τότε η εκτροφή δεν είναι μολυσμένη. Ένα ήπιο ή υψηλό επίπεδο αντισωμάτων στον έλεγχο για αντισώματα της δεξαμενής γάλακτος, υποδηλώνει ότι στην εκτροφή, είτε υπήρξε πρόσφατη μόλυνση, είτε υπάρχει ενεργή μόλυνση. Για την επιβεβαίωση της παραπάνω ένδειξης, γίνεται spot test σε νεαρά ζώα. Το θετικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι η εκτροφή είναι μολυσμένη και πρέπει να ληφθούν μέτρα εξάλειψης του BVDV.

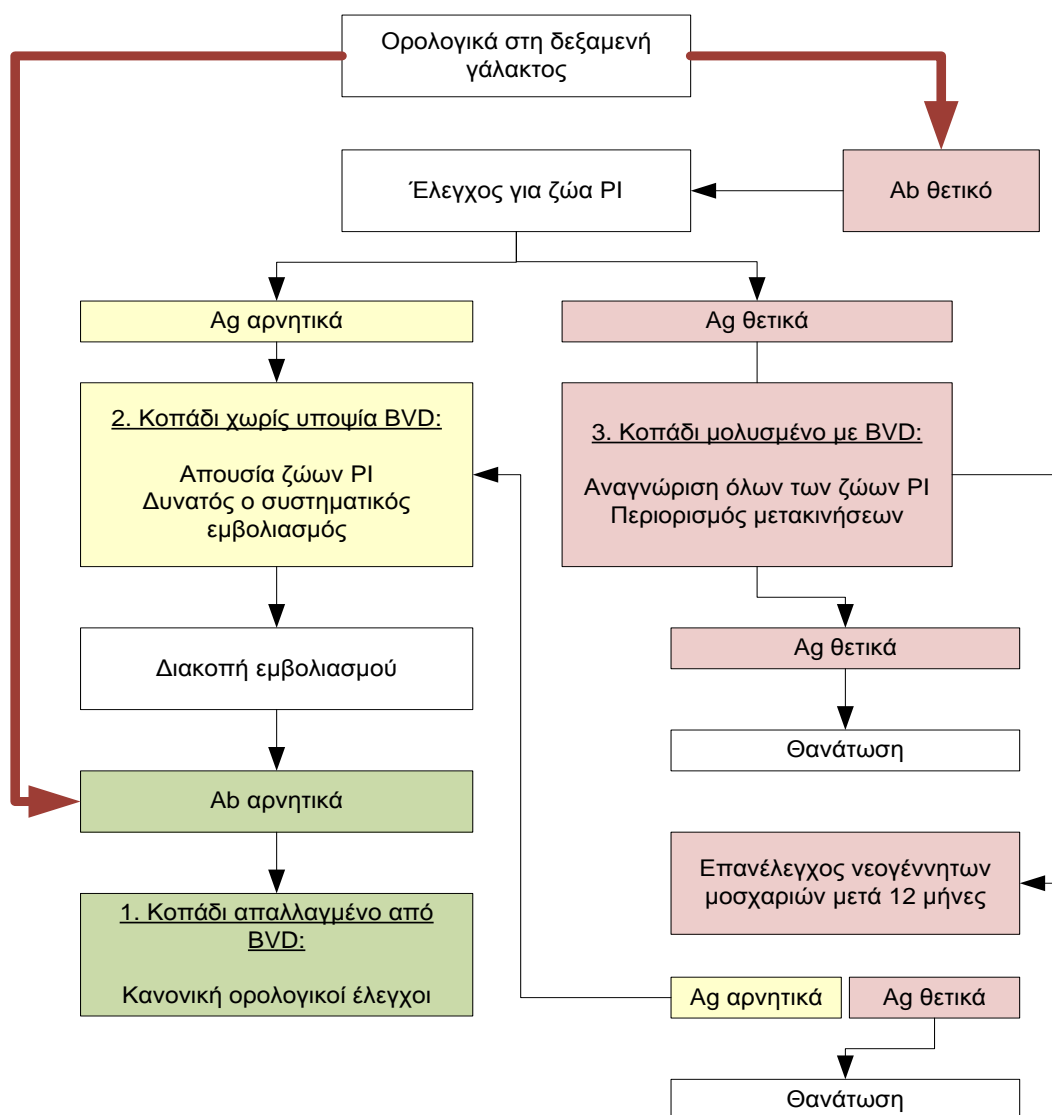
Από τα αποτελέσματα της αρχικής ορολογικής εκτίμησης, οι εκτροφές ταξινομούνται σε ‘πιθανά μη μολυσμένες’ και σε ‘πιθανά μολυσμένες’. Οι πιθανά μη μολυσμένες τίθενται υπό παρακολούθηση. Η επίπτωση του BVDV μπορεί να μειωθεί, μόνο αν ληφθούν μέτρα μείωσης του κινδύνου εισαγωγής του ιού σε ‘μη μολυσμένες εκτροφές’. Στις πιθανά μολυσμένες εκτροφές γίνεται περαιτέρω διερεύνηση.



Εικόνα 2.12.2.1.1. Διάγραμμα ροής δραστηριοτήτων σε σχήματα ελέγχου του BVDV χωρίς τη χρήση εμβολιασμών, σε εκτροφές γαλακτοπαραγωγής και κρεοπαραγωγής (όπως εφαρμόστηκαν στις Σκανδιναβικές χώρες και την Αυστρία)

2.12.2.2 Συστηματικός έλεγχος και εμβολιασμοί

Σε ορισμένες χώρες, εφαρμόζεται ο προαιρετικός συστηματικός εμβολιασμός, μετά την απομάκρυνση των επίμονα μολυσμένων ζώων. Στη Γερμανία, η εθελοντική εφαρμογή της στρατηγικής ‘test and cull’ των επίμονα μολυσμένων βοοειδών, σε συνδυασμό με το συστηματικό, διπλό εμβολιασμό κρίθηκε αποτελεσματική για την προστασία των εκτροφών, σε περιοχές με αυξημένο ζωικό πληθυσμό και αυξημένο επιπολασμό του BVDV και από το 2011 θα εφαρμοστεί υποχρεωτικά σε Ομοσπονδιακό επίπεδο (Moennig and Grummer, 2010).



Εικόνα 2.12.2.2.1 . Διάγραμμα ροής της στρατηγικής ελέγχου του BVDV στη Γερμανία. Ο εντοπισμός των επίμονα μολυσμένων ζώων είναι ζωτικής σημασίας. Για τις απαλλαγμένες εκτροφές από τον BVDV υπάρχει η επιλογή, είτε εμβολιασμού (BVDV-μη ύποπτες εκτροφές), είτε του μη εμβολιασμού (BVDV-απαλλαγμένες εκτροφές).

Το πρόγραμμα αποτελείται από τα παρακάτω βασικά στοιχεία:

- Αρχικός έλεγχος της κατάστασης της εκτροφής, εντοπισμός και απομάκρυνση των επίμονα μολυσμένων ζώων.
- Επαναληπτικά τεστ για τον εντοπισμό και απομάκρυνση των επίμονα μολυσμένων μόσχων, που γεννιούνται τους πρώτους 12 μήνες από την εξάλειψη του ιού
- Συστηματικός εμβολιασμός με εγκεκριμένο εμβόλιο και τήρηση του εμβολιαστικού πρωτοκόλλου
- Συνεχής παρακολούθηση και πιστοποίηση
- Γενικά και ειδικά μέτρα βιοασφάλειας

Σε εμβολιασμένες εκτροφές λίγα ζώα ηλικίας μεγαλύτερης των 6 μηνών πρέπει να διατηρούνται ανεμβολίαστα και να ελέγχονται τακτικά ορολογικά. Με τον τρόπο αυτό παρακολουθείται η κατάσταση της εκτροφής (Moennig et al., 2005a). Σε μη εμβολιασμένες εκτροφές λαμβάνονται δείγματα από τη δεξαμενή του γάλακτος και ελέγχονται για αντισώματα. Σε περίπτωση θετικού δείγματος, η εκτροφή ελέγχεται για επίμονα μολυσμένα ζώα.

Συστήνεται να χρησιμοποιείται πρωτόκολλο διπλού εμβολιασμού, με την προϋπόθεση ότι είναι διαθέσιμο εμβόλιο ΕΛΔ (Moennig et al., 2005b). Ο πρώτος εμβολιασμός γίνεται με αδρανοποιημένο εμβόλιο και ακολουθεί ο επαναληπτικός εμβολιασμός τέσσερις εβδομάδες αργότερα, με εμβόλιο ΕΛΔ. Το πρωτόκολλο αυτό διασφαλίζει μακροχρόνια ανοσία και ικανοποιητική προστασία του εμβρύου (Frey et al., 2002). Τα ζώα εμβολιάζονται τις τελευταίες οκτώ εβδομάδες πριν την πρώτη τους εγκυμοσύνη.

2.13 ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Στη χώρα μας το σύνολο των εκτρεφόμενων αγελάδων για γαλακτοπαραγωγή είναι περίπου 220,000 σε συστηματικές εκτροφές (στοιχεία Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2009). Βασικό στοιχείο της παραγωγικής διαδικασίας εκτός από το γάλα είναι η παραγωγή μόσχων. Αναφέρεται από πρόσφατες μελέτες ότι ο αριθμός των μόσχων που απογαλακτίζονται από μια αγελάδα κατά τη διάρκεια της ζωής της στις ελληνικές εκτροφές είναι κατά μέσο όρο 2,7, ενώ στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες ο αριθμός αυτός είναι μεγαλύτερος (Μπάτζιου, 2010).

Από πλευράς υγείας των εκτρεφόμενων ζώων, τα σημαντικότερα λοιμώδη αίτια που προκαλούν υπογονιμότητα και μείωση των αποδόσεων είναι η Ι.Δ.Β. και η Λ.Ρ.Β. Τα νοσήματα αυτά υπάρχουν και δεν λαμβάνεται μέριμνα για τη συστηματική αντιμετώπιση τους στη χώρα μας (Ξυλούρη και συν, 2000).

Έτσι, σε αντίθεση με τις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες, οι οποίες έχουν εφαρμόσει οργανωμένη στρατηγική για την εκρίζωση του BVDV και από τις οποίες η Ελλάδα προμηθεύεται μοσχίδες, η χώρα μας δεν έχει κάνει καμία προσπάθεια για την απαλλαγή από το νόσημα. Ο μικρός αριθμός των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής στη χώρα μας θα μπορούσε πολύ εύκολα να ελεγχθεί.

Στην Ελλάδα, διεξήχθη μελέτη σε 39 εκτροφές γαλακτοπαραγωγών αγελάδων, με συνολικό αριθμό 6333 ζώων, που συμμετείχαν σε εθελοντικό πρόγραμμα εξάλειψης του BVDV (Billinis et al., 2005). Θετικά στον ιό και επίμονα μολυσμένα ζώα (2 δείγματα θετικά στην ανίχνευση του ιού με μεσοδιάστημα 3 εβδομάδων) εντοπίστηκαν σε όλες τις εκτροφές.

Τα επίπεδα βιοασφάλειας στις εκτροφές γαλακτοπαραγωγής είναι πολύ χαμηλά και ο ιός επανακυκλοφορεί στις εκτροφές. Ακόμη, μεγάλο πρόβλημα αποτελούν οι συνεχείς εισαγωγές ζώων χωρίς τα κατάλληλα πιστοποιητικά από τις χώρες της Ε.Ε.

Πίνακας 2.13.1 Επιζωοτιολογικές μελέτες για την εκτίμηση του επιπολασμού σε ζώα με αντισώματα κατά του BVDV.

Χώρα	Χρονολογία	Μέγεθος δείγματος		Επιπολασμός		Εμβολιασμοί	Αναφορά
		Εκτροφές	Αριθμός ζώων	Επίπεδο εκτροφής (%)	Επίπεδο ζώων (%)		
Ευρώπη							
Ελβετία	1995	149	990	-	63		Braun et al., 1998
Δανία	1988	19	2570	100	64	Όχι	Houe and Meyling, 1991
Σκωτία	1992-1993	78	109	-	78		McGowan and Murray, 1999
Σλοβενία	1996	274	6892	-	17		Grom et al., 1999
Ισπανία	1997	28	529	86	21	Όχι	Mainer – Jaime et al., 2001
Σουηδία	1987	15	413	73	46	όχι	Niskanen et al., 1991
H.B.	1985-1986	-	18759	-	65		Edwards et al., 1987
Αμερική							
Καναδάς	1990-1991	15	311	93	53	Όχι	Ganaba et al., 1995

Χώρα	Χρονολογία	Μέγεθος δείγματος		Επιπολασμός		Εμβολιασμοί	Αναφορά
		Εκτροφές	Αριθμός ζώων	Επίπεδο εκτροφής (%)	Επίπεδο ζώων (%)		
Η.Π.Α	1993	5	794	80	29	Όχι	Houe et al., 1995b
Βενεζουέλα	1997	123	615	-	36		Obando et al., 1999

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Σκοπός της παρούσης έρευνας ήταν η **ανίχνευση αντισωμάτων κατά του Ιού της Ιογενούς Διάρροιας των Βοοειδών (BVDV) σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής**. Ο ιός προκαλεί διάφορες νόσους και προκαλεί σοβαρά προβλήματα στην αναπαραγωγή. Με τη μελέτη αυτή, διερευνήθηκε σε αντιπροσωπευτικό δείγμα του ζωικού πληθυσμού των βοοειδών και της κατανομής του στην Ελλάδα, το επίπεδο μόλυνσης των εκτροφών αγελάδων γαλακτοπαραγωγής σε σχέση με τον BVDV και η επιζωοτιολογική έκταση της μόλυνσης από τον ιό. Από παλαιότερη προκαταρκτική διερεύνηση είχε προκύψει το πρόβλημα του BVDV και η παρούσα έρευνα αποσκοπεί στο να αναδείξει και να προτείνει λύσεις για τον έλεγχο του στην Ελληνική αγελαδοτροφία (Billinis et al., 2005).

Εκτός αυτών καταγράφηκε και η κατάσταση υγιεινής των υπό μελέτη εκτροφών αγελάδων και αναλύθηκαν τα δεδομένα της σε σχέση με τα αποτελέσματα της έρευνας για το νόσημα, μέσω εκτενούς ερωτηματολογίου.

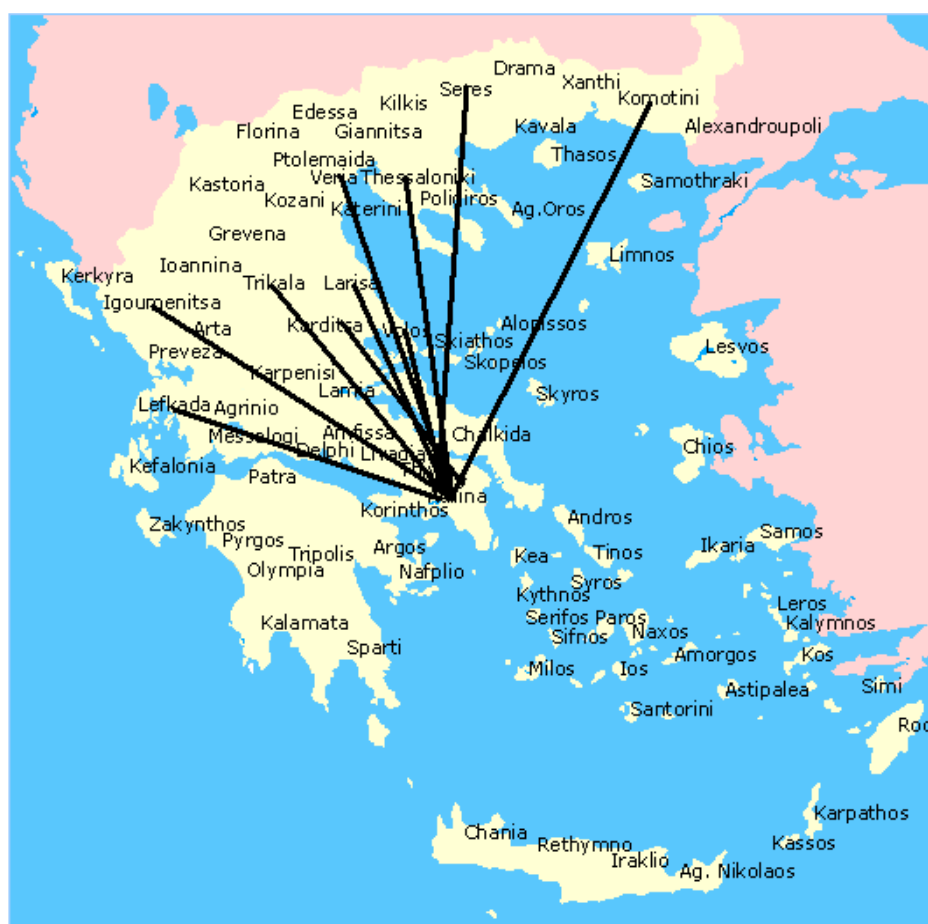
3.1.2 ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από εκτροφές της Μακεδονίας, της Θράκης, της Θεσσαλίας, της Ηπείρου, της Στερεάς Ελλάδας και των Επτανήσων με στόχο να εξαχθεί ένα αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα για την ύπαρξη αντισωμάτων έναντι της Ι.Δ.Β στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες της Ελλάδας. Στις συγκεκριμένες περιοχές, εντοπίζεται και το 94% των εκμεταλλεύσεων γαλακτοπαραγωγών αγελάδων στην Ελλάδα (Στοιχεία Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2009).

Ο καθορισμός του μεγέθους του δείγματος έγινε με βάση μελέτες που αφορούσαν την οροθετικότητα σε σχέση με τον BVDV σε γειτονικές χώρες της Ελλάδας (Tan et al., 2006, Dimitrova et al., 1999, Guercio et al., 2004, Petrovic et al., 2004), οπότε λαμβάνοντας ως βάση ένα υποθετικό-αναμενόμενο ποσοστό και στην Ελλάδα υπολογίστηκε με μικρό περιθώριο σφάλματος, το μέγεθος του δείγματος. Έτσι με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου Statgraphics Plus 4.0 λήφθηκε ως αρχική υποθετική οροθετικότητα στην Ελλάδα ένα ποσοστό της τάξης του 60%. Για να είναι ασφαλής και αντιπροσωπευτικός ο δειγματοληπτικός έλεγχος σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, με περιθώριο απόλυτου σφάλματος ± 5 ποσοστιαίες μονάδες, θα έπρεπε να εξεταστούν 368 δείγματα. Για να μειωθεί ακόμη περισσότερο το περιθώριο σφάλματος, εξετάστηκαν 460 δείγματα. Ο πληθυσμός των ζώων που εξετάστηκαν θεωρήθηκε ενιαίος ανά γεωγραφικό διαμέρισμα και από κάθε εκτροφή εξετάστηκε

τουλάχιστον το 10% των ζώων. Η επιλογή των εκτροφών κρίθηκε σε μεγάλο βαθμό από τη συναίνεση των παραγωγών.

Κατά το σχεδιασμό του πρωτοκόλλου της δειγματοληψίας για τη συγκεκριμένη έρευνα, αποφασίστηκε η λήψη δειγμάτων τόσο από μη εμβολιασμένα όσο και από εμβολιασμένα κατά του BVDV ζώα, με στόχο πιο ολοκληρωμένα συμπεράσματα.



Εικόνα 3.1.2.1 Δίκτυο δειγματοληψίας

3.1.3 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η συλλογή δειγμάτων αίματος έγινε από εκτροφές αγελάδων γαλακτοπαραγωγής το καλοκαίρι του 2009. Συνολικά συλλέχθηκαν 550 δείγματα αίματος, εκ των οποίων τα 97 προέρχονται από εμβολιασμένα έναντι του BVDV ζώα. Για τον εμβολιασμό χρησιμοποιήθηκαν πολυδύναμα εμβόλια.

Η λήψη αίματος έγινε από την κοκκυγική φλέβα και χρησιμοποιήθηκαν φιαλίδια τύπου Vacutainer χωρίς αντιπηκτικό και βελόνες μιας χρήσης διαμέτρου 18G. Τα φιαλίδια τοποθετούνται μέσα σε ισοθερμικά κιβώτια με κατεψυγμένες παγοκύστες, ώστε να βρίσκονται σε άμεση επαφή με αυτές και να διατηρείται

χαμηλή η θερμοκρασία των αιμοδειγμάτων. Στη συνέχεια τα δείγματα παρέμειναν μέσα σε αυτά τα κιβώτια, το πολύ 18 ώρες, μέχρι να προσκομιστούν στο εργαστήριο. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές / λεπτό (rpm) για 20 λεπτά για το διαχωρισμό του ορού (Fonss and Munksgaard, 2008). Ο ορός κάθε αιμοδείγματος μοιράζονταν σε 3 φιαλίδια τύπου Eppendorf και καταψύχονταν στους -20°C μέχρι την εξέτασή του για προσδιορισμό αντισωμάτων με ELISA.

Για την εξέταση των ορών χρησιμοποιήθηκε η ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA, η οποία έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Στη παρούσα εργασία, η ELISA εφαρμόστηκε για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων κατά του BVDV, στους ορούς αίματος των ζώων που εξετάστηκαν.

3.1.4 Συλλογή επιζωοτιολογικών στοιχείων – δεδομένων υγιεινής εκτροφής

Κατά την επίσκεψη στην εκτροφή, λαμβανόταν και καταγραφόταν λεπτομερώς το ιστορικό της και συλλέγονταν στοιχεία για το κάθε ζώο όπως ο αριθμός ενωτίου, το φύλο, η ηλικία, καθώς και η εμφάνιση αποβολών ή άλλων προβλημάτων αναπαραγωγής των αγελάδων. Επίσης από κάποιες εκτροφές λήφθηκαν στοιχεία και για τις χώρες προέλευσης των ζώων σε περίπτωση που γίνονταν εισαγωγές. Σε κάθε εκτροφή, μετά το πέρας της συλλογής των δειγμάτων, συμπληρωνόταν ένα ερωτηματολόγιο που αφορούσε στις συνθήκες υγιεινής και διαχείρισης υγείας της εκτροφής, στο νοσολογικό ιστορικό του συνόλου των ζώων, αγελάδων και μόσχων, καθώς και στην εφαρμογή εμβολιασμών για την Ι.Δ.Β αλλά και για άλλα νοσήματα.

3.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Η διαγνωστική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ELISA (εμπορικό kit IDEXX: Herdchek Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Antibody ELISA Test kit). Πρόκειται για μια ενζυμική μέθοδο για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά της μη δομικής πρωτεΐνης NS3 του BVDV, στον ορό ή το πλάσμα του αίματος ή σε δείγματα γάλακτος. Η παρουσία αντισωμάτων φανερώνει φυσική μόλυνση ή / και εμβολιασμό.

Η διαγνωστική αυτή μέθοδος χρησιμοποιείται σε προγράμματα ελέγχου και εκρίζωσης του BVDV και η εκτέλεση της έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ευαισθησία (Se) και η ειδικότητα (Sp) της διαγνωστικής δοκιμασίας είναι σύμφωνα με πληροφορίες του κατασκευαστή, 96,3% και 99,5%, αντίστοιχα (IDEXX Laboratories).

3.2.1 Περιγραφή της διαγνωστικής τεχνικής

Το εμπορικό kit περιλαμβάνει:

- Μία πλάκα πολυστηρενίου με 96 βοθρία, τα οποία είναι επιστρωμένα με αντιγόνο BVDV.
- Ειδικά μονοκλωνικά αντι-αντισώματα κατά του ιού σε HRPO (Horseradish Peroxidase) σύζευγμα. Πρόκειται για διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα με σταθεροποιητές πρωτεϊνών.
- Θετικό μάρτυρα.
- Αρνητικό μάρτυρα.
- Αραιωτικό δείγματος (Sample diluent). Ρυθμιστικό διάλυμα με σταθεροποιητές πρωτεϊνών συντηρημένο με γενταμυκίνη.
- Διάλυμα έκπλυσης (Wash concentrate)(10X). Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα συντηρημένο με γενταμυκίνη.
- TMB Χρωμογόνο υπόστρωμα (Substrate solution). Το υπόστρωμα αντιδρά με το ένζυμο του συζεύγματος για να παραχθεί το έγχρωμο προϊόν.
- Διάλυμα διακοπής της αντίδρασης μεταξύ του TMB υποστρώματος και του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος (stop solution).

3.2.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Προετοιμασία των δειγμάτων:

Αραίωση 1/5 των προς εξέταση ορών και των ορών-μαρτύρων με το ειδικό αραιωτικό διάλυμα.

1^ο στάδιο:

Τοποθέτηση των ορών μαρτύρων και των εξεταζόμενων ορών μετά την αραιώση τους στην ειδική πλάκα ELISA.

Ακολουθεί παραμονή των δειγμάτων στη πλάκα για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) ώστε να πραγματοποιηθεί σύζευξη των αντισωμάτων των μαρτύρων και των εξεταζόμενων δειγμάτων με το αντιγόνο των βοθρίων της πλάκας.

Κατά τη φάση της πρώτης επώασης τα αντισώματα κατά του BVDV που υπάρχουν στα εξεταζόμενα δείγματα αντιδρούν με το αντιγόνο της πλάκας.

Μετά την αρχική επώαση ακολουθεί έκπλυση της πλάκας με το ειδικό υγρό έκπλυσης έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα αντισώματα τα οποία δεν αντέδρασαν με το αντιγόνο, καθώς και τα λοιπά υπολείμματα των δειγμάτων.

2^ο στάδιο:

Ακολουθεί η προσθήκη του συζεύγματος HRPO (Horseradish Peroxidase) που αποτελείται από το ειδικό αντι-BVDV αντίσωμα, το οποίο συνδέεται με το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος, κατά τη διάρκεια μιας δεύτερης επώασης.

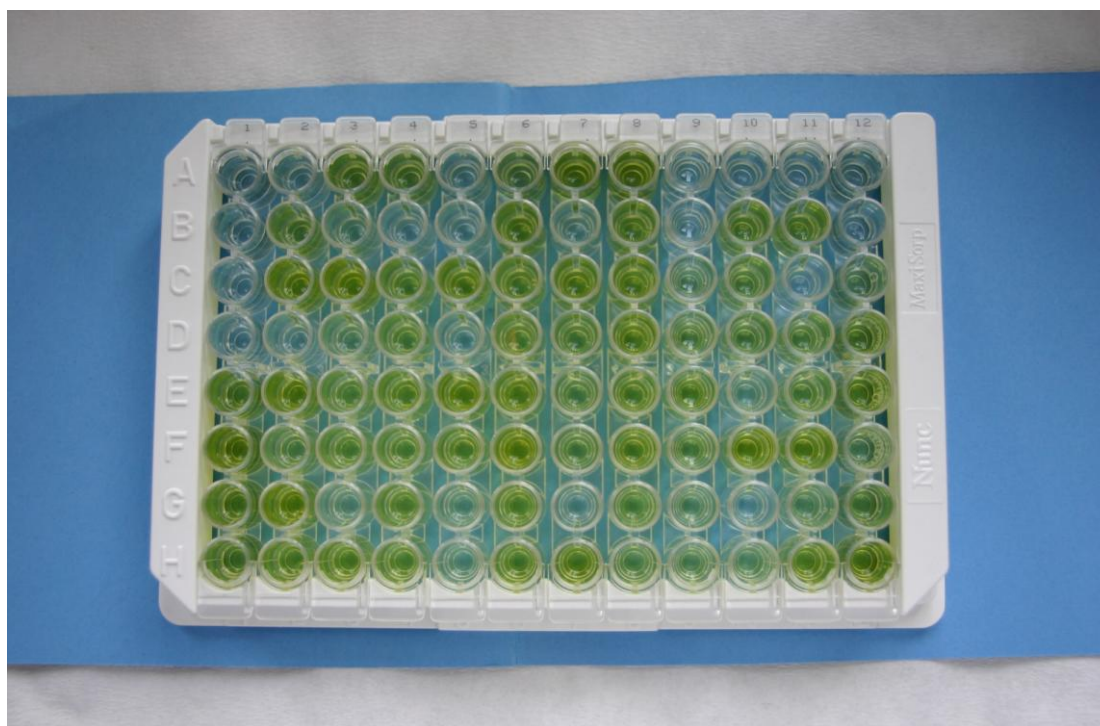
Μετά την περίοδο επώασης τα ενσωματωμένα αντισώματα που δεν έχουν αντιδράσει απομακρύνονται με έκπλυση.

3^ο στάδιο:

Προστίθεται στα βοθρία της πλάκας ένα διάλυμα χρωμογόνου υποστρώματος. Αυτό συνδέεται με το ένζυμο που είναι συνδεδεμένα τα αντισώματα του συζεύγματος και αναπτύσσεται κυανός χρωματισμός. Συνεπώς η ένταση του χρωματισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των ειδικών αντι-αντισωμάτων στο δείγμα ορού. Όσο πιο πολλά αντισώματα περιέχονται στο εξεταζόμενο δείγμα τόσο πιο έντονος χρωματισμός αναπτύσσεται στα αντίστοιχα βοθρία της πλάκας.

4^ο στάδιο:

Προστίθεται ειδικό διάλυμα, το οποίο σταματά την αντίδραση μεταξύ του TMB υποστρώματος και του συμπλόκου αντιγόνου – αντισώματος (stop solution). Με την προσθήκη του διαλύματος παράγεται κίτρινος χρωματισμός.



Εικόνα 3.2.2.1. Μέθοδος ELISA. Χαρακτηριστικός κίτρινος χρωματισμός μετά τη προσθήκη του διαλύματος διακοπής (stop solution).

Τέλος, με τη χρήση φωτομέτρου προσδιορίζεται η απορρόφηση ακτινοβολίας των μαρτύρων και των δειγμάτων στα 450nm, A(450).

Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν από το λόγο, της διαφοράς της απορρόφησης του δείγματος S από το μέσο όρο της απορρόφησης του αρνητικού μάρτυρα, προς το μέσο όρο της διαφοράς της απορρόφησης του θετικού μάρτυρα (P) από τον μέσο όρο της απορρόφησης του αρνητικού μάρτυρα(N), οπότε προκύπτει η τιμή S/P:

$$S/P = \frac{S(A450) - NCx}{PCx - NCx}$$

Όπου $NCx = A1(450) + A2(450) / 2$, ο μέσος όρος της απορρόφησης του αρνητικού μάρτυρα και

$PCx = A3(450) + A4(450) / 2$, ο μέσος όρος της απορρόφησης του θετικού μάρτυρα.

Έτσι, όταν $S/P < 0,2$, τότε το δείγμα θεωρείται αρνητικό για αντισώματα κατά του BVDV.

Όταν $0,2 \leq S/P < 0,3$, τότε το δείγμα θεωρείται ύποπτο και συστήνεται η επανάληψη της εξέτασης.

Τέλος, όταν $S/P \geq 0,3$ τότε το δείγμα θεωρείται θετικό για τη παρουσία ειδικών αντισωμάτων κατά του BVDV.

Η ποσότητα των αντισωμάτων είναι ανάλογη της τιμής A(450) και συνεπώς ανάλογη του λόγου S/P.

Η παρουσία αντισωμάτων κατά του BVDV φανερώνει φυσική μόλυνση ή εφαρμογή εμβολίων ΕΛΔ ή αδρανοποιημένων.

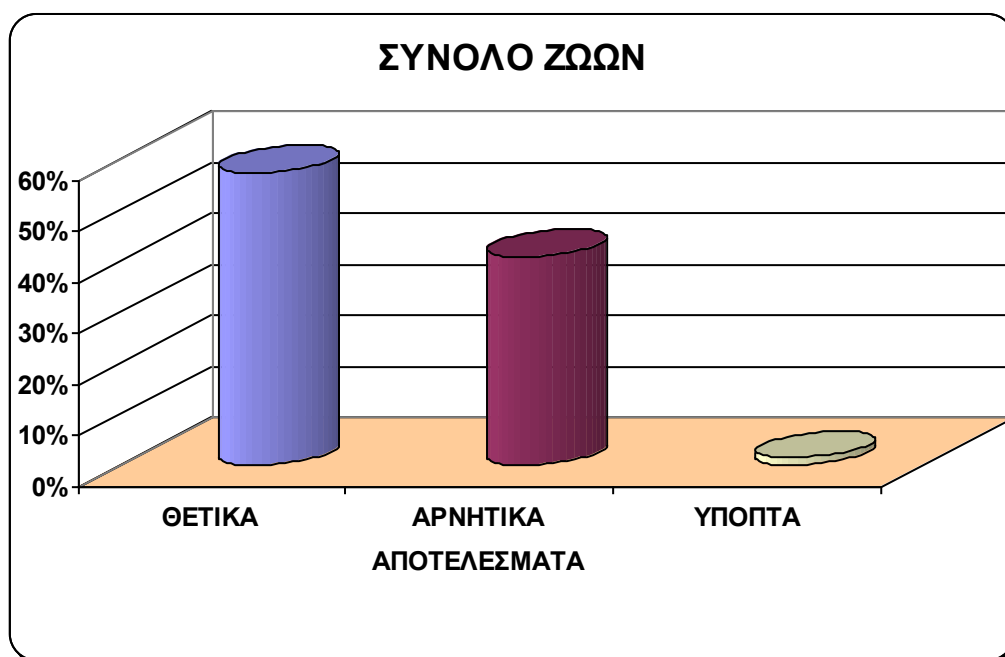
3.2.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρήση του λογισμικού πακέτου Statgraphics Plus 4.0. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το τεστ σύγκρισης ποσοστών και το τεστ X^2 ανεξαρτησίας σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($p \leq 0.05$).

Έγινε επίσης εφαρμογή της μεθόδου Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA), με τη χρήση του πρόσθετου για το Microsoft EXCEL™ XLSTAT. Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια πολύ αποτελεσματική και αξιόπιστη μέθοδο πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης (Ludwig J.A. and Reynolds J.F., 1998, Καρλής Δ., 2005).

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τα 460 δείγματα ορού αίματος που εξετάστηκαν για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων κατά του BVDV, τα 264(57,40%) βρέθηκαν θετικά, τα 189(41,09%) αρνητικά και τα 7(1,51%) ύποπτα. Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 3.3.1. Ποσοστό θετικών, αρνητικών και ύποπτων αποτελεσμάτων από το σύνολο των ζώων που εξετάστηκαν (n=460).

Ο πραγματικός επιπολασμός, υπολογίζεται από τον τύπο των Rogan and Gladen (1978), σύμφωνα με τη σχέση:

$$TP = \frac{AP + Sp + 1}{Se + Sp - 1}$$

όπου TP ο πραγματικός επιπολασμός, AP ο παρατηρηθείς επιπολασμός, Se (sensitivity) η ευαισθησία και Sp (specificity) η ειδικότητα, αντίστοιχα, της διαγνωστικής δοκιμασίας (Rogan and Gladen, 1978). Με αντικατάσταση, για Se=96,3% και Sp=99,5%, προκύπτει ότι ο πραγματικός επιπολασμός των οροθετικών ζώων είναι 59,40%.

Θετικά δείγματα εντοπίστηκαν σε 15 από τις 19 συνολικά υπό εξέταση εκτροφές (78,95%) και ο επιπολασμός των οροθετικών ζώων σε όσες από τις εκτροφές εντοπίστηκε έστω και ένα θετικό ζώο, κυμαίνονταν από 3,8% έως 100%.

Με βάση το ιστορικό που λήφθηκε από τις υπό εξέταση εκτροφές, τα αποτελέσματα ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με το παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.1.1 Περιγραφική στατιστική των μεταβλητών που εξετάστηκαν, σε σχέση με το πληθυσμό των αγελάδων, στην επιδημιολογική μελέτη (19 εκτροφές).

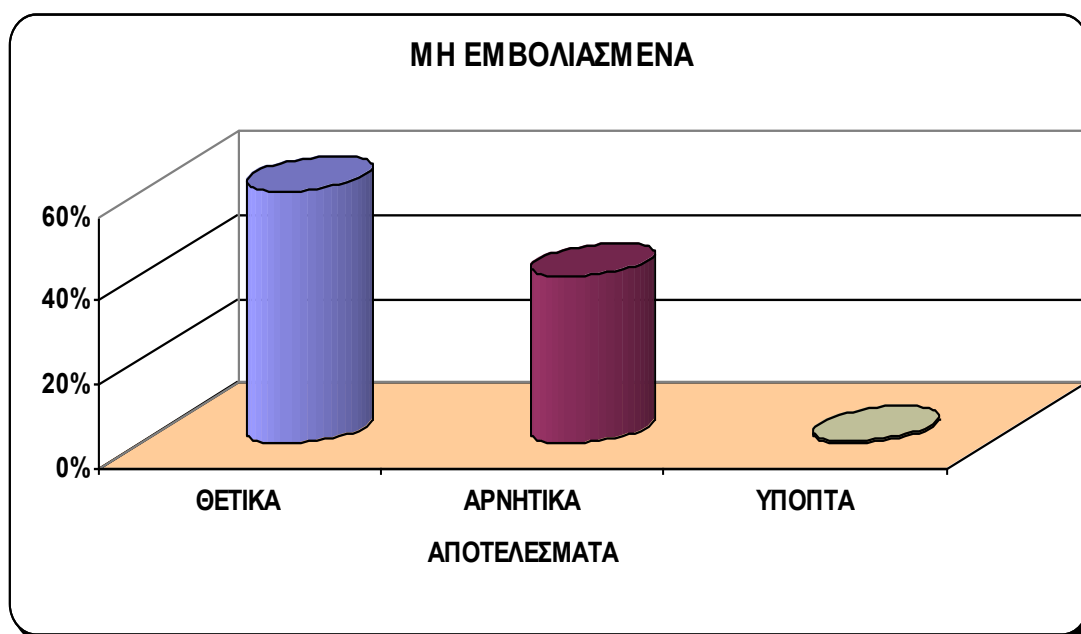
Παράγοντας	Κατηγορία	Αριθμός ζώων	Ποσοστό οροθετικών *(%)
Εντόπιση	Βόρεια Ελλάδα	218	77,98
	Κεντρική Ελλάδα	194	40,21
	Δυτική Ελλάδα	48	33,33
Μέθοδος γονιμοποίησης	Φυσική Οχεία	197	44,16 ^a
	Τεχνητή Σπερμ/ση	120	85,83 ^b
Εμβολιασμός	ΝΑΙ	89	82,02 ^a
	ΟΧΙ	317	59,94 ^b
Μέγεθος εκμεταλλεύσεων	N<100	43	86,05 ^a
	100≤N≤250	66	39,39 ^b
	N>250	176	72,16 ^c

*Τα ποσοστά με στατιστικώς σημαντική διαφορά σημειώνονται με διαφορετικούς εκθέτες (P<0,05).

3.3.1 Παρουσία αντισωμάτων στις δύο κύριες κατηγορίες ζώων

3.3.1.1 Μη εμβολιασμένα ζώα

Από τα 317 ζώα που δεν είχαν εμβολιαστεί κατά του BVDV τα 190 (60%) ήταν θετικά, τα 125 (39,4%) ήταν αρνητικά και 2 (0,6%) ύποπτα (Διάγρ. 3.3.1.1.1). Θετικά δείγματα βρέθηκαν σε όλα τα γεωγραφικά διαμερίσματα από τα οποία έγινε δειγματοληψία.

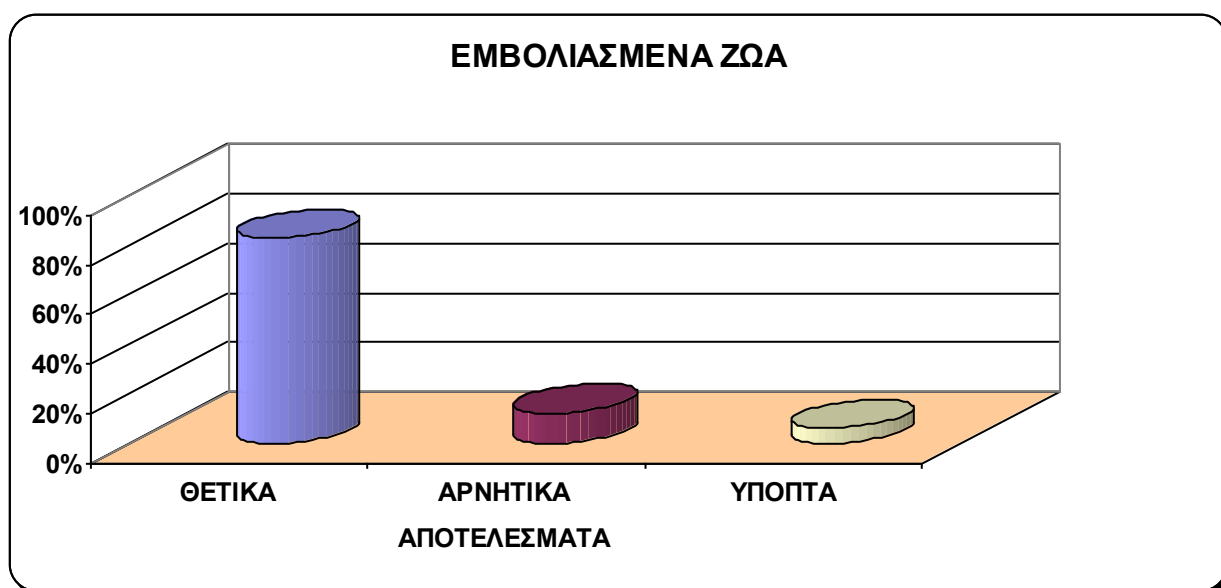


Διάγραμμα 3.3.1.1.1. Ποσοστό % των θετικών, των αρνητικών και των ύποπτων στον BVDV μη εμβολιασμένων ζώων (n=317).

Ο πραγματικός επιπολασμός των οροθετικών ζώων, υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο των Rogan and Gladen (1978) σε 62,10%.

3.3.1.2 Εμβολιασμένα ζώα

Από τα 89 εμβολιασμένα ζώα τα 73 (82%) ήταν θετικά, τα 11 (12%) αρνητικά και τα 5 (6%) ύποπτα (Διάγρ. 3.3.1.2.1).



Διάγραμμα 3.3.1.2.1. Ποσοστά % θετικών, αρνητικών και ύποπτων στον BVDV ζώων εμβολιασμένων με πολυδύναμα εμβόλια (n=89).

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 3.1.1 το ποσοστό των θετικών ζώων είναι πιο υψηλό στα εμβολιασμένα ζώα (82,02%) σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα (59,94%). Βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ εμβολιασμένων και μη ζώων σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, καθώς και θετική συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων εμβολιασμός ή μη των ζώων και παρουσία ή όχι αντισωμάτων κατά του BVDV.

3.3.2 Μέθοδος γονιμοποίησης και BVDV

Στον πίνακα 3.1.1 φαίνεται ο αριθμός των αγελάδων που προέρχονται από αγελάδες που γονιμοποιήθηκαν με φυσική οχεία και αυτός από αγελάδες στις οποίες εφαρμόστηκε τεχνητή σπερματέγχυση, καθώς και τα αντίστοιχα ποσοστά. Μελετήθηκαν μόνο μη εμβολιασμένα ζώα ενώ από 2 εκτροφές δεν υπήρχαν δεδομένα σχετικά με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο γονιμοποίησης.

Κατά τη στατιστική επεξεργασία των παραπάνω αποτελεσμάτων βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην οροθετικότητα για τον BVDV μεταξύ ζώων που γονιμοποιήθηκαν με φυσική οχεία και εκείνων που γονιμοποιήθηκαν με τεχνητή σπερματέγχυση, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Επίσης παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων ύπαρξης ή όχι αντισωμάτων κατά του BVDV και τρόπου γονιμοποίησης ($P < 0,001$).

Από τη σύγκριση των ποσοστών βρέθηκε ότι το ποσοστό των οροθετικών ζώων (85,83%) τα οποία γονιμοποιήθηκαν με τεχνητή σπερματέγχυση είναι μεγαλύτερο από εκείνο με φυσική οχεία (44,16%) και μάλιστα η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

3.3.3 Μέγεθος εκτροφής και BVDV

Στο πίνακα 3.1.1 φαίνεται ο αριθμός των αγελάδων στις οποίες ανιχνεύτηκαν αντισώματα κατά του BVDV σε σχέση με το μέγεθος κάθε εκτροφής με βάση τον αριθμό των εκτρεφόμενων ζώων και τα αντίστοιχα ποσοστά αυτών. Μελετήθηκαν μόνο μη εμβολιασμένα ζώα ενώ από δύο εκτροφές δεν υπήρχαν δεδομένα σχετικά με τον αριθμό των εκτρεφόμενων ζώων.

Κατά τη στατιστική επεξεργασία των παραπάνω αποτελεσμάτων, βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της οροθετικότητας για τον BVDV και του μεγέθους των εκμεταλλεύσεων με βάση τον αριθμό των εκτρεφόμενων ζώων, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, καθώς και συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων ύπαρξης ή όχι αντισωμάτων κατά του BVDV και μεγέθους των εκτροφών ($P < 0,001$).

3.3.4 Ύπαρξη του BVDV στις εκτροφές και εμφάνιση αποβολών

Από το σύνολο των εκτροφών που χρησιμοποιήθηκαν στη δειγματοληψία μόνο στις 4 αναφέρεται ιστορικό αποβολών. Ωστόσο το γεγονός αυτό είναι υπό αμφισβήτηση καθώς υπάρχει η πιθανότητα σχετικά δεδομένα να μην έγιναν γνωστά κατά τη συλλογή των πληροφοριών, ενδεχομένως λόγω ενδιασμού των παραγωγών. Εξάλλου είναι δυνατόν να έχουν διαφύγει της προσοχής των παραγωγών ή των ζωοκόμων κάποια περιστατικά αποβολών. Επομένως τα παρακάτω αποτελέσματα παρατίθενται υπό τη μορφή παρατήρησης. Τα στοιχεία που συγκεντρώθηκαν για τις αποβολές συνοψίζονται στο παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.3.4.1. Περιστατικά αποβολών σε εμβολιασμένα και μη ζώα

Κατηγορία	Αριθμός ζώων που εκδήλωσαν αποβολές	Συνολικός αριθμός ζώων σε εκτροφές όπου εκδηλώθηκαν αποβολές	Ποσοστό ζώων που εκδήλωσαν αποβολές.
Μη εμβολιασμένα	60	300	20
Εμβολιασμένα	13	270	4,8

Γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν αποβολές στις εκτροφές όπου εφαρμόζονται εμβολιασμοί είναι πολύ μικρότερο σε σχέση με το ποσοστό στα μη εμβολιασμένα ζώα.

3.3.5 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Α.Κ.Σ)

Με την εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου είναι δυνατή η ανίχνευση των σχέσεων συμπάθειας και αντιπάθειας μεταξύ των μεταβλητών / δειγμάτων και ο καθορισμός ομάδων (καλούνται κύριοι Συνθετητές) σύμφωνα με αυτές τις σχέσεις.

Από μαθηματικής πλευράς, η μέθοδος Α.Κ.Σ δεν είναι τίποτα περισσότερο παρά η εύρεση των ιδιοτιμών (eigenvalues) και ο υπολογισμός των ιδιοδιανυσμάτων (eigenvectors) του πίνακα διακυμάνσεων / συνδιακυμάνσεων (variance / covariance) των δεδομένων. Οι ιδιοτιμές και κυρίως τα ιδιοδιανύσματα δίνουν μια σαφή εικόνα της δομής του πίνακα των αρχικών δεδομένων καθώς και των σχέσεων μεταξύ των μεταβλητών, κάτι που δεν γίνεται κατανοητό στον πίνακα των αρχικών δεδομένων.

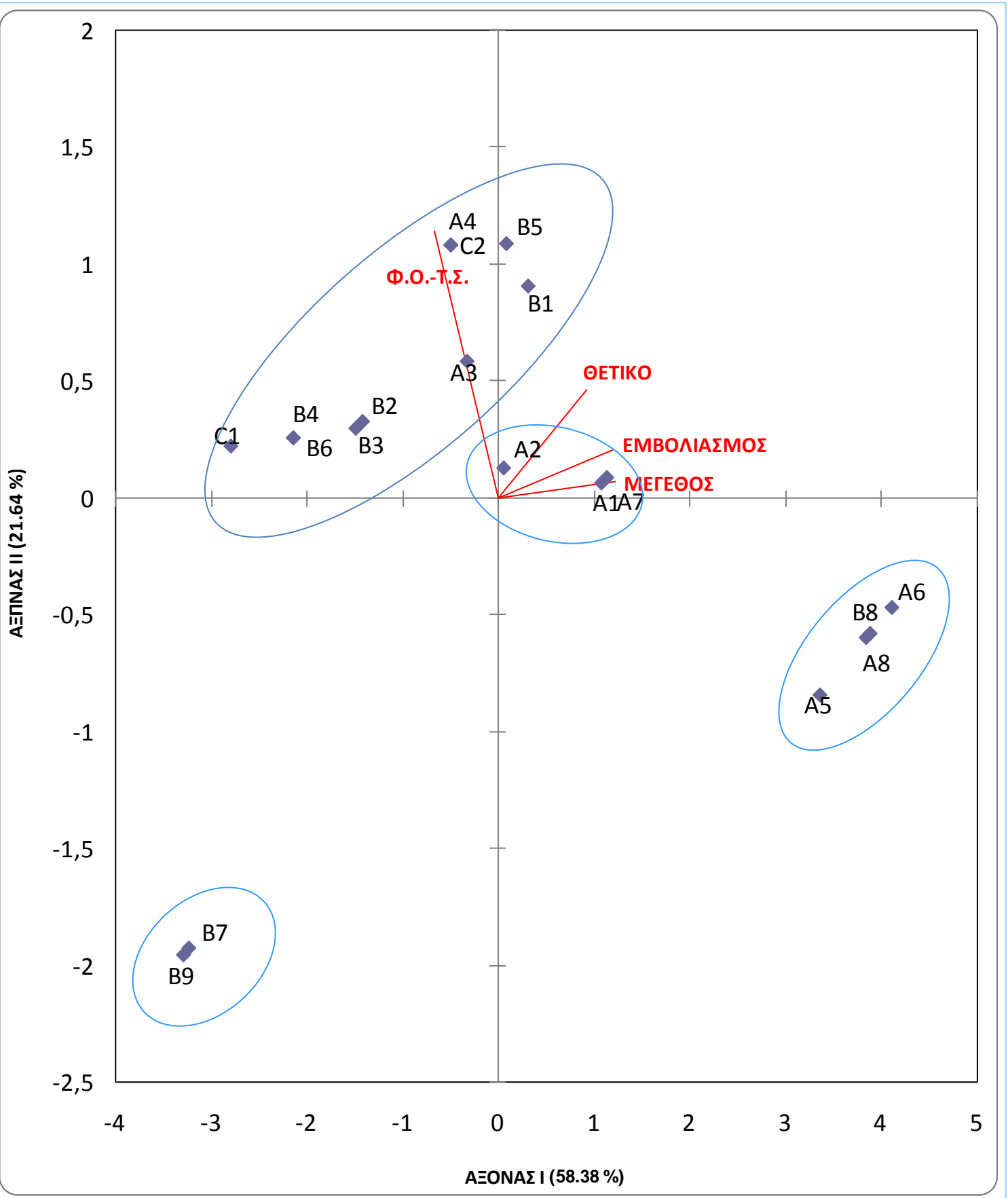
Μελετήθηκαν μόνο μη εμβολιασμένα ζώα ενώ από δύο εκτροφές δεν υπήρχαν δεδομένα σχετικά με τον αριθμό των εκτρεφόμενων ζώων.

Στον πίνακα 3.3.5.1 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ELISA όσον αφορά τον αριθμό των ζώων που κατατάσσονται ως θετικά, αρνητικά και ύποπτα στον BVDV.

Πίνακας 3.3.5.1. Αποτελέσματα διαγνωστικής δοκιμής ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του BVDV και παραμετροποίηση των αποτελεσμάτων ως προς τη γεωγραφική εντόπιση των υπό εξέταση εκτροφών, τη διενέργεια εμβολιασμών, τη μέθοδο γονιμοποίησης και το μέγεθος των εκτροφών.

ΜΟΝΑΔΑ											
Β. ΕΛΛΑΔΑ	Κωδ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ (ΑΡΙΘΜΟΣ ΖΩΩΝ)			ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ			ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ	Φ.Ο / Τ.Σ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΕΚΤΡΟΦΗΣ
		ΑΡΝΗΤΙΚΟ <0.2	ΥΠΟΠΤΟ 0.2-0.3	ΘΕΤΙΚΟ >0.3		ΑΡΝΗΤΙΚΟ <0.2	ΥΠΟΠΤΟ 0.2-0.3	ΘΕΤΙΚΟ >0.3			
ΚΟΜΟΤΗΝΗ	A1	11	1	59	71	15,5	1,4	83,1	ΌΧΙ	Τ.Σ	(n>250)
ΗΜΑΘΙΑ	A2	0	0	13	13	0,0	0,0	100,0	ΌΧΙ	Τ.Σ	(n<100)
ΗΜΑΘΙΑ	A3	20	0	9	29	69,0	0,0	31,0	ΌΧΙ	Φ.Ο	(n>250)
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	A4	0	0	8	8	0,0	0,0	100,0	ΌΧΙ	Φ.Ο	(n<100)
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	A5	4	1	5	10	40,0	10,0	50,0	ΝΑΙ		(100≤n≤250)
ΚΟΜΟΤΗΝΗ	A6	0	1	25	26	0,0	3,8	96,2	ΝΑΙ		(100≤n≤250)
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	A7	5	0	31	36	13,9	0,0	86,1	ΌΧΙ	Τ.Σ	(n>250)
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	A8	3	2	20	25	12,0	8,0	80,0	ΝΑΙ		(100≤n≤250)
		43	5	170	218						
		0,20	0,02	0,78							
ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ											
ΑΣΠΡΟΠΥΡΓΟΣ	B1	12	0	28	40	30,0	0,0	70,0	ΌΧΙ	Φ.Ο	(n>250)
ΑΣΠΡΟΠΥΡΓΟΣ	B2	24	0	1	25	96,0	0,0	4,0	ΌΧΙ	Φ.Ο	(100≤n≤250)
ΑΣΠΡΟΠΥΡΓΟΣ	B3	15	0	0	15	100,0	0,0	0,0	ΌΧΙ	Φ.Ο	(100≤n≤250)
ΑΣΠΡΟΠΥΡΓΟΣ	B4	4	0	0	4	100,0	0,0	0,0	ΌΧΙ	Φ.Ο	(n<100)
ΑΣΠΡΟΠΥΡΓΟΣ	B5	1	0	25	26	3,8	0,0	96,2	ΌΧΙ	Φ.Ο	(100≤n≤250)
ΑΣΠΡΟΠΥΡΓΟΣ	B6	2	0	0	2	100,0	0,0	0,0	ΌΧΙ NO	Φ.Ο	(n<100)
ΒΟΛΟΣ	B7	26	0	1	27	96,3	0,0	3,7	DATA		
ΕΛΑΣΣΟΝΑ	B8	4	1	23	28	14,3	3,6	82,1	ΝΑΙ NO		(n>250)
ΚΑΡΔΙΤΣΑ	B9	27	0	0	27	100,0	0,0	0,0	DATA		
		115	1	78	194						
		0,59	0,01	0,40							
ΔΥΤΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ											
ΔΕΥΚΑΔΑ	C1	31	1	0	32	96,9	3,1	0,0	ΌΧΙ	Φ.Ο	
ΗΓΟΥΜΕΝΙΤΣΑ	C2	0	0	16	16	0,0	0,0	100,0	ΌΧΙ	Φ.Ο	(n<100)
		31	1	16	48						
		0,65	0,02	0,33							
		189,00	7,00	264,00	460,00						
		0,41	0,02	0,57							

Τα στοιχεία του πίνακα 3.3.5.1 αναφορικά με τα ποσοστά εμφάνισης του BVDV στις υπό διερεύνηση εκτροφές με παράγοντες την οροθετικότητα, τον εμβολιασμό ή μη, τη γεωγραφική κατανομή των μονάδων, την ακολουθούμενη μέθοδο γονιμοποίησης και το μέγεθος των εκτροφών, αναλύθηκαν με την μέθοδο Α.Κ.Σ (Ludwig J.A. and Reynolds J.F., 1998). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην εικόνα 3.3.5.1.



Εικόνα 3.3.5.1. Ανάλυση PCA των ποσοστών εμφάνισης του BVDV στις εκτροφές, με παράγοντες τα ποσοστά εμφάνισης (θετικά, αρνητικά και ύποπτα δείγματα), τον εμβολιασμό ή μη, τη γεωγραφική κατανομή των μονάδων, την ακολουθούμενη

μέθοδο γονιμοποίησης και το μέγεθος των εκτροφών. Οι κωδικοί των εκτροφών είναι σύμφωνα με τον πίνακα 3.3.5.1.

- Μονάδες Α, Βόρεια Ελλάδα, Μονάδες Β, Κεντρική Ελλάδα, Μονάδες C, Δυτική Ελλάδα (βλ. κωδικούς στο Πίνακα 3.3.5.1).

Τα αποτελέσματα του πίνακα 3.3.5.1 στο σύνολο της χώρας, δείχνουν ότι ανεξάρτητα του εμβολιασμού ή μη και της γεωγραφικής κατανομής των δειγμάτων, το 57% των δειγμάτων βρέθηκαν θετικά στον BVDV, το 41% αρνητικό και το 2% ύποπτο. Το ποσοστό των ύποπτων δειγμάτων κυμαίνεται μεταξύ 1% και 3% και είναι ελάχιστο για να αποτελέσει σημαντικό αποτέλεσμα προς συζήτηση και επιβεβαιώνει την αξιοπιστία της αναλυτικής μεθόδου.

Σύμφωνα με την ανάλυση Α.Κ.Σ, δεν υφίσταται ιδιαίτερη γεωγραφική διάκριση στην μολυσματικότητα της ασθένειας καθώς όλες οι μονάδες είναι ομαδοποιημένες με τυχαίο τρόπο αν δεν ληφθούν υπόψη άλλοι παράγοντες. Παρατηρούνται όμως ομαδοποιήσεις με βάση ποσοτικές παραμέτρους. Έτσι, τα δεδομένα ομαδοποιούνται ως προς τον εμβολιασμό και την τεχνητή σπερματέγχυση ενώ δεν παρατηρούνται ομαδοποιήσεις όσον αφορά τη φυσική οχεία και το μέγεθος των εκμεταλλεύσεων.

Πιο συγκεκριμένα, στο κέντρο της εικόνας 3.3.5.1., η περιοχή που ορίζεται από τις εκτροφές Α1, Α2 και Α7, αποτελείται από τις εκτροφές στις οποίες εφαρμόζεται τεχνητή σπερματέγχυση, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη άλλοι παράγοντες. Ομοίως, στο κάτω δεξιό τεταρτημόριο της εικόνας 3.3.5.1., οι εκτροφές Α5, Α6, Α8 και Β8, ορίζουν τις εκτροφές που διενεργούνται εμβολιασμοί, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη άλλοι παράγοντες. Τέλος, η μεγάλη περιοχή στο άνω αριστερό μισό της εικόνας 3.3.5.1., αποτελείται από τις εκτροφές στις οποίες εκτελούνται φυσικές οχείες, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη άλλοι παράγοντες.

3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο BVDV ενδημεί στους πληθυσμούς των βοοειδών στις περισσότερες περιοχές της γης. Ο υψηλός επιπολασμός του ιού σε συνδυασμό με τις αρνητικές επιδράσεις που έχει στην αναπαραγωγή και τη γενική κατάσταση υγείας των μολυσμένων ζώων, έχει ως συνέπειες σημαντικές οικονομικές απώλειες για τη βιομηχανία των βοοειδών, σε παγκόσμιο επίπεδο (Houe et al., 1993). Ο BVDV ενδημεί σε όλες τις χώρες που δεν λαμβάνονται μέτρα συστηματικού ελέγχου. Σε τέτοιες συνθήκες, περίπου στο 50% των εκτροφών παρουσιάζονται επίμονα μολυσμένα ζώα και το 90% των βοοειδών εκτίθενται στον ιό κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Houe, 2003).

Επειδή η λοιμογόνος δύναμη των στελεχών του BVDV ποικίλλει και η μόλυνση των ζώων συνοδεύεται από παροδική ανοσοκαταστολή, παρατηρούνται διάφορα συμπτώματα που οφείλονται στον BVDV, από προβλήματα στο πεπτικό και

το αναπαραγωγικό σύστημα, έως τη θανατηφόρο αιμορραγική νόσο (Baker, 1995). Οι μεγαλύτερες απώλειες εξαιτίας της μόλυνσης από τον BVDV, προκαλούνται από την αλληλεπίδραση του ιού με το αναπαραγωγικό σύστημα. Σοβαρές επιπτώσεις προκαλούνται επίσης από τις σύμμεικτες μολύνσεις με άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς. Είναι γνωστό ότι τα επίμονα μολυσμένα ζώα αποτελούν την κύρια οδό μετάδοσης του BVDV σε μια εκτροφή (Brock, 2004, Kelling, 2004). Έχει αναφερθεί ότι ειδικά για τις γαλακτοπαραγωγικές εκμεταλλεύσεις όπου τα ζώα βρίσκονται σε στενή επαφή, ένα επίμονο μολυσμένο νεογέννητο μοσχάρι, μπορεί να μεταδώσει τον ιό στο 90% των ζώων της εκτροφής μέσα σε χρονικό διάστημα 3 μηνών (Houe, 1992). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι ο επιπολασμός του BVDV όταν υπάρχουν ένα ή περισσότερα επίμονα μολυσμένα ζώα σε μια εκτροφή αγγίζει το 87%. Ο επιπολασμός μειώθηκε στο 43%, σε εκτροφές χωρίς επίμονα μολυσμένα ζώα (Radostits et al., 2007). Η μετάδοση του BVDV με άμεσο ή έμμεσο τρόπο μπορεί να συμβεί για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, ακόμη και εν την απουσία επίμονα μολυσμένων ζώων (Moen et al., 2005).

Ο BVDV μπορεί να προκαλέσει μεγάλες οικονομικές απώλειες. Ο υπολογισμός των οικονομικών απωλειών που προκαλούνται από τη νόσο είναι πολύπλοκος. Οι οικονομικές απώλειες ποικίλουν και επηρεάζονται από τη κατάσταση ανοσίας της εκμετάλλευσης, τις πιθανές εγκυμοσύνες καθ' όλη τη μολυσματική περίοδο και το στέλεχος του ιού που προκαλεί τη μόλυνση. Σε επίπεδο εκτροφής, έχει υπολογιστεί ότι οι οικονομικές απώλειες λόγω της 'κλασσικής εμφάνισης' της Ι.Δ.Β, όπου το νόσημα είναι υποκλινικής διαδρομής και οι περισσότερες απώλειες σχετίζονται με προβλήματα από το αναπαραγωγικό σύστημα και την εμφάνιση των επίμονα μολυσμένων ζώων, έχουν εκτιμηθεί σε 21€-135€ ανά αγελάδα, ανά εκτροφή. Αντίθετα, οι οικονομικές απώλειες από επιζωοτίες του BVDV που συμβαίνουν ταυτόχρονα με άλλες μολύνσεις, ή λόγω μόλυνσης από στελέχη υψηλής λοιμογόνου δύναμης και οι οποίες συνοδεύονται από υψηλή θνησιμότητα, έχουν υπολογιστεί σε περισσότερα από 340€ ανά αγελάδα, ανά εκτροφή (Carman et al., 1998, Houe, 2003).

Το επίπεδο των ελληνικών εκτροφών ως προς τη κατάσταση της μόλυνσης από τον BVDV δεν έχει μελετηθεί συστηματικά. Από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας αποδεικνύεται ότι ένα σημαντικό ποσοστό αγελάδων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης στον ελληνικό χώρο είναι μολυσμένα από τον BVDV. Αποδεικνύεται επίσης ότι ο επιπολασμός των αντισωμάτων κατά του BVDV, δεν διαφέρει σημαντικά από τα αποτελέσματα άλλων μελετών, σε χώρες που δεν εφαρμόζονται συστηματικά προγράμματα εξάλειψης του BVDV (EU Thematic network, 2001). Σε μη εμβολιασμένες εκτροφές, ο επιπολασμός του BVDV ποικίλλει μεταξύ περιοχών ή κρατών, μεταξύ 20% και 90% (Bolin et al., 1985, Niskanen et al., 1991, Houe, 1995, Saliki et al., 2004). Το 1-2% του πληθυσμού των βοοειδών σε παγκόσμιο επίπεδο, είναι επίμονα μολυσμένα από τον BVDV, σε χώρες όπου δεν εφαρμόζονται συστηματικά προγράμματα εξάλειψης του BVDV (Houe, 1995). Οι διαφορές αυτές ερμηνεύονται εν μέρει από παράγοντες όπως, η πυκνότητα του ζωικού κεφαλαίου, το

μέγεθος των εκτροφών, τις διακινήσεις των ζώων και τις διαχειριστικές πρακτικές που εφαρμόζονται (Houe et al., 1995).

Το σχετικά υψηλά ποσοστό επιπολασμού (59,40%) του BVDV στις ελληνικές εκτροφές δικαιολογείται από το γεγονός ότι στην Ελλάδα δεν εφαρμόζονται προγράμματα ελέγχου και εξάλειψης του συγκεκριμένου νοσήματος. Στη πλειοψηφία των περιπτώσεων δεν γίνεται κανένας έλεγχος κατά την εισαγωγή ζώων αλλά και σπέρματος από χώρες του εξωτερικού και ιδιαίτερα από χώρες στις οποίες δεν λαμβάνεται κανένα μέτρο κατά του BVDV (Μπάτζιου, 2010). Επιπλέον, οι ελλιπείς γνώσεις των παραγωγών και η οικονομική αδυναμία, έχουν ως αποτέλεσμα την αδυναμία εφαρμογής των κατάλληλων, συστηματικών προγραμμάτων εξάλειψης του BVDV. Εκτός από τις πρωτογενείς απώλειες που προκαλεί ο ιός, οι παραγωγοί δεν γνωρίζουν για την ανοσοκατασταλτική επίδραση του BVDV που μπορεί να προδιαθέσει σε άλλες παθολογικές καταστάσεις, οι συνέπειες των οποίων δεν μπορούν να εκτιμηθούν ποσοτικά (Billinis, 2005).

Σύμφωνα με τα στοιχεία των ερωτηματολογίων που συμπληρώθηκαν, στην πλειοψηφία των εκτροφών που εξετάστηκαν, τα εισαγόμενα ζώα προέρχονται από χώρες της ΕΕ, οι οποίες δεν είναι απαλλαγμένες από τον BVDV, όπως η Ιταλία, η Ουγγαρία και η Γαλλία. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι δεν απαιτείται από τη χώρα μας (ως μέλος της ΕΕ) ή έστω μεμονωμένα από τους παραγωγούς, πιστοποίηση ότι τα εισαγόμενα ζώα είναι απαλλαγμένα από τον BVDV, καθώς και τα χαμηλά επίπεδα βιοασφάλειας που τηρούνται στις εκτροφές, ευνοούν την κυκλοφορία του ιού στις εκτροφές.

Επιπλέον, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ανιχνεύτηκαν αντισώματα κατά του BVDV σε όλα τα γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδας, στα οποία έγινε δειγματοληψία. **Τα θετικά δείγματα δεν εντοπίστηκαν σε μεμονωμένες περιοχές, γεγονός που επιβεβαιώνει την ύπαρξη του φυσικού ιού και την κυκλοφορία του στο σύνολο σχεδόν της ελληνικής επικράτειας από το οποίο έγινε η δειγματοληψία.** Το γεγονός αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τον επιζωοτιολογικό χαρακτήρα του BVDV, καθώς ο ιός μπορεί να μεταφερθεί σε τεράστιες αποστάσεις με τις εμπορικές συναλλαγές επίμονα μολυσμένων ζώων ή υγιών ζώων που κυκλοφορούν επίμονα μολυσμένα έμβρυα, μολυσμένου σπέρματος, ακόμη και κατά την εμβρυομεταφορά από μολυσμένες αγελάδες δότριες (Lindberg and Houe, 2005). Είναι σημαντικό να μην γίνονται εισαγωγές επίμονα μολυσμένων ζώων με BVDV ή αγελάδων που κυκλοφορούν επίμονα μολυσμένα έμβρυα.

Επίσης για πρώτη φορά γίνεται έλεγχος της ύπαρξης αντισωμάτων σε εμβολιασμένα ζώα με τα ανάλογα συμπεράσματα. Έτσι, το ποσοστό των οροθετικών ζώων στις εκτροφές που διενεργούνται εμβολιασμοί κατά του BVDV είναι 82%. Τα αντισώματα που ανιχνεύονται σε αυτή τη περίπτωση είναι πιθανότατα εμβολιακής προέλευσης. Ωστόσο, από το ποσοστό των οροθετικών ζώων φαίνεται ότι ο εμβολιασμός είναι επιτυχής σε περίπου 8 από τα 10 ζώα, γεγονός που δημιουργεί αμφιβολίες για τη σωστή εφαρμογή των εμβολιασμών, λαμβάνοντας υπόψη ότι στην πλειονότητα των περιπτώσεων ο εμβολιασμός εκτελείται από τον κτηνοτρόφο ενώ

δεν ακολουθείται πιστά το εμβολιακό πρόγραμμα όπως αυτό συστήνεται από την εταιρεία παραγωγής του εμβολίου. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν αναφερθεί και από άλλους ερευνητές, που αναφέρουν ποσοστό αποτυχίας έως και 30% (Quaife, 1996). Η σωστή τήρηση των εμβολιαστικών πρωτοκόλλων είναι ιδιαίτερης σημασίας για τη προστασία από τη μόλυνση από τον BVDV και η μη σωστή εφαρμογή τους ενέχει το κίνδυνο ενδομήτριας μόλυνσης και δημιουργίας επίμονα μολυσμένων ζώων (Bolin, 1995).

Ένα άλλο εύρημα το οποίο θα πρέπει να επισημανθεί είναι ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην οροθετικότητα για τον BVDV μεταξύ των ζώων που γονιμοποιήθηκαν με φυσική οχεία και ζώων που γονιμοποιήθηκαν με τεχνητή σπερματέγχυση. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό οροθετικότητας στα ζώα που γονιμοποιήθηκαν με τεχνητή σπερματέγχυση σε σχέση με αυτά που γονιμοποιήθηκαν με φυσική οχεία και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($P=0$). Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στο ότι το σύνολο των εκτροφών που εφαρμόζουν τη τεχνητή σπερματέγχυση για την γονιμοποίηση των ζώων τους και χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα έρευνα, δεν χρησιμοποιείται σπέρμα ελεγμένο για τον BVDV. Ο ιός όπως αναφέρθηκε, μπορεί και εισάγεται στις εκτροφές και μεταδίδεται μέσω του μολυσμένου σπέρματος (Lindberg and Houe, 2005).

Ένα άλλο σημείο που πρέπει να συζητηθεί είναι ότι προσδιορίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην οροθετικότητα του BVDV, σε σχέση με το μέγεθος των μονάδων, όπως αυτό προσδιορίζεται από τον συνολικό αριθμό των εκτροφόμενων ζώων. Οι υπό μελέτη εκμεταλλεύσεις διαχωρίστηκαν σε εκτροφές μικρού, μεσαίου και μεγάλου μεγέθους. Η παρατήρηση αυτή συνάδει με τα συμπεράσματα άλλων ερευνητών, ότι στις μεγάλες εκτροφές, ή σε εκτροφές ή περιοχές με αυξημένη πυκνότητα ζώων, ο επιπολασμός του BVDV είναι υψηλότερος (Loken et al., 1991, Houe, 1995). Τα παραπάνω αποτελέσματα, αν και αντιπροσωπευτικά, χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Ένα άλλο σημείο που πρέπει να συζητηθεί είναι ότι τα δείγματα στη συγκεκριμένη μελέτη προέρχονται από ενήλικα ζώα. Ο κίνδυνος μόλυνσης από τον BVDV είναι σχεδόν παρόμοιος σε όλες τις ηλικιακές κατηγορίες (Houe and Meyling, 1991). Ο τίτλος των αντισωμάτων βοοειδών μολυσμένων από τον BVDV είναι δυνατόν να είναι υψηλός σε ενήλικα ζώα λόγω παλαιότερων μολύνσεων. Τα παροδικά μολυσμένα ζώα αποκτούν ισόβια ανοσία (Houe et al., 1995). Γενικότερα, ο τίτλος των αντισωμάτων κατά του BVDV είναι αυξημένος σε όσες εκμεταλλεύσεις έχουν μολυνθεί πρόσφατα ή υπάρχει ενεργή μόλυνση στην εκμετάλλευση, λόγω της παρουσίας παροδικά ή επίμονα μολυσμένων ζώων. Αντίθετα, εκμεταλλεύσεις στις οποίες ανιχνεύεται μικρό ποσοστό οροθετικών ζώων, πρέπει να τίθενται υπό παρακολούθηση και οι παραγωγοί να ενημερώνονται για την πρόληψη του νοσήματος και τα απαραίτητα μέτρα βιοασφάλειας.

Από παλαιότερη μελέτη στις ίδιες εκμεταλλεύσεις αποκαλύφθηκε η παρουσία του ιού της Λοιμώδους Ρινοτραχειϊτίδας των Βοοειδών (Μπάτζιου, 2010). Η ταυτόχρονη μόλυνση των εκμεταλλεύσεων από τους BVDV και BoHV-1, έχει ως

συνέπεια την συχνότερη εμφάνιση προβλημάτων από το αναπαραγωγικό σύστημα. Η ταυτόχρονη μόλυνση και από τους δύο ιούς μπορεί να αυξήσει την ένταση των προβλημάτων του αναπαραγωγικού συστήματος (Biuk-Rudan et al., 1999).

Τέλος, όσον αφορά την εκδήλωση αποβολών σε ζώα εμβολιασμένα και μη, όπως προαναφέρθηκε, τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 4,80% και 20%. Από τα αποτελέσματα δεν μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα για την επίδραση του BVDV στην αναπαραγωγή, στις υπό εξέταση εκτροφές. Αυτό οφείλεται στην έλλειψη στοιχείων ιστορικού αποβολών. Η πιθανότητα αυτή πάντως, δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Χωρίς πληροφορίες για τον επιπολασμό και την κατανομή του BVDV σε μια χώρα, είναι δύσκολο να εφαρμοστούν οι κατάλληλες στρατηγικές ελέγχου και να εκτιμηθούν οι κύριες οικονομικές επιπτώσεις στην παραγωγή. Ο σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν η εκτίμηση του επιπολασμού των αντισωμάτων κατά του BVDV σε εθνικό επίπεδο. Από τη μελέτη αυτή προκύπτει ότι ο BVDV είναι εξαπλωμένος στις Ελληνικές εκτροφές. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την ποσοτικοποίηση της επίδρασης του ιού στην υγεία των ζώων και την παραγωγικότητα. Επιπλέον, πρέπει να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα των χρησιμοποιούμενων εμβολίων και να ληφθούν όλα τα απαραίτητα μέτρα βιοασφάλειας. Από πολλούς ερευνητές, έχει συσταθεί η αναγκαιότητα της εφαρμογής εθελοντικών προγραμμάτων εξάλειψης του BVDV, για να μειωθούν οι οικονομικές απώλειες και η μείωση της μετάδοσης του. Ένα επιτυχές μοντέλο για τον αποτελεσματικό έλεγχο του BVDV περιλαμβάνει μέτρα βιοασφάλειας, εξάλειψη του ιού, παρακολούθηση και ανοσοποίηση (Lindberg et al., 2005).

3.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Ο ιός BVDV υπάρχει και κυκλοφορεί στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής σε όλη σχεδόν την επικράτεια, ιδιαίτερα των περιοχών με ανεπτυγμένη την αγελαδοτροφία (Μακεδονία, Θράκη).
2. Το νόσημα έχει λάβει ενζωτικό χαρακτήρα στις εκτροφές απ' όπου συλλέχθηκαν τα δείγματα, συμπέρασμα που κατ' επέκταση πιθανό να ισχύει και για τις ευρύτερες περιοχές όπου διεξήχθη η έρευνα.

Στα παραπάνω φαίνεται να συμβάλλουν:

- Η άγνοια των παραγωγών για το νόσημα και τις επιπτώσεις του.
- Η μη λήψη μέτρων εκ μέρους των ενώσεων των παραγωγών για τον περιορισμό του νοσήματος.
- Η μη λήψη μέτρων εκ μέρους της πολιτείας για το νόσημα (εκρίζωσή του)
- Η μη σωστή αντιμετώπιση του νοσήματος εκ μέρους των κτηνιάτρων, που είναι υπεύθυνοι στις εκτροφές των αγελάδων.

Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα:

- Τους ελλειπείς εμβολιασμούς
- Το σπέρμα για τη τεχνητή σπερματέγχυση πιθανόν να μην είναι ελεγμένο, να μην προέρχεται δηλαδή αποκλειστικά από πιστοποιημένους οροαρνητικούς ταύρους, όπως ισχύει σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες.
- Να μην απομακρύνονται από τις εκτροφές οι κύριες αποθήκες του ιού που είναι τα επίμονα μολυσμένα ζώα.

3.6 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ – ΜΕΤΡΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΝΟΣΗΜΑΤΟΣ

1. Να εκπαιδευτούν (ή / και να εκπαιδεύονται δια βίου) οι παραγωγοί της χώρας για το νόσημα και γενικότερα για τα μέτρα πρόληψης και υγιεινής που πρέπει να λαμβάνονται στις εκτροφές τους.
2. Να ενημερωθούν οι ενώσεις παραγωγών βοοειδών για το νόσημα και τις επιπτώσεις του στη παραγωγή αλλά και για τις οικονομικές επιπτώσεις του εν γένει.
3. Να γίνει ενημέρωση των γαλακτοβιομηχανιών για το νόσημα και την επίπτωση του στην γαλακτοπαραγωγή.
4. Επιβάλλεται η χώρα μας να οργανώσει και να εφαρμόσει άμεσα στρατηγική για τη μείωση της μετάδοσης του BVDV και αν είναι δυνατόν να εφαρμόσει πρόγραμμα εκρίζωσης του νοσήματος.
5. Η βελτίωση των συνθηκών εκτροφής και τα μέτρα βιοασφάλειας στα οποία συμπεριλαμβάνονται και οι εμβολιασμοί, είναι τα πρώτα μέτρα που πρέπει να ληφθούν άμεσα σε επίπεδο εκτροφής, για την εκρίζωση του νοσήματος.
6. Σε επίπεδο κρατικής παρέμβασης, μια πρώτη προσέγγιση θα μπορούσε να γίνει με το μηνιαίο ορολογικό έλεγχο δειγμάτων από τις δεξαμενές γάλακτος της κάθε εκτροφής καθώς και με εξαμηνιαίους ορολογικούς ελέγχους των ζώων σε αγελαδοτροφικές εκμεταλλεύσεις αλλά και στις μονάδες εντατικής πάχυνσης μόσχων.
7. Να συσταθεί στους παραγωγούς η χρήση σπέρματος από πιστοποιημένα αρνητικούς ταύρους.
8. Η συνεχής και κατ' επανάληψη εγρήγορση των κτηνιάτρων στα δημόσια και ιδιωτικά κτηνιατρεία για σοβαρά λοιμώδη νοσήματα όπως η ΙΔΒ, με δημοσιεύσεις και ειδικά άρθρα, σε ειδικά συνέδρια, έντυπα, περιοδικά και ιστοσελίδες, επαγγελματικών επιστημονικών σωματείων.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

1. Adler H., Jungi TW., Pfister H., (1996). Cytokine regulation by virus infection: Bovine viral diarrhoea virus, a flavivirus, downregulates production of tumor necrosis factor α in macrophages, in vitro, *Journal of Virology*, 70: 2650 – 2653.
2. Adler B., Adler H., Pfister H., (1997). Macrophages infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus release a factor(s) capable of priming uninfected macrophages for activation – induced apoptosis., *Journal of Virology*, 71: 3255 – 3258.
3. Agnello V., Abel G., Elfahal M., (1999). Hepatitis C virus and flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor, *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 96: 12766-12771.
4. Al-Afaleq A., Hegazy AA., Abu Elzein E.M.E., Al-Bishr BA., (2006). Clinico-pathological Studies on Bovine Virus Diarrhoea (BVD) in Eastern Saudi Arabia, *Scientific Journal of King Faisal University*, Vol 7, No2.
5. Ames TR., (1986). The causative agent of BVD: Its epidemiology and pathogenesis, *Veterinary Medicine*, 81: 848 – 869.
6. Archambault D., Beliveau C., Couture Y., Carman S., (2000). Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus, *Veterinary Research*, 31: 215 – 227.
7. Baker JC., (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 11: 425 – 445.
8. Bartosch B., Cosset FL., (2006). Cell entry of hepatitis C, *Virology*, 348(1): 1-12.
9. Baszler TV., Evermann JF., Kaylor PS., (1995). Diagnosis of naturally occurring bovine viral diarrhoea virus infections in ruminants using monoclonal antibody-based immunohistochemistry, *Veterinary Pathology*, 32: 609 – 618.
10. Becher P., Orlich M., Shannon AP., (1997). Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants, *Journal of General Virology*, 78: 1357 – 1366.
11. Bielanski A., Hare WC., (1988). Effect in vitro of bovine viral diarrhoea virus on bovine embryos with the zona pellucida intact, damaged and removed, *Veterinary Research Communications*, 12: 19 – 24.
12. Bielanski A., Sapp T., Lutze-Wallace C., (1998). Association of bovine embryos produced by in vitro fertilization with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus type II, *Theriogenology*, 49: 1231 – 1238.
13. Bielefeldt-Ohmann H., Bloch H., (1982). Electron microscopic studies of bovine viral diarrhoea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures, *Archives of virology*, 71: 57 – 74.

14. Bielefeldt Ohmann H., (1984). An oculo-cerebellar syndrome caused by congenital bovine viral diarrhoea virus infection, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 25: 36 – 49.
15. Bielefeldt Ohmann H., (1998). BVD virus antigens in tissues of persistently viremic, clinically normal cattle: Implications for the pathogenesis of clinically fatal disease, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 29: 77 – 84.
16. Billinis C., Leontides L., Amiridis GS., Spyrou V., Kostoulas P., Sofia M., (2005). Prevalence of BVDV infection in Greek dairy herds, *Preventive Veterinary Medicine*, 72: 75 – 79.
17. Biuk-Rudan N., Cvetnik S., Madic J., Rudan D., (1999). Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders, *Theriogenology*, 51(5): 875 – 881.
18. Blowey RW., Weaver AD., (2003). Alimentary disorders. In: Color Atlas of Diseases and Disorders of cattle. 2nd ed. Eds. Blowey RW and Weaver AD pp 43 – 46, 123 – 124. Mosby-Elsevier Science, London.
19. Bolin SR., McClurkin AW., Cutlip RC., Coria MF., (1985). Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus, *American Journal of Veterinary Research*, 46: 573 – 576.
20. Bolin S.R., McClurkin A.W., Cutlip R.C., Coria M.F., (1985b). Response of cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus to vaccination for bovine viral diarrhoea and to subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhoea virus, *American Journal of Veterinary Research*, 46: 2467 – 2470.
21. Bolin SR., Ridpath JF., (1990). Range of neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines, *American Journal of Veterinary Research*, 51: 703 – 707.
22. Bolin SR., Littledike ET., Ridpath JF., (1991a). Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhoea viruses in a vaccinated herd, *American Journal of Veterinary Research*, 52: 1033 – 1037.
23. Bolin SR., Matthews PJ., Ridpath JF., (1991b). Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 3: 199 – 203.
24. Bolin SR., Ridpath JF., (1992). Differences in virulence between two noncytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses in calves, *American journal of Veterinary Research*, 53: 2175 – 2163.
25. Bolin SR., Ridpath JF., Black J., (1994). Surveys of cell lines in the American Type culture collection for bovine viral diarrhoea virus, *Journal of Virology Methods*, 48: 211 – 221.

26. Bolin SR., (1995a). Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 11: 615 – 625.
27. Bolin SR., (1995b). The pathogenesis of mucosal disease, *Vetererinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 11: 489 – 500.
28. Boulanger D., Waxweiler S., Karelle L., (1991). Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhea virus: evidence of neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum, *Journal of General Virology*, 72: 1195 – 1198.
29. Brock KV., Redman DR., Vickers ML., Irvine NE., (1991). Quantitation of bovine viral diarrhea virus in embryo transfer flush fluids collected from a persistently infected heifer, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 3: 99 – 100.
30. Brock KV., Grooms DL., Ridpath J., Bolin SR., (1998). Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1998; 10: 22-6.
31. Brock KV., Chase CC., (2000). Development of a fetal challenge method for the evaluation of bovine viral diarrhea virus vaccines, *Veterinary Microbiology*, 77: 209 – 214.
32. Brock KV., Cortese VS., (2001). Experimental fetal challenge using type II bovine viral diarrhea virus in cattle vaccinated with modified-live vaccine, *Veterinary Therapeutics*, 2: 354 – 360.
33. Brock K.V., (2004). The many faces of bovine viral diarrhea virus, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 20: 1 – 3, 76.
34. Brodersen BW., Kelling CL., (1998). Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhea virus infection on respiratory tract and enteric diseases in calves, *American Journal of Veterinary Research*, 59: 1423 – 1430.
35. Brodersen BW., Kelling Cl., (1999). Alteration of leukocyte populations in cattle concurrently infected with bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhea virus, *Viral Immunology*, 12: 323 – 334.
36. Brown TT., de Lahunta A., Scott FW., (1973). Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. II. Histopathology of cerebellar degeneration (hypoplasia) induced by the virus of bovine viral diarrhea – mucosal disease, *Cornell Veterinary*, 63: 561 – 578.
37. Brown TT., Bistner SI., de Lahunta A., (1975). Pathogenetic studies of infection of the bovine fetus with bovine viral diarrhea virus. II. Ocular lesions, *Veterinary Pathology*, 12: 394 – 404.
38. Brownlie J., Clarke MC., Howard CJ., (1984). Experimental production of fatal mucosal disease in cattle, *Veterinary Record*. 114: 535 – 536.

39. Brownlie J., Clarke MC., Howard CJ., Pocock DH., (1987). Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle, *Ann Rech Vet*, 18: 157 – 166.
40. Brownlie J., Clarke MC., Howard CJ., (1989). Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus, *Research in Veterinary Science*, 46: 307 – 311.
41. Brownlie J., Clarke MC., (1993). Experimental and spontaneous mucosal disease of cattle: A validation of Koch's postulates in the definition of pathogenesis, *Intervirology*, 114: 535 – 536.
42. Brownlie J., Clarke MC., Hooper LB., Bell GD., (1995). Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine, *Veterinary Record*, 137: 58 – 62.
43. Brownlie CJ., Haghparast A., Hoek A., (1998). Maternal recognition of foetal infection with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) – the Bovine Pestivirus, *Clinical and Diagnostic Virology*, 10: 141 – 150.
44. Brownlie J., Thompson I., Curwen A., (2000). Bovine virus diarrhoea virus – strategic decisions for diagnosis and control, *In Practice*, 176 – 187.
45. Brusckhe CJ., Weerdmeester K., Van Oirschot JT., Van Rijn PA., (1998a). Distribution of bovine viral diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection, *Veterinary Microbiology*, 64: 23 – 32.
46. Buckner R., (1997). Diabetes mellitus in a cow persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, *Tierarztl Prax.* 25: 351 – 352.
47. Callan RJ., Schnackel JA., Van Campen H., (2002). Percutaneous collection of fetal fluids for the detection of bovine viral diarrhoea virus infection in cattle, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220: 1348 – 1352.
48. Carman S., Van Dreumel T., Ridpath J., (1998). Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario 1993 – 1995, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10: 27 – 35.
49. Charleston B., Fray MD., Baigent S., Carr BV., Morrison WI., (2001). Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon, *Journal of General Virology*, 82: 1893 – 1897.
50. Charleston B., Hope JC., Carr BV., Howard CJ., (2001). Masking of two in vitro immunological assays for *Mycobacterium bovis* (BCG) in calves acutely infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus, *Veterinary Research*, 149: 481 – 484.
51. Charleston B., Brockenbury LS., Carr BV., (2002). Alpha/beta and gamma interferons are induced by infection with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in vivo, *Journal of Virology*, 76: 923 – 927.

52. Chase CC., Elmowalid G., Yousif AA., (2004). The immune response to bovine viral diarrhea virus: A constantly changing picture, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 20: 95 – 114.
53. Collen T., Douglas AJ., Paton DJ., (2000). Single amino acid differences are sufficient for CD4(+) T-cell recognition of a heterologous virus by cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus, *Virology*, 276: 70 – 82.
54. Collen T., Morrison WI., (2000). CD4(+) T-cell responses to bovine viral diarrhea virus in cattle, *Virus Research*, 67: 67 – 80.
55. Collen T., Carr V., Parsons K., Charleston B., Morrison WI., (2002). Analysis of the repertoire of cattle CD4(+) T cells reactive with bovine viral diarrhoea virus, *Veterinary Immunology Immunopathology*, 87: 235 – 238.
56. Corapi WV., Elliott RD., French TW., (1990). Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 196: 590 – 596.
57. Coria MF., McClurkin AW., (1978). Specific immune tolerance in a apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhea virus, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 172: 449 – 451.
58. Cortese VS., Gromms DL., Ellis J., (1998a). Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhea virus type I by use of a modified-live virus vaccine, *American Journal of Veterinary Research*, 59: 1409 – 1413.
59. Cortese VS., West KH., Hassard LE., Carman S., Ellis JA., (1998b). Clinical and immunologic responses of vaccinated and unvaccinated calves to infection with a virulent type-II isolate of bovine viral diarrhea virus, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 213: 1312 – 1319.
60. Couvreur B., Letellier C., Collard A., Quenon P., Dehan P., Hamers C., Pastoret PP., Kerkhofs P., (2002). Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates from Belgium, *Virus Research*, 85: 17 – 28.
61. Dimitrova E., Martinov S., (1999). Study in prevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) antibodies in 19 bulgarian dairy cattle and sheep herds with reproductive problems, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 13: 51 – 54.
62. Done JT., Terlecki S., Richardson C., (1980). Bovine virus diarrhea – mucosal disease virus: Pathogenicity for the fetal calf following maternal infection, *Veterinary Record*, 106: 473 – 479.
63. Donis RO., Dubovi EJ., (1987). Characterization of bovine viral diarrhea – mucosal disease virus – specific proteins in bovine cells, *Journal of General Virology*, 68: 1587 – 1605.

64. Dubovi EJ., (1994). Impact of bovine viral diarrhea virus on reproductive performance in cattle, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 10: 503 – 514.
65. Duffel SJ., Sharp MW., Winkler CE., (1984). Bovine virus diarrhea – mucosal disease virus – induced fetopathy in cattle: Efficacy of prophylactic maternal pre-exposure, *Veterinary Record*, 114: 558 – 561.
66. Duffel SJ., Harkness JW., (1985). Bovine virus diarrhoea – mucosal disease infection in cattle, *Veterinary Record*, 117: 240 – 245.
67. Durantel D., Branza-Nichita N., Carrouee-Durantel S., (2001). Study of the mechanism of antiviral action of imino sugar derivatives against bovine viral diarrhea virus, *Journal of virology*, 75: 8987 – 8998.
68. EDQM., (2001). In: Proceedings of a workshop on Pestivirus contamination of Bovine Sera and other Bovine Virus Contamination. Paris, France, 29-30 March 2001.
69. Elbers K., Tautz N., Becher P., (1996). Processing in the pestivirus E2-NS2 region: Identification of proteins p7 and E2p7, *Journal of Virology*, 70: 4131 – 4135.
70. Ellis JA., Donis WC., Belden EL., Pratt DL., (1988). Flow cytofluorimetric analysis of lymphocyte subset alterations in cattle infected with bovine viral diarrhea virus, *Veterinary pathology*, 25: 231 – 236.
71. Ellis JA., Martin K., Norman GR., Haines DM., (1995). Comparison of detection methods for bovine viral diarrhea virus in bovine abortions and neonatal death, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7: 433 – 436.
72. Ellis JA., West HK., Cortese VS., Myers SL., Suzanne C., Martin KM., Haines DM., (1998). Lesions and Distribution of Viral Antigen Following an Experimental Infection of Young Seronegative Calves with Virulent Bovine Virus Diarrhea Virus, Type II, *Canadian Journal of Veterinary Research*, 62: 161 – 169.
73. Ellis JA., West KH., Cortese VS., (1998). Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent bovine virus diarrhea virus – type II, *Canadian Journal of Veterinary Research*, 62: 161 – 169.
74. EU. Thematic network on control of bovine viral diarrhea virus (BVDV). Position paper (2001)
75. Evermann JF., Ridpath JF., (2002). Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhea virus in the northwestern United States, *Veterinary Microbiology*, 89: 129 – 139.
76. Falcone E., Tollis M., Conti G., (1999). Bovine viral diarrhea disease associated with a contaminated vaccine, *Vaccine*, 18: 387 – 388.

77. Ferrari G., Scicluma MT., Bonvicini D., Gobbi C., Della Verita F., Valentini A., Antorino GL., (1999). Bovine virus diarrhoea (BVDV) control programme in an area in the Rome province (Italy), *Veterinary Microbiology*, 64: 237 – 45.
78. Flores EF., Krentz LC., Donis RO., (1996). Swine and ruminant pestiviruses require the same cellular factor to enter bovine cells, *Journal of general virology*, 77: 1295-1303.
79. Flores EF., Ridpath JF., Weiblen R., Vogel FS., Gil LH., (2002). Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2, *Virus Research*, 87: 51 – 60.
80. Fons A., Munksgaard L., (2008). Automatic blood sampling in dairy cows, *Computers and Electronics in Agriculture*, 64: 27 – 33.
81. Fray MD., Paton DJ., Alenius S., (2000). The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control, *Animal Reproduction Science*, 60-61: 615 – 627.
82. Fray MD., Mann GE., Clarke MC., Charleston B., (2000a). Bovine viral diarrhoea virus: Its effects on ovarian function in the cow, *Veterinary Microbiology*, 77: 185 – 194.
83. Fray MD., Supple EA., Morrison WI., Charleston B., (2000b). Germinal central localization of bovine viral diarrhoea virus in persistently infected animals, *Journal of General Virology*, 81: 1669 – 1673.
84. Fray MD., Mann GE., Bleach EC., (2002). Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus, *Reproduction*, 123: 281 – 289.
85. Frediksen B., Press CM., Sandvik T., (1999a). Detection of viral antigen in placenta and fetus of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus, *Veterinary Pathology*, 36: 267 – 275.
86. Fricke J., Gunn M., Meyers G., (2001). A family of closely related bovine viral diarrhoea virus recombinants identified in an animal suffering from mucosal disease: New insights into the development of a lethal disease in cattle, *Virology*, 291: 77 – 90.
87. Friedrich A., Carlin A., Assad A., Sauter-Louis C., Rademacher G., Wolfgang K. (2010). Bovine Neonatal Pancytopenia, *In: Proceedings: BVD and IBR control, Prague, 31 May-1 June 2010, pp 24.*
88. Fritzmeier J., Greiser-Wilke I., Haas L., (1995). Experimentally induced ‘late onset’ mucosal disease-characterization of the cytopathogenic viruses isolated, *Veterinary Microbiology*, 46: 285 – 294.
89. Fritzmeier J., Haas L., Liebler E., (1998). The development of early vs late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms, *Archives of Virology*, 142: 1335 – 1350.

90. Fulton RW., Saliki JT., Burge LJ., (1997). Neutralizing antibodies to type 1 and 2 bovine viral diarrhoea viruses: Detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 4: 380 – 383.
91. Fulton RW., Purdy CW., Coufer AW., (2000). Bovine viral diarrhoea virus infections in feeder calves with respiratory disease: Interactions with *Pasteurella* spp., Parainfluenza-3 virus and bovine respiratory syncytial virus, *Canadian Journal of Veterinary Research*, 64: 151 – 159.
92. Fulton RW, Ridpath JF., Saliki JT., (2002). Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: Predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease, *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66: 181 – 190.
93. Fulton RW., Ridpath JF., Saliki JT., (2002). Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) 1b: Predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease, *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66: 181 -190.
94. Fulton RW., Step DL., Ridpath JF., (2003). Response of calves persistently infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subtype 1b after vaccination with heterologous BVDV strains in modified live virus vaccines and Mannheimia haemolytica bacterin toxoid, *Vaccine*, 21: 2980 – 2985.
95. Gaede W., Gehrman B., Korber R., (2003). Elimination of persistently BVDV infected animals: efficient herd screening using RT-PCR and antigen ELISA, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 116: 234 – 239.
96. Giangaspero M., Vacirca G., Morgan D., Baboo KS., Luo A., DuPont HL., Zumla A., (1993). Anti-bovine viral diarrhoea virus antibodies in adult Zambian patients infected with the human immunodeficiency virus, *International Journal of STD & AIDS*, 4: 300 – 302.
97. Gillespie JH., Baker JA., (1960). A cytopathic strain of virus diarrhoea virus, *Cornell Veterinary*, 50: 73 – 79.
98. Givens MD., Galik PK., Ridell KP., (2000). Replication and persistence of different strains of bovine viral diarrhoea virus in an in vitro embryo production system, *Theriogenology*, 54: 1093 – 1107.
99. Givens MD., Ridell KP., Galik PK., (2002). Diagnostic dilemma encountered when detecting bovine viral diarrhoea virus in IVF embryo production, *Theriogenology*, 58: 1399 – 1407.
100. Givens MD., Heath AM., Brock KV., (2003). Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls (*American Journal of Veterinary Research*, 64: 428 – 434.
101. Glew EJ., Howard CJ., (2001). Antigen-presenting cells from calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, a member of the Flaviviridae, are not

- compromised in their ability to present viral antigen, *Journal of General Virology*, 82: 1677 – 1685.
102. Glew EJ., Carr BV., Brackenbury LS., (2003). Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells, *Journal of General Virology*, 84: 1771 – 1870.
 103. Gong Y., Shannon A., Westaway EG., Gowans EJ., (1998). The replicative intermediate molecule of bovine viral diarrhea virus contains multiple nascent strands, *Archives of virology*, 143: 399-404.
 104. Graham DA., McLarren IF., Brittain D., O'Reilly PJ., (2001). Genetic typing of ruminant pestivirus strains from Northern Ireland and the Republic of Ireland, *Research in Veterinary Science*, 71: 127 – 134.
 105. Graham DA., Clavert V., Mooney J., Crawford J., Clery D., (2004). Birth of a persistently infected calves into two herds using inactivated BVDV vaccines. Un: Second European Symposium on: BVDV control, Edited by P.S. Valle. C. Fourichon, A. Pereira & J.N. Ribeiro. Porto, Portugal: Paulo Costa, 87 pp.
 106. Grahn TC., Fahning ML., Zemjanis R., (1984). Nature of early reproductive failure caused by bovine viral diarrhea virus, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185: 429 – 432.
 107. Grassmann CW., Isken O., Behrens SE., (1999). Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhea virus during RNA replication: An in vivo and in vitro study, *Journal of Virology*, 73: 9196 – 9205.
 108. Gray EW., Nettleton PF., (1987). The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses, *Journal of general virology*, 68: 2339 – 2346.
 109. Greig A., Gibson I.R., Nettleton P.F., Herring J.A., (1981). Disease outbreak in calves caused by a mixed infection with infectious bovine rhinotracheitis virus and bovine virus diarrhoea virus, *Veterinary Record*, 108: 480.
 110. Greiser-Wilke I., Dittmar KE., Liess B., Moennig V., (1992). Heterogeneous expression of nonstructural protein p80/p125 in cells infected with different pestiviruses, *Journal of General Virology*, 73: 47 – 52.
 111. Greiser-Wilke I., Hass L., Dittmar K., (1993). RNA insertions and gene duplications in the nonstructural protein p125 region of pestivirus strains and isolates *in vitro* and *in vivo*, *Virology*, 193: 977 – 981.
 112. Grondahl C., Uttenthal A., Houe H., Rasmussen TB., Hoyer MJ., Larsen LE., (2003). Characterisation of a pestivirus isolated from persistently infected mousedeer (*Tragulus javanicus*), *Archives of Virology*, 148: 1455 – 1463.
 113. Grooms DL., Ward LA., Brock KV., (1996). Morphologic changes and immunohistochemical detection of viral antigen in ovaries from cattle persistently

- infected with bovine viral diarrhoea virus, *American Journal of Veterinary Research*, 57: 830 – 833.
114. Grooms DL., Brock KV., Pate JL., Day ML., (1998a). Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhoea virus, *Theriogenology*, 49: 595 – 605.
115. Grooms DL., Brock KV., Ward LA., (1998b). Detection of cytopathic bovine viral diarrhoea in the ovaries of cattle following immunization with a modified live bovine viral diarrhoea vaccine, *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 10: 130 – 134.
116. Grooms DL., Brock KV., Ward LA., (1998c). Detection of bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10: 125 – 129.
117. Grooms D., Baker JC., Ames TR., (2002). Diseases caused by bovine virus diarrhoea virus. In: *Large Animal Internal Medicine*, 3rd ed. Ed. Smith BP, pp 707 – 714. Mosby, St Louis, MO.
118. Grooms DL., Keilen ED., (2002). Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9: 898 – 900.
119. Grooms DL., (2004). Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 20: 5-19.
120. Grubb P., (2005). Order Artiodactyla. In : Wilson DE and Reeder DM (eds), *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*, Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press, pp 637 – 722.
121. Grummer B., Beer M., Liebler-Tenorio E., Greiser-Wilke I., (2001). Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus, *Journal of general virology*, 82: 2597 – 2605.
122. Gu B., Liu C., Lin-Goerke J., (2000). The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhoea virus NS3 protein are essential for viral replication, *Journal of Virology*, 74: 1794 – 1800.
123. Guercio A., Masoero L., Nava D., Purpani G., De Marco L., Cozzolino L., Caligori V., Di Bella C., Vitale N., (2004). Prevalence and risk factor of BVDV in 3 Italian regions, *Proceedings of the 2nd European Symposium on BVDV control*, Oporto, Portugal, 20-22 October 2004, 70pp.
124. Gunn HM., (1993). Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus, *Veterinary Research*, 132: 584 – 585.
125. Hafez SM., Liess B., (1972b). Studies on bovine viral diarrhoea – mucosal disease virus. II. Stability and some physico-chemical properties, *Acta Virologica*, 16: 399 – 408.

126. Haines DM., Clark EG., Dubovi EJ., (1992). Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, *Veterinary Pathology*, 29: 27 – 32.
127. Haines DM., Ellis JA., (1994). Special tests for the diagnosis of infectious causes of reproductive failure in ruminants, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 10: 561 – 585.
128. Haines DM., Martin KM., Clark EG., (2001). The immunohistochemical detection of *Mycoplasma bovis* and bovine viral diarrhoea virus in tissues of feedlot cattle with chronic, unresponsive respiratory disease and / or arthritis, *Canadian Veterinary Journal*, 42: 857 – 860.
129. Harada T., Tautz N., Thiel HJ., (2000). E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: Processing and functional studies, *Journal of Virology*, 74: 9498 – 9506.
130. Harkness JW., Wood L., Drew T., (1984). Mucosal disease in cattle, *Veterinary Record*, 115: 283.
131. Harkness JW., (1987). The control of bovine viral diarrhoea virus infection, *Ann Rech Vet*, 18: 167 – 174.
132. Harkness JW., Roeder PL., Drew T., (1987). The efficacy of an inactivated experimental BVD-BD vaccine. In: *Pestivirus Infection of Ruminants* Ed. JW Harkness. Brussels, Commission of the European Communities pp 233 – 251.
133. Heinz FX., Collett MS., Purcell RH., (2000). Genus pestivirus. In: *Virus Taxonomy*. Eds. Van Regenmortel MHV., Fauquet CM., Bishop DHL., et al., pp. 867 – 872. Academic Press. New York.
134. Hewicker-Trautwein M., Liess B., Trautwein G., (1995). Brain lesions in calves following transplacental infection with bovine virus diarrhoea virus, *Zentralbl Veterinarmed*, 42: 65 – 77.
135. Hofmann MA., Brechtbuhl K., Stauber N., (1994). Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region, *Archives of Virology*, 139: 217 – 229.
136. Horasawa R., (1996). Phylogenetic analysis of pestivirus based on the 5' untranslated region, *Acta Virologica*, 40: 49 – 54.
137. Houe H., and Meyling A., (1991). Surveillance of cattle herds for bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infection using data on reproduction and calf mortality, *Archives of Virology*, 3: 154 – 164.
138. Houe H., Heron I., (1993). Immune response to other agents of calves persistently infected with bovine virus diarrhoea virus (BVDV), *Acta Veterinaria Scandinavica*, 34: 305 – 310.

139. Houe H., (1995). Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 11: 521 – 548.
140. Houe H., Baker JC., Maes RK., et al., (1995). Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in 20 dairy herds in two countries in central Michigan and comparison of prevalence of antibody – positive cattle among herds with different infection and vaccination status, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7: 321 – 326.
141. Houe H., (1999). Epidemiological factors and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections, *Veterinary Microbiology*, 64: 80 – 107.
142. Houe H., (2003). Economic impact of BVDV infection in dairies, *Biologicals*, 31: 137 – 143.
143. Houe H., (2005). Risk assessment, *In Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control*. Edited by Goyal SM and Ridpath JF. Blackwell Publishing Professional Iowa 35 – 63 pp.
144. Houe H., Lindberg A., Moennig V., (2006). Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18: 427 – 436.
145. Howard CJ., Brownlie J., Clarke MC., (1987). Comparison by the neutralisation assay of pairs of noncytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease, *Veterinary Microbiology*, 13: 361- 369.
146. Howard CJ., Clarke MC., Sapp P., Brownlie J., (1992). Immunity to bovine virus diarrhoea virus in calves: The role of different T-cell subpopulations analyzed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies, *Veterinary Immunology Immunopathology*, 32: 303 – 314.
147. Hulst MM., Moorman RJM., (2001). Erns protein of pestiviruses, *Methods in enzymology*, 342:431-440.
148. Iqbal M., Flick – Smith H., McCauley JW., (2000). Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans, *Journal of general virology*, 81: 451-459.
149. Jackova A., Novackova M., Pelletier C., Auderal C., Gueneau E., Haffar A., Petit E., Rehby L., Vilcek S., (2008). The extended diversity of BVDV-1 : Typing of BVDV-1 isolates from France, *Veterinary Research Communications*, 32: 7 – 11.
150. Joly A., Fourichon C., Beaudeau F., (2005). Description and first results of a BVDV control scheme in Brittany (western France), *Preventive Veterinary Medicine*, 72: 209 – 13; discussion 215 – 9.
151. Kafi M., McGowan MR., Kirkland PD., (2002). In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes and in vitro culture of presumptive zygotes in the presence of bovine pestivirus, *Animal Reproduction Science*, 71: 169 – 179.

152. Kahrs RF., (2001). Bovine viral diarrhoea. In: *Viral Diseases of Cattle*. 2nd edition ed. Kahrs RF pp 113 - 126. Iowa State University Press, Ames, IA.
153. Kelling CL., Grotelueschen DM., Smith DR., Brodersen BW., (2000). Testing and management strategies for effective beef and dairy herd BVDV biosecurity programs, *Bovine Practice*, 34: 13 – 22.
154. Kelling CL., Steffen DJ., Cooper VL., (2002a). Effect of infection with bovine viral diarrhoea virus alone, bovine rotavirus alone, or concurrent infection with both on enteric disease in gnotobiotic neonatal calves, *American Journal of Veterinary Research*, 63: 1179 – 1186.
155. Kelling CL., (2004). Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 20: 115 – 129.
156. Kirkbride CA, (1992). Viral agents and associated lesions detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4: 374 – 379.
157. Kirkland PD., Richards SG., Rothwell JT., Stanley DF., (1991). Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections, *Veterinary Record*, 128: 587 – 590.
158. Kirkland PD., McGowan MR., Mackintosh SG., (1993). Determinants of persistent infection of cattle with pestivirus, *Proceedings of the 2nd Symposium of Pestiviruses*. ed. Edwards S. Foundation Marcel Merieux, Lyon, pp. 117 – 121.
159. Kirkland PD., Mackintosh SG., Moyle A., (1994). The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus, *Veterinary Record*, 135: 527 – 529.
160. Lai VC., Kao CC., Ferrari E., (1999). Mutational analysis of bovine viral diarrhoea virus RNA-dependent RNA polymerase, *Journal of Virology*, 73: 10129 – 10136.
161. Lambot M., Donart A., Joris E., (1997). Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus, *Journal of General Virology*, 78: 1041 – 1047.
162. Lamontagne L., Lafortune P., Fournel M., (1989). Modulation of the cellular immune responses to T-cell-dependent and T-cell-independent antigens in lambs with induced bovine viral diarrhoea virus infection, *American Journal of Veterinary Research*, 50: 1604 – 1608.
163. Lang-Ree JR., Vatn T., Kommisrud E., Loken T., (1994). Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination, *Veterinary Research*, 135: 412 – 413.
164. Levings RL., Wessman SJ., (1991). Bovine viral diarrhoea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines, *Developments in Biological Standardization*, 75: 177 – 181.

165. Li Y., McNally J., (2001). Characterization of RNA synthesis and translation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV), *Virus genes*, 23: 149-155.
166. Liang D., Sainz IF., Ansari IH., (2003). The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses, *Journal of general virology*, 84: 1269 – 1274.
167. Liebler EM., Waschbuesch J., Pohlenz JF., (1991). Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease, *Archives of Virology, Supplement*, 7: 295 – 301.
168. Liebler-Tenorio EM., Lauwehr A., Greiser-Wilke I., (2000). Comparative investigation of tissue alterations and distribution of BVD – viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease, *Veterinary Microbiology*, 15: 163 – 174.
169. Liebler-Tenorio EM., Ridpath JF., Neill JD., (2002). Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection with highly virulent bovine viral diarrhoea virus type 2 in calves, *American Journal of Veterinary Research*, 63: 1575 – 1584.
170. Liebler-Tenorio EM., Ridpath JF., Neill JD., (2003). Lesions and tissue distribution of viral antigen in severe acute versus subclinical acute infection with BVDV2, *Biologicals*, 31: 119 – 122.
171. Liebler-Tenorio EM., Ridpath JF., Neill JD., (2003a). Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15: 221 – 232.
172. Liess B., Orban S., Frey HR., Trautwein G., (1987). Consequences of the transplacental transmission of BVDV virus to cattle fetuses, *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 94: 585 – 587.
173. Lihong Liu, Hongyan Xia, Niklas Wahlberg, Sandor Belak, Claudia Baule, (2009). Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses, *Virology*, 385: 351 – 357.
174. Lindberg A., (1996). Regionalised eradication of bovine viral diarrhoea virus in Sweden – an approach complementary to the current control scheme. In: *Society of Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine: Conference Proceedings, 27 – 29 March 1996, Glasgow, Scotland*, pp 146 – 156.
175. Lindberg A. and Alenius S., (1999). Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle population, *Veterinary Microbiology*, 64: 197 – 222.

176. Lindberg A., Houe H., (2005). Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in relevance to control, *Preventive Veterinary Medicine*, 72: 55 – 73; discussion 215-9.
177. Lindberg A., Ortman K., Alenius S., (2000). Seroconversion to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy heifers after embryo transfer. In: Proceeding of the 14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, Sweden, 2-6 July 2000, p. 250.
178. Lindenbach B., Rice C., (2001). Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Field's Virology, 4th edition. Eds Knipe DM., Howley PM., Griffin DE., pp. 991 – 1042. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
179. Liu L., Lehmkuhl HD., Kaeberle LM., (1999). Synergistic effects of bovine respiratory syncytial virus and noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus infection on selected bovine alveolar macrophage functions, *Canadian Journal of Veterinary Research*, 63: 41 – 48.
180. Loehr BI., Frey HR., Moennig V., Greiser-Wilke I., (1998). Experimental induction of mucosal disease: Consequences of superinfection of persistently infected cattle with different strains of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus, *Archives of Virology*, 143: 667 – 679.
181. Lohmann V., Korner F., Bartenshlager R., (1997). Biochemical properties of hepatitis C virus NS5A RNA-dependent RNA polymerase and identification amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity, *Journal of Virology*, 71: 8416 – 8428.
182. Loken T., Krogsrud J., Bjerkas I., (1991). Pestivirus infection in Norway. Serological investigations in cattle, sheep and pigs, *Acta Vet Scandinavia*, 32: 27 – 34.
183. Ludwig J.A., and Reynolds J.F., 1998. Statistical ecology: a primer on methods and computing. J. Wiley and sons: New York, p 223 -242.
184. Luzzago C., Frigerio M., Zeconi A., (2004). BVD control program in Lecco and Como provinces (Italy): herd risk categories to modulate interventions. Proceedings of the 2nd European Symposium on BVDV control, Oporto, Portugal, 20-22 October 2004.
185. Mahony TJ., McCarthy FM., Gravel JL., Corney B., Young PL., Vilcek S., (2005). Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia, *Veterinary Microbiology*, 106: 1 – 6.
186. Marshall DJ., Moxley RA., Kelling CL., (1996). Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus, *Veterinary Pathology*, 33: 311 – 318.

187. McClurkin AW., Littledike EJ., Cutlip RC., (1984). Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus, *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 48: 156 – 161.
188. McGowan MR., Kirkland PD., Richards SG., Littlejohns IR., (1993). Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination, *Veterinary Record*, 133: 39 – 43.
189. McGowan MR., Kafi M., Kirkland PD., (2003). Studies on the pathogenesis of bovine pestivirus – induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle, *Theriogenology*, 59: 1051 – 1066.
190. Meehan JT., Lehmkuhl HD., Cutlip RC., (1998). Acute pulmonary lesions in sheep experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus, *Journal of comparative pathology*, 119: 277 – 292.
191. Meier N., Meier B., Banzhaf J., (2003). Antibody titer against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in bulk milk samples from Bavaria, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 116: 240 – 243.
192. Miekka SI., Busby TF., Reid B., (1998). New methods for inactivation of lipid-enveloped and non-enveloped viruses, *Haemophilia*, 4: 402 – 408.
193. Meyling A., Ronsholt L., Dalsgaard K., Jensen AM., (1987). Experimental exposure of vaccinated and non-vaccinated pregnant cattle to isolates of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). In: Pestivirus Infection of Ruminants Ed. JW Harkness. Brussels, Commission of the European Communities pp 225 – 232.
194. Meyling A., Jensen AM., (1988). Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently infected bull, *Veterinary Microbiology*, 17: 97 – 105.
195. Mickelsen WD., Everman JF., (1994). *In utero* infections responsible for abortion, stillbirth, and birth of weak calves in beef cows, *Veterinary Clinics of North American Food Animal Science*, 10: 1-14.
196. Mills JHL., Luginbuhl RE., (1968). Distribution and persistence of mucosal disease virus in experimentally exposed cattle, *American Journal of Veterinary Research*, 29: 1367 – 1375.
197. Moen A., Sol J., Sampimon O., (2005). Indication of transmission of BVDV in the absence of persistently infected (PI) animals, *Preventive Veterinary Medicine*.
198. Moennig V. et al., (1990). Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro, *Veterinary Record*, 127(8): 200 – 3.
199. Moennig V., Greiser-Wilke I., Frey HR., (1993). Prolonged persistence of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus (BVD) in a persistently viremic cattle, *Zentralbl Vet Med B.*, AO: 371 – 377.

200. Moennig V., Liess B., (1995). Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 11: 477 – 487.
201. Moennig V., Houe H., Lindberg A., (2005a). BVD control in Europe: current status and perspectives, *Animal Health Research Reviews*, 6: 63 – 74.
202. Moennig V., Eicken K., Flebbe U., Frey HR., Grummer B., Haas L., Greiser-Wilke I., Liess B., (2005b). Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD), *Preventive Veterinary Medicine*.
203. Moennig V. and Grummer B., (2010). Key elements of the BVD control program in Germany, *In: Proceedings: BVD and IBR control, Prague, 31 May-1 June 2010*, pp 27.
204. Moerman A., Straver PJ., de Jong MCM., (1994). Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea in a dairy herd, *Veterinary Q*, 16: 115 – 119.
205. Munoz-Zanzi CA., Hietala SK., Thurmond MC., Johnson WO., (2003). Quantification, risk factors and health impact of natural congenital infection with bovine viral diarrhoea virus in dairy calves, *American Journal of Veterinary Research*, 64: 358 – 365.
206. Murondoti A., van der Kolk JH., van der Linde-Sipman JS., (1999). Type 1 diabetes mellitus in a pregnant heifer persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, *Veterinary Record*, 144: 268 – 269.
207. Murray RD., (1991). Lesions in aborted bovine fetuses and placenta associated with bovine viral diarrhoea virus infection, *Archives Of Virology, Supplement*, 3: 217 – 224.
208. Nagai M., Ito T., Sugita S., Genno A., Takeuchi K., Ozawa T., Sakoda Y., Nishimori T., Takamura K., Akashi H., (2001). Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhoea virus in Japan, *Archives of Virology*, 146: 685 – 696.
209. Nagai M., Hayashi M., Itou M., Fukutomi T., Akashi H., Kida H., Sakoda Y., (2008). Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 isolates in Japan, *Virus Genes*, 36: 135 – 139.
210. Neill JD., Ridpath JF., (2003a). Gene expression changes in BVDV2 – infected MDBK cells, *Biologicals*, 31: 97-102.
211. Neill JD., Ridpath JF., (2003b). Gene expression changes in MDBK cells infected with genotype 2 bovine viral diarrhoea virus, *Veterinary Microbiology*, 96: 301-312.
212. Nettleton PF., (1990). Pestivirus infections in ruminants other than cattle, *Revue Scientifique et Technique O.I.E*, 9 : 131 – 150.
213. Niskanen R., Alenius S., Larsson B., Jacobsson S-O., (1991). Determination of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk as a toll in the

- diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds, *Archives of Virology, Supplement*, 3: 245 – 251.
214. Niskanen R., Lindberg A., Larsson B., Alenius S., (2000). Lack of virus transmission from bovine viral diarrhoea virus infected calves to susceptible peers, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 41: 93 – 99.
215. Niskanen R., Lindberg A., Larsson B., Alenius S., (2002). Failure to spread bovine viral diarrhoea virus infection from primarily infected calves despite concurrent infection with bovine coronavirus, *Veterinary Journal*, 163: 251 – 9.
216. Niskanen R., Alenius S., Belak K., (2002a). Insemination of susceptible heifers with semen from a non-viraemic bull with persistent bovine virus diarrhoea virus infection localized in the testes, *Reproduction of Domestic Animals*, 37: 171 – 175.
217. Niskanen R. and Lindberg A., (2003). Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air and from contaminated pens, *Veterinary Journal*, 165: 125 – 130.
218. Njaa BL., Clark EG., Jansen E., (2000). Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12: 393 – 399.
219. Nuttall PA., (1980). Growth characteristics of two strains of bovine virus diarrhoea virus, *Archives of virology*, 66: 365 – 369.
220. O'Rourke K., (2002). BVDV: 40 years of effort and the disease still has a firm hold, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220: 1770 – 1773.
221. Odeon AC., Kelling CL., Marshall DJ., (1999). Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus genotype II (NY-93), *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11: 221 – 228.
222. Olafson P., McCallum AD., Fox FH., (1946). An apparently new transmissible disease of cattle, *Cornell Veterinary*, 36: 205 – 213.
223. Palfi V., Houe H., Philipsen J., (1993). Studies on the decline of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV persistently infected calves, *Acta Vet Scand*, 34(1): 105 – 107.
224. Pellerin C., van den Hurk J., Lecomte J., Tijssen P., (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities, *Virology*, 203: 260 – 268.
225. Peterhans E., Jungi TW., Schweizer M., (2002). BVD virus and innate immunity, *Biologicals*, 31: 107 – 112.
226. Petrovic T., Molnar T., Milosevic B., Kurcubic V., Petrovic MM., Bojanic M., Lazic S., Duricic B., (2004). Some examinations of prevalence of BVDV infection in Serbia and Montenegro, Proceedings of the 2nd European Symposium on BVDV control, Oporto, Portugal, 20-22 October 2004, 72pp.

227. Plowright W., (1969). Joint Campaign Against Rinderpest. First Technical Review Meeting, Phase IV, Mogadiscio, Kenya.
228. Potgieter LND., (1995). Immunology of Bovine Viral Diarrhea Virus, *Veterinary Clinics of North America Food Animal practice*, 11: 501 – 520.
229. Potgieter LND., (1997). Bovine respiratory tract disease caused by bovine viral diarrhea virus, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 13: 471 – 481.
230. Potter ML., Corstvet RE., Looney CR., (1984). Evaluation of bovine viral diarrhea virus uptake by preimplantation embryos, *American Journal of Veterinary Research*, 45: 1778 – 1780.
231. Potts BJ., Sawyer M., Shekarchi IC., (1989). Peroxidase-labeled primary antibody method for detection of pestivirus contamination in cell cultures, *Journal of Virology Methods*, 26: 119 – 124.
232. Preuss T., Kamstrup S., Kyvsgaard N., (1997). Comparison of two different methods for inactivation of viruses in semen, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 4: 504 – 508.
233. Quaife T., (1996). Improper vaccination compounds BVD problem, *Dairy Herd Management*, 33: 12 – 16.
234. Radostits OM., Littlejohns IR., (1988). New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhea virus, *Canadian Veterinary Journal.*, 29: 513 – 528.
235. Radostits OM., Gay CC., Hinchcliff KW., Constable PD., (2007). *Veterinary Medicine: A textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats* (10th ed.). Saunders Elsevier, Saint Louis, USA, p. 2156.
236. Ramsey FK., Chivers WH., (1953). Mucosal disease of cattle, *N Am Vet*, 34: 629 – 633.
237. Rebhun WC., French TW., Perdrizet JA., (1989). Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 3: 42 – 46.
238. Renshaw RW., Ray R., Dubovi EJ., (2000). Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhea virus in bulk milk tank samples, *Journal of Diagnostic Investigation*, 12: 184 – 186.
239. Rhodes SG., Cocksedge JM., Collins RA., Morrison WI., (1999). Differential cytokine responses of CD4+ and CD8+ T-cells in response to bovine viral diarrhea virus in cattle, *Journal of General virology*, 80: 1673 – 1679.

240. Richer L., Marois P., (1988). Association of bovine viral diarrhea virus with multiple viral infections in bovine respiratory disease outbreaks, *Canadian Veterinary Journal.*, 29: 713 – 717.
241. Ridpath JF., Bolin SR., Dubovi EJ., (1994). Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes, *Virology*, 205: 66 – 74.
242. Ridpath JF., Bolin SR., Berry EJ., (1994b). Natural recombination in bovine viral diarrhea viruses, *Archives of Virology, Supplement*, 9: 239 – 244.
243. Ridpath JF., Bolin SR., (1995). Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 BVDV, *Virology*, 212: 259 – 262.
244. Ridpath JF., Bolin SR., (1997). Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses, *Virus Research*, 50: 237 – 243.
245. Ridpath JF., Neill JD., Frey M., Landgraf JG., (2000). Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America, *Veterinary Microbiology*, 77: 145 – 155.
246. Ridpath JF., Hietala SK., Sorden S., Neill JD., (2002). Evaluation of the reverse transcription – polymerase chain reaction / probe test of serum samples and immunohistochemistry of skin sections for detection of acute bovine viral diarrhea infections, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14: 303 – 307.
247. Ridpath JF., (2003). BVDV genotypes and biotypes: Practical implications for diagnosis and control, *Biologicals*, 31: 127 – 131.
248. Ridpath JF., Neill JD., Endsley J., Roth JA., (2003). Effect of passive immunity on the development of a protective immune response against bovine viral diarrhea virus in calves, *American Journal of Veterinary Research*, 64: 65 – 69.
249. Rikula U., Nuotio L., Aaltanen T., Ruoho O., (2005). Bovine viral diarrhoea virus control in Finland, 1998 – 2004, *Preventive Veterinary Medicine*.
250. Roeder PL., Jeffrey M., Cranwell MP., (1986). Pestivirus fetopathogenicity in cattle: changing sequale with fetal maturation, *Veterinary Record*, 118: 44 – 48.
251. Rogan W.J., Gladen B., (1978). Estimating prevalence from the results of a screening test, *American Journal of Epidemiology*, 107: 71 – 76.
252. Ross CE., Dubovi EJ., Donis RO., (1986). Herd problem of abortions and malformed calves attributed to bovine viral diarrhea, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 188: 618 – 619.
253. Rossi CR., Kiesel GK., (1971). Microtiter tests for detecting antibody serum for parainfluenza 3 virus, infectious bovine rhinotracheitis virus, and bovine viral diarrhea virus, *Applied Microbiology*, 22: 32 – 36.

254. Rossi CR., Bridgman CR., Kiesel GK., (1980). Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum, *American Journal of Veterinary Research*, 41: 1680 – 1681.
255. Roth JA., Kaerberle LM., Griffith RW., (1981). Effects of bovine viral diarrhea virus infection on bovine polymorphonuclear leukocyte function, *American Journal of Veterinary Research*, 42: 244 – 250.
256. Roth JA., Kaerberle LM., (1983). Suppression of neutrophil and lymphocyte function induced by a vaccinal strain of bovine viral diarrhea virus with and without the administration of ACTH, *American Journal of Veterinary Research*, 44: 2366 – 2372.
257. Roth JA., Bolin SR., Frank DE., (1986). Lymphocyte blastogenesis and neutrophil function in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus, *American Journal of Veterinary Research*, 47: 1139 – 1141.
258. Rufenacht J., Schaller P., Audige L., (2001). The effect of infection with bovine viral diarrhea virus on the fertility of Swiss dairy cattle, *Theriogenology*, 56: 199 – 210.
259. Saino H., Watanabe H., Ikehata T., (1994). Immuno-peroxidase procedures for rapid detection of bovine viral diarrhea – mucosal disease virus antigen, *Journal of Veterinary Medical Science*, 56: 805 – 807.
260. Saliki JT., Huchzermeier R., Dubovi EJ., (2000). Evaluation of a new sandwich ELISA kit that uses serum for detection of cattle persistently infected with BVD virus, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916: 358 – 363.
261. Saliki JT., Dubovi EJ., (2004). Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 20(1): 69 – 83.
262. Sanderson MW., Gnad DP., (2002). Biosecurity for reproductive diseases, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 18: 79 – 98.
263. Sandvik T., Krogsrud J., (1995). Evaluation of an antigen capture ELISA for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle blood samples, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7: 65 – 71.
264. Sandvik T., (1999). Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle, *Veterinary Microbiology*, 64: 123 – 134.
265. Sandvik T., Drew TW., Bensaude E., (2000). Acute BVD in calves-effect of viral dose and immunosuppression on clinical signs of disease, transmission to susceptible animals and virus persistence in tissues, *Proceedings of European Society of Veterinary Virology, Brescia*, pp. 401 – 402.
266. Schelp C., Greiser – Wilke., Wolf G., (1995). Identification of cell membrane proteins linked to susceptibility to bovine viral diarrhea virus infection, *Archives of virology*, 140: 1997-2009.

267. Schelp C., Greiser – Wilke I., Moennig V., (2000). An actin – binding protein is involved in pestivirus entry into bovine cells, *Virus research*, 68:1-5.
268. Schrijver RS., Kramps JA., (1998). Critical factors affecting the diagnostic reliability of enzyme-linked immunosorbent assay formats, *Rev Sci Tech*, 17: 550 – 561.
269. Sentsui H., Takami R., Nishimori T., (1998). Antiviral effect of interferon- α on bovine viral diarrhoea virus, *Journal of Veterinary Medical Science*, 60: 1329 – 1333.
270. Sopp P., Hooper LB., Clarke MC., (1994). Detection of bovine viral diarrhoea virus p80 protein in subpopulations of bovine leukocytes, *Journal of general virology*, 75: 1189 – 1194.
271. Spagnuolo-Weaver M., Allan GM., Kennedy S., (1997). Distribution of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus antigens in tissues of calves following acute experimental infection, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9: 287 – 297.
272. Stoffregen B., Bolin SR., Ridpath JF., Pohlenz J., (2000). Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV-1373 recovered from a field case, *Veterinary Microbiology*, 77: 157 – 162.
273. Sullivan DG., Shang GJ., Akkina RK., (1997). Genetic characterization of ruminant pestiviruses: Sequence analysis of viral genotypes isolated from sheep, *Virus Research*, 47: 19 – 29.
274. Sun J-H., Kao CC., (1997). Characterization of RNA products associated with or aborted by a viral RNA-dependent RNA polymerase, *Virology*, 236: 348 – 353.
275. Synge BA., Clark AM., Moar JAE., Nicolson JT., Nettleton PF., Herring JA., (1999). The control of bovine virus diarrhoea virus in Shetland, *Veterinary Microbiology*, 64: 223 – 229.
276. Tajima M., Frey HR., Yamato O., Maede Y., Moennig V., Scholz H., Greiser-Wilke I., (2001). Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany, *Virus Research*, 76: 31 – 42.
277. Tan TM., Karaoglu TM., Erol N., Yildirim Y., (2006). Serological and Virological Investigations of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Infection in Dairy Cattle in Aydin Province, *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*, 30: 299 – 304.
278. Taniyama H., Ushiki T., Tajima M., (1995). Spontaneous diabetes mellitus associated with persistent bovine viral diarrhoea (BVD) virus infection in young cattle, *Veterinary Pathology*, 32: 221 – 229.
279. Tautz N., Elbers K., Stoll D., (1997). Serine protease of pestiviruses: Determination of cleavage sites, *Journal of Virology*, 71: 5415 – 5422.

280. Thibanlt JC., Crevat D., Chappuis G., (1993). Control of bovine virus diarrhea – mucosal disease in cattle : examples of the combined use of serological screening, viral antigen detection and vaccination, *Revue Scientifique et Technique*, 12: 471 – 481.
281. Thoen CO., Waite KJ., (1990). Some immune responses in cattle exposed to Mycobacterium paratuberculosis after injection with modified-live bovine viral diarrhea virus vaccine, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2: 176 – 179.
282. Thur B., Zlinszky K., Ehrensperger F., (1996). Immunohistology as a reliable and efficient method for the diagnosis of BVDV infections, *Schweiz Arch Tierheilkd*, 138: 476 – 482.
283. Traven M., Alenius S., Fossum C., Larsson B., (1991). Primary bovine viral diarrhea virus infection in calves following direct contact with a persistently viremic calf, *Journal of Veterinary Medicine B*, 38: 453 – 462.
284. Turin L., Russo S., Poli G., (1999). BHV-1: New molecular approaches to control a common and widespread infection, *Molecular Medicine*, 5: 261 – 284.
285. Van Campen H., Ridpath J., Williams E., Cavender J., Edwards J., Smith S., Sawyer H., (2001). Isolation of bovine viral diarrhea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming, *Journal of Wildlife Diseases*, 37: 306 – 311.
286. Van Oirschot JT., Brusckhe CJ., Van Rijn PA., (1999). Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea, *Veterinary Microbiology*, 64: 169 – 183.
287. Vannier P., Vedeau F., Allemeersch C., (1997). Eradication and control programmes against Aujeszky's disease (pseudorabies) in France, *Veterinary Microbiology*, 55: 167 – 173.
288. Vanroose G., Nauwynck H., Van Soom A., (1998). Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus in zona-free and zona-intact in vitro produced bovine embryos and the effect on embryo quality, *Biology of Reproduction*, 58: 857 – 866.
289. Viet AF., Fourichon C., Seegers H., (2005). Assessment of strategies to control BVDV spread in a dairy herd using computer simulation, *Preventive Veterinary Medicine*, 72: 99 – 102.
290. Vilcek S., Drew TW., McGoldrick A., Paton DJ., (1999). Genetic typing of bovine pestiviruses from England and Wales, *Veterinary Microbiology*, 69: 227 – 237.
291. Vilcek S., Paton DJ., Durkovic B., (2001a). Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups, *Archives of Virology*, 146: 99 – 115.
292. Vilcek S., Durkovic B., Kolesarova M., Greiser-Wilke I., Paton D., (2004). Genetic diversity of international bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group, *Veterinary Research*, 35: 609 – 615.

293. Viltrop A., Alaots J., Parn M., Must K., (2002). Natural changes in the spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) among Estonian cattle, *Journal of Veterinary Medicine Series B – Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 49: 263 – 269.
294. Voges H., Horner GW., Rowe S., Wellenberg GJ., (1998). Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent non-viraemic bull, *Veterinary Microbiology*, 61: 165 – 175.
295. Walz PH., Steficek BA., Baker JC., Kaiser L., Bell TG., (1999). Effects of experimentally induced bovine viral diarrhea virus infection on platelet function in calves, *American Journal of Veterinary Research*, 60: 1396 – 1401.
296. Walz PH., Bell TG., Wells JL., (2001). Relationship between degree of viremia and disease manifestation in calves with experimentally induced bovine viral diarrhea virus infection, *American Journal of Veterinary Research*, 62: 1095 – 1103.
297. Warrilow D., Lott WB., Greive S., (2000). Properties of the bovine diarrhoea virus replicase in extracts of infected MDBK cells, *Archives of virology*, 145: 2163 – 2171.
298. Weiland E., Stark R., Haas B., (1990). Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer, *Journal of Virology*, 64: 3563 – 3569.
299. Wentink GH., van Exsel AC., de Goey I., van Lieshont JA., (1991). Spread of bovine virus diarrhoea virus in a herd of heifer calves, *Vet Q*, 13: 233 – 236.
300. Werdin RE., Ames TR., Goyal SM., DeVries GR., (1989a). Diagnostic investigation of bovine viral diarrhea infection in a Minnesota dairy herd, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1: 57 – 61.
301. Wessman SJ., Levings RL., (1999). Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production, *Developments in Biological Standardization*, 99: 3 – 8.
302. Wilhelmsen CL., Bolin SR., Ridpath JF., (1990). Experimental primary postnatal bovine viral diarrhea viral infections in six-month-old calves, *Veterinary Pathology*, 27: 235 – 243.
303. Windisch JM., Schneider R., Stark R., (1996). RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies, *Journal of Virology*, 70: 352 – 358.
304. Wittum TE., Grotelueschen DM., Brock KV., (2001). Persistent bovine viral diarrhea virus infection in US beef herds, *Preventive Veterinary Medicine*, 49: 83 – 94.
305. Woods RD., Kunkle RA., Ridpath JF., Bolin SR., (1999). Bovine viral diarrhea virus isolated from fetal calf serum enhances pathogenicity of attenuated transmissible gastroenteritis virus in neonatal pigs, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11: 400 – 407.

306. Xue W., Zhang S., Minocha HC., (1997). Characterization of a putative receptor protein for bovine viral diarrhoea virus, *Veterinary microbiology*, 51: 105-118.
307. Yu H., Isken O., Grassmann CW., Behrens S-E., (2000). A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhoea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA, *Journal of virology*, 74: 5825 – 5835.
308. Zabal O., Kobrak AL., Lager IA., (2000). Contamination of bovine fetal serum with bovine viral diarrhoea virus, *Rev Argent Microbiol*, 32: 27 – 32.
309. Zhang G., Flick-Smith H., McCauley JW., (2003). Differences in membrane association and sub-cellular distribution between NS2-3 and NS3 of bovine viral diarrhoea virus, *Virus research*, 97: 89 -102.
310. Zitzmann N., Mehta AS., Carrouee S., (1999). Imino sugars inhibit the formation and secretion of bovine viral diarrhoea virus, a pestivirus model of hepatitis C: implications for development of broad-spectrum anti-hepatitis virus agents, *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 96: 11878 – 11882.
311. Καρλής Δημήτρης (2005). Πολυμεταβλητή Στατιστική Ανάλυση. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης.
312. Μπάτζιου Ρόιδω (2010). Ορολογική διερεύνηση του Βόειου Ερπητοϊού 1 (BHV-1) σε εκτροφές αγελάδων γαλακτοπαραγωγής. Μεταπτυχιακή μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
313. Ξυλούρη-Φραγκιαδάκη Ε., Αντωνάκος Γ., Νοικοκύρης ΠΝ. Διαχείριση υγείας σε εκτροφή βοοειδών οροθετικών στη Λοιμώδη Ρινοτραχειίτιδα και τη Νόσο των Βλεννογόνων. 16^ο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Καλαμάτα, 17-19/10/2000.
314. Παπαδόπουλος Ορέστης (1998). Ιογενής Διάρροια – Νόσος των Βλεννογόνων (BVD – MD). ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΖΩΩΝ. Α.Π.Θ. Υπηρεσία δημοσιευμάτων.
315. Τσότσος Αθανάσιος (1992). Ιατρική Ιολογία (Γενική – Κλινική – Εργαστηριακή). Αθήνα. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.

