

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ  
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ  
ΤΟΥ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ  
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΧΟΙΡΟΥ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΕ  
ΕΚΤΡΟΦΗ ΜΕ ΣΥΜΒΑΤΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ**

*Κυριακίδου Ε. Νικολέττα*

**Συμβουλευτική Επιτροπή:**

**Ξυλούρη Ε. Αν. Καθηγήτρια, Εισηγήτρια**

**Χαδιώ Σ. Αν. Καθηγήτρια**

**Τριανταφυλλόπουλος Κ. Λέκτορας**

**Αθήνα, Μάιος 2011**



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ  
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ  
ΤΟΥ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ  
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΧΟΙΡΟΥ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΕ  
ΕΚΤΡΟΦΗ ΜΕ ΣΥΜΒΑΤΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ**

*Κυριακίδου Ε. Νικολέττα*

**Συμβουλευτική Επιτροπή:**

**Ξυλούρη Ε. Αν. Καθηγήτρια, Εισηγήτρια**

**Χαδιώ Σ. Αν. Καθηγήτρια**

**Τριανταφυλλόπουλος Κ. Λέκτορας**

**Αθήνα, Μάιος 2011**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εισηγήτρια, Δρ. Ξυλούρη Ε., Αν. Καθηγήτρια, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για την πολύτιμη στήριξη που μου παρείχε σε κάθε στάδιο της μελέτης, χωρίς την οποία θα ήταν αδύνατη η πραγματοποίηση της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής Δρ. Χαδιώ Σ., Αν. Καθηγήτρια και Δρ. Τριανταφυλλόπουλο Κ., Λέκτορα, για την ουσιαστική καθοδήγηση και τα πολύτιμα τους σχόλια.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον Δρ. Οικονομόπουλο Ι., Επ. Καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών του Γ.Π.Α και την Δρ. Γαζούλη Μ., Λέκτορα της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, για την βοήθεια που μου παρείχαν.

Παράλληλα ευχαριστίες εκφράζονται σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων και ιδιαίτερα στον κ. Βαγγελή Θ.

Νιώθω επιπλέον, την αμέριστη ανάγκη και χαρά να ευχαριστήσω τους φίλους και συναδέλφους κτηνιάτρους Δρ. Ντάφη Β., Δρ. Λιανδρή Ε. και κα. Μπουντούρη Μ., που μοιράστηκαν μαζί μου την αγωνία μου αλλά βοήθησαν και ουσιαστικά στην πραγματοποίηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Ευχαριστίες εκφράζονται επίσης στις φίλες κ. Ανδρεάδου Μ. και κ. Τάκα Σ., υποψήφιας διδάκτορες του Γ.Π.Α., για τη συμβολή τους στην εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Τέλος, τις βαθύτερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στην οικογένεια μου, που όλα αυτά τα χρόνια είναι δίπλα μου και με στηρίζουν.

*Στον πατέρα μου Μανώλη και στη μητέρα μου Όλγα, που μου δίνουν απλόχερα  
την αγάπη τους για να μπορώ να πραγματοποιώ τα όνειρα μου...*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>A/A</b>	<b>Τίτλος</b>	<b>Σελίδα</b>
<b>A</b>	Περίληψη	<b>1</b>
<b>B</b>	Abstract	<b>3</b>
<b>Γ</b>	Βιβλιογραφική ανασκόπηση	<b>5</b>
<b>1.1</b>	Ιός του ΣΑΑΣΧ	<b>6</b>
<b>1.1.1</b>	Ταξινόμηση	<b>6</b>
<b>1.2</b>	Μέγεθος και μορφολογία του ιού	<b>7</b>
<b>1.3</b>	Φυσικοχημικές ιδιότητες	<b>8</b>
<b>1.4</b>	Το γονιδίωμα και οι πρωτεΐνες του ιού	<b>9</b>
<b>1.5</b>	Πολλαπλασιασμός-αντιτύπωση ιού	<b>12</b>
<b>1.6</b>	Καλλιέργεια του ιού <i>in vitro</i>	<b>15</b>
<b>1.7</b>	Γενετική ποικιλομορφία και εξέλιξη	<b>16</b>
<b>1.2</b>	Προσβολή του χοίρου από τον ιό του ΣΑΑΣ	<b>18</b>
<b>1.2.1</b>	Ιστορική αναδρομή	<b>18</b>
<b>1.2.2</b>	Παθογένεια	<b>20</b>
<b>1.2.3</b>	Μηχανισμοί παθογένειας	<b>24</b>
<b>1.2.4</b>	Ανοσιακή απάντηση κατά του ιού του ΣΑΑΣΧ	<b>24</b>
<b>1.2.5</b>	Κλινικά συμπτώματα του ΣΑΑΣΧ	<b>27</b>
<b>1.2.6</b>	Παθολογοανατομικά ευρήματα	<b>30</b>
<b>1.2.7</b>	Δευτερογενείς επιπλοκές	<b>32</b>
<b>1.2.8</b>	Επιζωοτιολογία του νοσήματος	<b>32</b>
<b>1.2.8.1</b>	Γεωγραφική κατανομή του ιού	<b>32</b>

1.2.8.2	Μετάδοση και διασπορά	35
1.2.9	Διάγνωση	36
1.3	Πρόληψη και έλεγχος	40
1.3.1	Εμβόλια	40
1.3.2	Μέτρα βιοασφάλειας	45
B	Πειραματικό Μέρος	48
1	Σκοπός	49
2	Υλικά και μέθοδοι	49
2.1	Ιστορικό εκτροφής	49
2.2	Στοιχεία των ζώων	50
2.3	Δειγματοληψία	51
2.4	Εκχύλιση ιικού RNA από το σίελο, τα όργανα και τον ορό αίματος	51
2.5	Εκκινητές	52
2.6	Αντίστροφη μεταγραφή – Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τα στελέχη του ιού του ΣΑΑΣΧ	54
2.7	Αντίστροφη μεταγραφή - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση του ιού του ΣΑΑΣΧ	56
2.8	Ηλεκτροφόρηση των πηκτών αγαρόζης	57
2.9	Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων	58
2.9.1	Απομόνωση των προϊόντων των RT-PCRs	58
2.9.2	Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων των προϊόντων ενίσχυσης των RT-PCRs	58
2.10	Κλωνοποίηση προϊόντος PCR σε πλασμίδιο	58



<b>3</b>	<b>Αποτελέσματα</b>	<b>59</b>
<b>3.1</b>	<b>Παθολογοανατομικά ευρήματα</b>	<b>59</b>
<b>3.2</b>	<b>Ανίχνευση του ιού του ΣΑΑΣΧ με RT-PCRs</b>	<b>61</b>
<b>3.3</b>	<b>Ανίχνευση του ιού του ΣΑΑΣΧ με real time (RT-) PCRs</b>	<b>63</b>
<b>3.4</b>	<b>Σύγκριση RT-PCRs με τις αντίστοιχες real time (RT-) PCRs</b>	<b>64</b>
<b>3.5</b>	<b>Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων</b>	<b>65</b>
<b>3.6</b>	<b>Κλωνοποίηση προϊόντος PCR σε πλασμίδιο</b>	<b>65</b>
<b>4</b>	<b>Συζήτηση</b>	<b>66</b>
<b>Δ</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>72</b>
<b>Ε</b>	<b>Παράρτημα</b>	<b>88</b>



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<b>ΣΑΑΣΧ</b>	Σύνδρομο του Αναπαραγωγικού και Αναπνευστικού Συστήματος του Χοίρου
<b>PRRS</b>	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome
<b>EAV (Equine Arteritis Virus)</b>	Λοιμώδης Αρτηρίτιδα των Ιπποειδών
<b>LDV (Lactate Dehydrogenase–Elevating Virus)</b>	Γαλακτική Δεϋδρογονάση των Ποντικών
<b>SHFV (Simian Hemorrhagic Fever Virus)</b>	Αιμορραγικός Πυρετός των Πιθήκων
<b>ORF (Open Reading Frame)</b>	Ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο
<b>nsp (non structural proteins)</b>	μη δομικές πρωτεΐνες
<b>IFN</b>	Ιντερφερόνες
<b>PAMs (porcine alveolar macrophages)</b>	Χοίρεια κυψελιδικά μακροφάγα
<b>IL-4</b>	ιντερλευκίνη-4
<b>LV (Lelystad virus)</b>	Ιός του Lelystad
<b>NK (natural killer cells)</b>	Φυσικά φονικά κύτταρα
<b>TNFα (Tumor Necrosis Factor)</b>	Παράγοντας νέκρωσης του όγκου-α
<b>ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)</b>	Δοκιμή ELISA
<b>PCR (Polymerase Chain Reaction)</b>	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>RT (Reverse Transcription)</b>	Αντίστροφη μεταγραφή
<b>real time (RT-) PCR</b>	Αντίστροφη μεταγραφή - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου
<b>IPMA (indirect immunoperoxidase monolayer assay)</b>	Ανοσοπεροξειδάση μονής στιβάδας
<b>IFA (indirect immuno-fluorescence assay)</b>	Έμμεσος ανοσοφθορισμός
<b>SN (seroneutralization)</b>	Οροεξουδετέρωση

# ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΤΟΥ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΧΟΙΡΟΥ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΕ ΕΚΤΡΟΦΗ ΜΕ ΣΥΜΒΑΤΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

*Κυριακίδου Ε. Νικολέττα*

*Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών*

*Εργαστήριο Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων*

*Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα, [email: efxil@aua.gr](mailto:efxil@aua.gr)*

## **A. Περίληψη**

Το Σύνδρομο του Αναπαραγωγικού και Αναπνευστικού Συστήματος του Χοίρου, ΣΑΑΣΧ (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*, PRRS) είναι ένα ιογενές νόσημα με παγκόσμια εξάπλωση. Σήμερα, 20 χρόνια μετά την απομόνωση του υπεύθυνου ιού, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα νοσήματα προκαλώντας τεράστιες οικονομικές απώλειες στην παγκόσμια χοιροτροφία. Χαρακτηρίζεται από διαταραχές στον αναπαραγωγικό πληθυσμό και αναπνευστικά προβλήματα στους αναπτυσσόμενους και παχυνόμενους χοίρους. Η σοβαρότητα της λοίμωξης από τον ιό ποικίλλει, από παντελή έλλειψη κλινικών συμπτωμάτων έως απότομα ξεσπάσματα προβλημάτων στην αναπαραγωγή και στο αναπνευστικό σύστημα. Αποτέλεσμα της έντονης γενετικής ποικιλομορφίας που χαρακτηρίζει τον εν λόγω ιό, ήταν η εμφάνιση δύο ξεχωριστών τύπων, του τύπου I ή ευρωπαϊκού γονότυπου και του τύπου II ή αμερικάνικου γονότυπου του ιού.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της παρουσίας του ιού του ΣΑΑΣΧ με μοριακές τεχνικές σε εκτροφή με συμβατή κλινική εικόνα και ο μοριακός χαρακτηρισμός του. Για τον σκοπό αυτό διενεργήθηκε δειγματοληψία σιέλου από σύες και οργάνων και ορών από αποβληθέντα και θνησιγενή χοιρίδια, από τον Ιανουάριο έως τον Νοέμβριο του 2010. Η εξέταση των δειγμάτων έγινε με χρήση των μεθόδων RT-PCR σε ένα βήμα, δύο βήματα και real time (RT-) PCR, με στόχο την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό του ιού. Με χρήση RT-PCR σε δύο βήματα, βρέθηκαν θετικά τα 55 από τα 95 δείγματα οργάνων και ορών των χοιριδίων (57,8%) και με την real time (RT-) PCR

τα 57 από τα 95 (60%). Τα δείγματα σιέλου από τις σύες δεν ήταν θετικά σε καμία από τις δύο τεχνικές, ενώ κανένα δείγμα από σύες και χοιρίδια δεν βρέθηκε θετικό με την RT-PCR σε ένα βήμα. Τα προς αλληλούχηση δείγματα ενίσχυσαν μικτό πληθυσμό και γι' αυτό έλαβε χώρα κλωνοποίηση των δειγμάτων με τους εκκινητές της RT-PCR δύο βημάτων. Μετά τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της μίας αποικίας που είχε ενσωματώσει το ένθεμα (προϊόν PCR), αυτή χαρακτηρίστηκε ως ανθρώπινο DNA. Παράλληλα, με τα δείγματα των ζώων έγινε και εξέταση δειγμάτων ανθρώπινου αίματος με τη real-time PCR και διαπιστώθηκε ότι εκτός από το τμήμα του ιικού RNA, ενισχύεται και τμήμα ανθρώπινου DNA. Από την παρούσα έρευνα, είναι γεγονός ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις μοριακές τεχνικές, πολλαπλασιάζουν ανθρώπινο DNA. Όμως, δίνουν και ένα ακόμη προϊόν PCR, παρόμοιου μεγέθους, που είναι σχεδόν αδύνατο να διαφοροποιηθεί οπτικά. Το δεύτερο αυτό προϊόν της PCR πιθανόν να προέρχεται από την ενίσχυση τμήματος του γονιδιώματος του ιού του ΣΑΑΣΧ, που με την RT-PCR έχει μέγεθος 637 ζεύγη βάσεων νουκλεοτιδίων, ενώ με την real time (RT-) PCR, 116 ζεύγη βάσεων. Συνοψίζοντας, διαπιστώθηκε ότι δημοσιευμένα και ευρέως χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα, είναι δυνατό να οδηγήσουν σε διαγνωστικά λάθη, μέσω ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, δίνοντας τη δυνατότητα περαιτέρω έρευνας σχετικά με την εφαρμογή μοριακών τεχνικών για την ανίχνευση του ιού του ΣΑΑΣΧ.

# MOLECULAR DETECTION OF THE PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS IN A FARM WITH TYPICAL CLINICAL SYMPTOMS

*Κοριακίδου Ε. Νικολέττα*

*Faculty of Animal Science and Aquaculture*

*Department of Anatomy and Physiology of Farm Animals*

*Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 118 55, Athens, [email: efxil@aua.gr](mailto:efxil@aua.gr)*

## **B. Abstract**

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS, is a viral disease with global distribution. Today, 20 years after the detection of the responsible virus, this viral disease is one of the major diseases causing enormous economic losses in the global pig industry. This disease is mainly characterized by disturbances in the breeding population and respiratory problems in the growing and fattening pigs. The severity of infection varies from complete absence of clinical symptoms to sudden outbreaks of reproductive and respiratory problems. Due to the genetic variability, PRRS virus (PRRSV) is classified in two distinct types, Type I or European Type and Type II or American Type. The purpose of the present study was to identify the PRRSV with molecular techniques in a livestock with clinical symptoms and to characterize the circulating strains. Sample's collection took place between January of 2010 and November of 2010, for saliva from sows and organs and sera from aborted and stillborn piglets. One step RT-PCR, two steps RT-PCR and real time (RT-) PCR were used for PRRSV detection and characterization. From 95 samples of organs and serum of piglets, 55 were found positive (57.8%) using a 2 step RT-PCR and 57 (60.0%) using real time (RT-) PCR. Saliva samples from sows were negative by both techniques, while none of the samples from sows and pigs were positive using one step RT-PCR. A mixed population was detected by a genetic analyzer (sequencing) in the samples and a cloning step was introduced for these samples by using the primers of the two step RT-PCR. After sequencing of the single colony that had incorporated the insert (PCR product), the sequence found was characterized as human DNA. In

addition, samples of human blood were also examined with real-time PCR and found that human DNA can be amplified. In the present study we have shown that the PCR primers amplify human DNA and another product of similar size that is difficult to discriminate between them visually. The second PCR product might have been derived from the virus genome and has a size of 637 bp by RT-PCR and 116 bp by real-time (RT-) PCR, respectively. Finally, we found that published and widely used protocols sometimes could lead to diagnostic errors and this study offers the opportunity to a further investigation and more accurate detection of PRRS virus by molecular techniques.

**ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ**  
**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ**



# 1. ΙΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΤΟΥ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΧΟΙΡΟΥ (ΣΑΑΣΧ)

## 1.1 Ταξινόμηση

Ο ιός του Συνδρόμου του Αναπαραγωγικού και Αναπνευστικού Συστήματος του Χοίρου (ΣΑΑΣΧ) (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS*) ανήκει στην τάξη *Nidovirales*, στην οικογένεια *Arteriviridae* και στο γένος *Arterivirus* (Cavanagh, 1997). Στην ίδια τάξη ανήκουν και οι οικογένειες *Coronaviridae* και *Roniviridae* (de Vries et al., 1997).

Στην οικογένεια *Arteriviridae*, η οποία καθιερώθηκε το 1996, ανήκει εκτός από τον ιό του ΣΑΑΣΧ, ο ιός της Λοιμώδους Αρτηρίτιδας των Ιπποειδών (*Equine Arteritis Virus, EAV*), ο ιός της Γαλακτικής Δεϋδρογονάσης των Ποντικών (*Lactate Dehydrogenase–Elevating Virus, LDV*) και ο ιός του Αιμορραγικού Πυρετού των Πιθήκων (*Simian Hemorrhagic Fever Virus, SHFV*) (Benfield et al., 1992, Meulenberg et al., 1993, Zimmerman et al., 2006). Η ομαδοποίηση των τεσσάρων, αταξινόμητων μέχρι τότε, ιών σε μία οικογένεια ήταν αποτέλεσμα της ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδιώματος τους στα μέσα της δεκαετίας του 1990, που οδήγησε στην κατανόηση των μοριακών ιδιοτήτων και του κύκλου πολλαπλασιασμού των *Arteriviruses*. Όλα τα μέλη της οικογένειας *Arteriviridae* χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να προκαλούν ασυμπτωματική λοίμωξη ή συχνά θανατηφόρο νόσο, επίμονη ιαιμία, να πολλαπλασιάζονται σε μακροφάγα, καθώς επίσης και να παρουσιάζουν γονιδιακή ποικιλομορφία (Cho and Dee, 2006).

Μια σειρά μελετών έδειξε ότι υπάρχει σχέση μεταξύ των οικογενειών *Arteriviridae* και *Coronaviridae* σε επίπεδο έκφρασης και οργάνωσης του γονιδιώματος. Τα γονίδια της πολυμεράσης των δύο ομάδων ιών έχουν κοινή γενεαλογική καταγωγή, παρόλες τις διαφορές στη δομή των ιικών σωματιδίων και του μεγέθους του γονιδιώματος. Όμως, η κοινή στρατηγική έκφρασης του γονιδιώματος που βασίζεται στη δημιουργία τμηματικής παραγωγής υπογονιδιωματικών mRNAs, αποτέλεσε τη βάση για το όνομα της τάξης *Nidovirales*, στην οποία ανήκουν οι δύο οικογένειες.

Ο ιός του ΣΑΑΣΧ πρωτοεκδηλώθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1980 προκαλώντας τεράστιες επιζωοτίες μίας ασθένειας, που μέχρι τότε ήταν άγνωστη στη Β.

Αμερική και στην Ευρώπη (Wensvoort et al., 1991). Ο μοριακός χαρακτηρισμός των στελεχών του ιού του ΣΑΑΣΧ στις δύο ηπείρους έδειξε μεγάλες γενετικές διαφορές, καταδεικνύοντας ότι οι δύο γονότυποι του ιού εξελίχθηκαν χωριστά (Allende et al., 1999, Meulenberg et al., 1993).

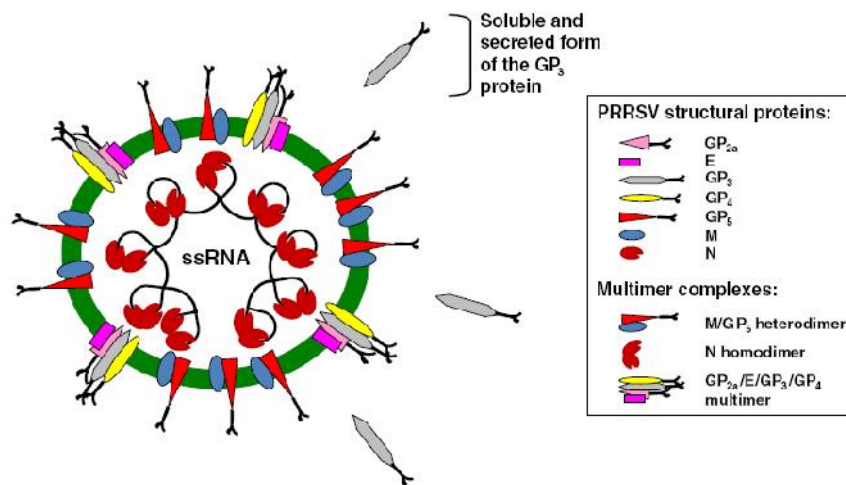
Ο φυσικός ξενιστής του ιού του ΣΑΑΣΧ είναι οι χοίροι. Έχει όμως παρατηρηθεί ότι κοτόπουλα και πάπιες Mallard που είχαν εκτεθεί στον ιό, τον απέβαλλαν με τα περιττώματά τους, δείχνοντας την ευπάθειά τους στον ιό (Zimmerman et al., 1997).

## 1.2 Μέγεθος και μορφολογία του ιού

Τα σωματίδια του ιού του ΣΑΑΣΧ είναι σφαιρικά, με διάμετρο που κυμαίνεται από 50 nm έως 65 nm (Benfield et al., 1992) και φέρουν μία σχεδόν λεία επιφάνεια που στερείται μεγάλων προεξοχών (Snijder and Meulenberg, 1998). Τα ιικά σωματίδια αποτελούνται από το νουκλεοκαψίδιο και το περίβλημα (φάκελο). Το νουκλεοκαψίδιο είναι εικοσαεδρικής συμμετρίας με διάμετρο 25 με 35 nm περίπου και περιβάλλεται από λιπιδικό φάκελο που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες του περιβλήματος (Zimmerman et al., 2006). Το νουκλεοκαψίδιο απαρτίζεται από το γονιδιακό RNA και την πρωτεΐνη N. Εξωτερικά του πυρήνα παρατηρείται το λιποπρωτεϊνικό περίβλημα, που αποτελείται από τις δύο κύριες πρωτεΐνες του φακέλου, τις M και GP<sub>5</sub>. Στο ιικό σωματίδιο οι πρωτεΐνες M και GP<sub>5</sub> βρίσκονται με την μορφή ετεροδιμερών με δισουλφιδικούς δεσμούς και είναι απαραίτητες για την μολυσματικότητα του ιού (Mardassi et al., 1996, Delputte et al., 2002). Εκτός από τις προαναφερθείσες κύριες πρωτεΐνες του φακέλου, υπάρχουν και οι δευτερεύουσες, οι GP<sub>2a</sub>, E, GP<sub>3</sub> και GP<sub>4</sub>. Οι δομικές αυτές πρωτεΐνες είναι συγχωνευμένες στα ιικά σωματίδια ως πολυμερή συμπλέγματα (Wissink et al., 2005) (Εικόνα 1).

Πρόσφατα, περιγράφηκε η δομή του ιικού σωματιδίου του ΣΑΑΣΧ με βάση την κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπική ανάλυση και τομογραφική αναδόμησή του στην κτυταρική σειρά MARC-145. Αναφέρθηκε ότι η μορφολογία του ιού είναι πλειομορφική, με ένα σφαιρικό προς οβάλ σχήμα μεγέθους 50-65 nm, έναν κοίλο πυρήνα (καψίδιο) διαμέτρου 40 nm και μία λεία εξωτερική επιφάνεια με τις πρωτεΐνες του φακέλου. Η

παραπάνω ανάλυση της δομής δείχνει ότι ο πυρήνας του ιού αποτελείται από ελικοειδές νουκλεοκαψίδιο βυθισμένο σε κοίλο βαθούλωμα (Spilman et al., 2009), σε αντίθεση προς τις προηγούμενες μελέτες (Benefield et al., 1992). Τα αποτελέσματα αυτά δεν προκαλούν έκπληξη, αφού και άλλα μέλη της τάξης *Nidovirales* όπως οι κοροναϊοί (*Coronavirus*) φέρουν ελικοειδές νουκλεοκαψίδιο.



**Εικόνα 1.** Σχηματική απεικόνιση της μορφολογίας του ιού του ΣΑΑΣΧ. Διακρίνονται οι κύριες δομικές πρωτεΐνες του ιού M και GP<sub>5</sub>, καθώς και η πρωτεΐνη N του νουκλεοκαψιδίου του ιού. Επίσης διακρίνονται οι δευτερεύουσες πρωτεΐνες GP<sub>2</sub>, E, GP<sub>3</sub> και GP<sub>4</sub> (Music and Gagnon, 2010).

### 1.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Αφού ο ιός του ΣΑΑΣΧ ανήκει στους ιούς που φέρουν περίβλημα, η επιβίωσή του έξω από τον ξενιστή επηρεάζεται σημαντικά από την θερμοκρασία, το pH και την

έκθεση του σε απολυμαντικά. Ο ιός του ΣΑΑΣΧ είναι σταθερός για μεγάλο χρονικό διάστημα (μήνες έως και χρόνια) σε θερμοκρασία  $-70^{\circ}\text{C}$  έως  $-20^{\circ}\text{C}$ . Η μολυσματικότητα του ιού μπορεί να μειωθεί έως και 90% σε θερμοκρασία  $+4^{\circ}\text{C}$  για μία εβδομάδα, αλλά χαμηλότεροι τίτλοι του ιού μπορούν να ανιχνευθούν για τουλάχιστον 30 ημέρες. Η μολυσματικότητα του ιού διατηρείται για 1-6 ημέρες σε θερμοκρασία  $+20$  έως  $+21^{\circ}\text{C}$ , 3-24 ώρες σε  $+37^{\circ}\text{C}$  και 6-20 λεπτά σε θερμοκρασία  $+56^{\circ}\text{C}$ . Ο ιός απομονώθηκε από ορό αίματος μολυσμένων ζώων σε ποσοστό 85% των δειγμάτων, όταν είχε αποθηκευτεί στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 72 ώρες, μετά την αρχική μόλυνση (Van Alstine et al., 1993).

Ο ιός του ΣΑΑΣΧ είναι σταθερός σε pH 6,5-7,5, αλλά η μολυσματικότητα του μειώνεται σε pH μικρότερο του 6 και μεγαλύτερο του 7,5 (Benefield et al., 1992). Επιπλέον, η υψηλή σχετική υγρασία ευνοεί τη μολυσματικότητα του ιού. Τα απολυμαντικά μειώνουν την μολυσματικότητα του ιού και οι λιποδιαλυτικές ουσίες, όπως το χλωροφόρμιο, είναι ιδιαίτερος αποτελεσματικές στην απότομη ρήξη του ιικού φακέλου και στην εξάλειψη των μολυσματικών σωματιδίων του (Benefield et al., 1992).

#### 1.4 Το γονιδίωμα και οι πρωτεΐνες του ιού

Το γονιδίωμα του ιού του ΣΑΑΣΧ είναι παρόμοιο στην οργάνωση σε σχέση με εκείνο των άλλων *Arteriviruses* και *Coronaviruses* (Meulenberg et al., 1993a, b). Τα σωματίδια του ιού φέρουν ένα ευθύγραμμο, θετικής πολικότητας, πολυαδενυλιωμένο, μονόκλωνο RNA μήκους 15,1 kb (Meulenberg et al., 1993a, b). Στο 5' άκρο του υπάρχει η 5'-cap αλληλουχία, ενώ στο 3' τελικό άκρο υπάρχει μία πολύ-A ομάδα. Το γονιδίωμα του ιού περιέχει τουλάχιστον 9 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs) καθένα από τα οποία εκφράζεται μέσω του 3' συντελικού άκρου σε υπογονιδιωματικό mRNAs και κωδικοποιεί συγκεκριμένες πρωτεΐνες του ιού (Allende et al., 1999). Τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης ORFs1a και ORFs1b, που καταλαμβάνουν το 75% του συνολικού γονιδιώματος, κωδικοποιούν την RNA πολυμεράση, που είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του ιού, καθώς και άλλες μη δομικές πρωτεΐνες (non structural proteins, nsp) (Allende et al., 1999). Τουλάχιστον 12-14 μη δομικές πρωτεΐνες, παράγονται από 2 πολυπρωτεΐνες, την πολυπρωτεΐνη 1a και 1ab, που εκφράζονται από

τις περιοχές ORF1a και ORF1b και έχουν λειτουργίες απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του ιού (Snijder and Meulenberg, 1998). Από τις 12 μη δομικές πρωτεΐνες, η nsr 2 είναι η μεγαλύτερη πρωτεΐνη πολλαπλασιασμού του ιού και παρουσιάζει τη μεγαλύτερη γενετική μεταβολή ανάμεσα στον ευρωπαϊκό και τον αμερικάνικο γονότυπο του ιού του ΣΑΑΣΧ. Όλες οι μη δομικές πρωτεΐνες προκαλούν αναστολή των ιντερφερονών (Interferon, IFN) (Music and Gagnon, 2010). Τα ORF1a και ORF1b βρίσκονται στο 5' τελικό άκρο του γονιδιώματος, ενώ το 3' άκρο εμπεριέχει τα ORF 2a έως ORF 7, που κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες του ιού (Snijder and Meulenberg, 1998, Wu et al., 2001). Οι περιοχές ORF 2a, ORF 3 και ORF 4 κωδικοποιούν τρεις γλυκοπρωτεΐνες του περιβλήματος, την GP2a, GP<sub>3</sub> και GP<sub>4</sub>, αντίστοιχα (Wissink et al., 2005). Η ORF 2b, που είναι πλήρως ενσωματωμένη στην ORF 2a, κωδικοποιεί τη μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη E (Wu et al., 2001). Οι παραπάνω πρωτεΐνες αποτελούν τις δευτερεύουσες δομικές πρωτεΐνες του ιού του ΣΑΑΣΧ.

Η γλυκοπρωτεΐνη GP2a έχει μοριακό βάρος 29-30 KDa και περιέχει 249 και 256 αμινοξέα για τον ευρωπαϊκό και αμερικάνικο γονότυπο του ιού αντίστοιχα (Meulenberg and al., 1995a). Η πρωτεΐνη E είναι μία μη γλυκοζυλιωμένη μικρή πρωτεΐνη και θεωρείται ότι είναι παρούσα σε όλους τους *Arteriviruses* (Wu et al., 2001). Έχει μοριακό βάρος 10 KDa και περιέχει 70 και 73 αμινοξέα για τον ευρωπαϊκό και τον αμερικάνικο γονότυπο, αντίστοιχα (Wu et al., 2001). Οι Lee και Yoo, το 2006, έδειξαν ότι η πρωτεΐνη E παίζει ρόλο στην μολυσματικότητα του ιού και πιθανόν να λειτουργεί ως κανάλι ιόντων, διευκολύνοντας την απέκδυση του ιού και την απελευθέρωση του γονιδιώματός του στο κυτταρόπλασμα. Σε μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν στελέχη του ευρωπαϊκού γονότυπου του ιού, διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη E ενσωματώνεται στα ιικά σωματίδια και συνδέεται με ομοιοπολικό δεσμό με τις πρωτεΐνες GP2a-GP<sub>3</sub>-GP<sub>4</sub>, ως ένα πολυμερές σύμπλεγμα (Wissink et al., 2005). Η πρωτεΐνη GP<sub>3</sub> είναι μία από τις πιο μεταβλητές πρωτεΐνες του ιού του ΣΑΑΣΧ, έχοντας ταύτιση των αμινοξέων μεταξύ των δύο γονότυπων σε ποσοστό 54-60% περίπου. Έχει μοριακό βάρος 45-50 KDa και περιέχει 265 και 254 αμινοξέα για τον ευρωπαϊκό και τον αμερικάνικο γονότυπο του ιού, αντίστοιχα (Meulenberg et al., 1995a). Η GP<sub>3</sub> είναι ισχυρά αντιγονική και πιθανόν να εμπλέκεται στην εξουδετέρωση του ιού μαζί με τις πρωτεΐνες M και GP<sub>5</sub> (Music and Gagnon, 2010). Η πρωτεΐνη GP<sub>4</sub> είναι μία δευτερεύουσα πρωτεΐνη του ιού, που

αποτελείται από 183 και 178 αμινοξέα για τον ευρωπαϊκό και τον αμερικάνικο γονότυπο, αντίστοιχα και μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων, όπως η GP<sub>5</sub>, σε μικρότερο όμως βαθμό από αυτήν (Music and Gagnon, 2010). Η GP<sub>4</sub> έχει μοριακό βάρος 31-35 KDa. Οι προαναφερθείσες δευτερεύουσες δομικές πρωτεΐνες (GP<sub>2a</sub>, E, GP<sub>3</sub> και GP<sub>4</sub>) είναι ενσωματωμένες στα ιικά σωματίδια ως πολυμερή συμπλέγματα, παίζουν ουσιώδη ρόλο στην μολυσματικότητα του ιού και αποτελούν πεδίο επιστημονικού ενδιαφέροντος για πολλούς ερευνητές (Wissink et al., 2005).

Οι κύριες δομικές πρωτεΐνες του ιού είναι οι GP<sub>5</sub>, η M και η πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου N. Η κύρια γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου GP<sub>5</sub> κωδικοποιείται από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF 5 και αποτελεί μία από τις πιο μεταβλητές περιοχές του γονιδιώματος του ιού (Music and Gagnon, 2010). Είναι η πιο σημαντική γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου του ιού με μοριακό βάρος περίπου 25 KDa (Meulenberg et al., 1995a). Αποτελεί μία από τις περισσότερο μεταβλητές πρωτεΐνες του ιικού γονιδιώματος με τον υψηλότερο βαθμό διαφοροποίησης μεταξύ των στελεχών ενός γονότυπου. Μεταξύ των στελεχών του αμερικάνικου γονότυπου η ταύτιση ανέρχεται σε ποσοστό 89-94%, ενώ του ευρωπαϊκού σε 87,1-99,25% (Music and Gagnon, 2010). Αξίζει να σημειωθεί ότι και άλλα τμήματα του γονιδιώματος έχουν σημαντικό βαθμό μεταβλητότητας, όπως η περιοχή ORF 3 και η μη δομική πρωτεΐνη 2 (Music and Gagnon, 2010). Η γλυκοπρωτεΐνη GP<sub>5</sub>, μαζί με την GP<sub>2</sub>, GP<sub>3</sub> και GP<sub>4</sub>, προεξέχει στην εξωτερική επιφάνεια του περιβλήματος και περιέχει επιτόπους που εμπλέκονται στην εξουδετέρωση και στην προστασία του ιού (Music and Gagnon, 2010). *In vivo*, η πλειονότητα των εξουδετερωτικών αντισωμάτων σε μολυσμένα ζώα στρέφεται εναντίον της πρωτεΐνης GP<sub>5</sub> (Music and Gagnon, 2010). Η πρωτεΐνη GP<sub>5</sub> εμπλέκεται στην είσοδο του ιού στον ξενιστή, αλληλεπιδρώντας με τους κυτταρικούς υποδοχείς των μακροφάγων του, καθώς και στο φαινόμενο της απόπτωσης (Music and Gagnon, 2010).

Η μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη της βασικής μεμβράνης του περιβλήματος M, κωδικοποιείται από την περιοχή ORF 6 (Music and Gagnon, 2010). Έχει μοριακό βάρος 18-19 KDa και αποτελείται από 173 και 174 αμινοξέα για τον ευρωπαϊκό και αμερικάνικο γονότυπο, αντίστοιχα. Έχει αποδειχθεί πειραματικά η στενή της σχέση με την πρωτεΐνη M των κοροναϊών και πιθανόν να κατέχει ρόλο κλειδί στην συγκρότηση των ιικών σωματιδίων. Είναι η πιο συντηρημένη πρωτεΐνη όλων των *Arteriviruses*

περιλαμβανομένου και του ιού του ΣΑΑΣΧ (Meulenberg et al., 1993b). Η πρωτεΐνη M συνδέεται με τη GP<sub>5</sub> με δισουλφιδικούς δεσμούς και η σύνδεση τους αποτελεί τον αντιυποδοχέα του ιού για την προσρόφηση του στα κυψελιδικά μακροφάγα. Η σύνδεση GP<sub>5</sub>-M, θεωρείται απαραίτητη για την μολυσματικότητα του ιού (Music and Gagnon, 2010).

Το καψίδιο του ιού αποτελείται από ένα μόνο συστατικό, την πρωτεΐνη N, που κωδικοποιείται από την περιοχή ORF 7 (Music and Gagnon, 2010). Η μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη N έχει μοριακό βάρος 15 KDa και αποτελείται από 128 και 123 αμινοξέα για τον ευρωπαϊκό και αμερικάνικο γονότυπο, αντίστοιχα. Προκαλεί την ανοσιακή απάντηση του οργανισμού και την παραγωγή αντισωμάτων σε μολυσμένα ζώα, γι' αυτό και θεωρείται η κύρια πρωτεΐνη διάγνωσης για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων κατά του ιού. Η πρόιμη ανοσολογική απόκριση ενός μολυσμένου ζώου έναντι της πρωτεΐνης N, την καθιστά ανιχνεύσιμη από την πρώτη εβδομάδα μετά την μόλυνση (Music and Gagnon, 2010). Ένας από τους θεμελιώδεις ρόλους της πρωτεΐνης N του νουκλεοκαψιδίου, είναι να παρέχει ένα προστατευτικό περίβλημα για το ιικό γονιδίωμα, κατά τη διάρκεια της εξωκυττάριας φάσης του κύκλου ζωής του ιού.

Καταλήγοντας, μπορούν να συναχθούν τρία συμπεράσματα: Κάθε μία από τις ικές πρωτεΐνες της μεμβράνης είναι απαραίτητες για την παραγωγή ποσότητας ικών σωματιδίων, ικανών να προκαλούν μόλυνση. Οι πρωτεΐνες GP<sub>5</sub>, M και N είναι ζωτικής σημασίας για τον σχηματισμό των ικών σωματιδίων και τη μολυσματικότητα του ιού. Οι δευτερεύουσες πρωτεΐνες, GP<sub>2a</sub> GP<sub>3</sub>, GP<sub>4</sub>, και E, δεν είναι απαραίτητες για την συναρμολόγηση των ικών σωματιδίων, αλλά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και αυτή η αλληλεπίδραση είναι κρίσιμη για την ενσωμάτωση τους ως σύμπλεγμα στα σωματίδια του ιού, καθώς και απαραίτητη για να τα καταστήσουν μολυσματικά (Wissink et al., 2005).

## **1.5 Πολλαπλασιασμός - αντιτύπωση του ιού**

Ο ιός του ΣΑΑΣΧ έχει έναν αρκετά περιορισμένο κυτταρικό τροπισμό *in vivo* και *in vitro*. *In vivo*, ο ιός προσβάλλει τα μονοκύτταρα-μακροφάγα. Από αυτά, μολύνει

υποσύνολα διαφοροποιημένων μακροφάγων στους πνεύμονες, στο λεμφικό ιστό και στον πλακούντα. Στους πνεύμονες ο ιός προσβάλλει τα χοίρεια κυψελιδικά μακροφάγα (porcine alveolar macrophages, PAMs), που είναι και τα πρωτογενή κύτταρα-στόχος του ιού (Wensvoort et al., 1991). Αντιθέτως, τα πρόδρομα μακροφάγα κύτταρα του μυελού των οστών, αλλά και τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, φαίνεται να είναι ανθεκτικά σε μεγάλο βαθμό στην μόλυνση από τον ιό (Van Breedam et al., 2010). Αρκετές μελέτες, αναφέρουν ότι τα χοίρεια δενδριτικά κύτταρα είναι ευπαθή στη λοίμωξη από τον ιό του ΣΑΑΣΧ. Ωστόσο, στην πλειοψηφία των μελετών χρησιμοποιούνται δενδριτικά κύτταρα που προέρχονται από μονοκύτταρα του αίματος ή από αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών, ύστερα από επεξεργασία με διάφορους ανοσιακούς παράγοντες, όπως η ιντερλευκίνη-4 (IL-4) (Van Breedam et al., 2010). Τα κύτταρα αυτά είναι ευαίσθητα στη μόλυνση από τον ιό του ΣΑΑΣΧ, αλλά είναι διαφορετικά από τα πρωτογενή δενδριτικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό, απαιτείται προσοχή κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των μελετών αυτών, ενώ είναι σαφές ότι απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την αξιολόγηση της λοίμωξης των δενδριτικών κυττάρων από τον ιό του ΣΑΑΣΧ *in vivo* (Van Breedam et al., 2010). Τέλος, ο ιός προσβάλλει διάμεσα μακροφάγα και σε άλλα όργανα όπως: καρδιά, νεφρούς, πλάκες του Peyer, ήπαρ και επινεφρίδια (Music and Gagnon, 2010).

Για τον πολλαπλασιασμό του ιού του ΣΑΑΣΧ, όπως και για όλους τους ιούς που προσβάλλουν τα σπονδυλωτά, σημαντικό στάδιο αποτελεί η σύνδεση των ιικών σωματιδίων με τη μεμβράνη των κυττάρων του ξενιστή. Οι Kreutz και Ackermann το 1996, ανέφεραν για πρώτη φορά τον τρόπο με τον οποίο εισέρχεται ο ιός στα κύτταρα. Μέχρι τότε, δεδομένου ότι δεν είχε παρατηρηθεί άμεση συγχώνευση του περιβλήματος του ιού με την κυτταρική μεμβράνη, εικάζονταν ότι η είσοδος του ιού στο κύτταρο συμβαίνει λόγω της ύπαρξης ενός υποδοχέα ενδοκυττάρωσης. Το 1998, η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε και ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη ενός υποδοχέα του ιού στα κυψελιδικά μακροφάγα. Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί διάφοροι κυτταρικοί παράγοντες που λειτουργούν ως υποδοχείς του ιού και κάποιοι από αυτούς φαίνεται να διευκολύνουν τη μόλυνση των κυττάρων, μετά τη δέσμευση του ιού σε αυτά (Van Breedam et al., 2010). Πρόσφατα, μία γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα της σειράς μονοκύτταρα-μακροφάγα, το CD163, χαρακτηρίστηκε ως πιθανός κυτταρικός υποδοχέας



του ιού και διαπιστώθηκε ότι οι γλυκοπρωτεΐνες του ιού GP2a και GP4 αλληλεπιδρούν με το μόριο CD163, διευκολύνοντας πιθανόν την είσοδο του ιού στα ευαίσθητα κύτταρα του ξενιστή (Music and Gagnon, 2010). Μετά την προσκόλληση του ιού στον υποδοχέα του, ακολουθεί η διείσδυση του στο εσωτερικό του κυττάρου και η απέκδυση. Η είσοδος του ιού του ΣΑΑΣΧ διερευνήθηκε με την χρήση φαρμάκων που επηρεάζουν το pH των ενδοκυττάρων τμημάτων της μεμβράνης (Kreutz et al., 1996). Έχει βρεθεί ότι το χαμηλό pH σε αυτά τα διαμερίσματα είναι απαραίτητο για την είσοδο του ιού, η οποία γίνεται με ενδοκύττωση. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψε ότι τα ιικά σωματίδια περιέχονται σε μικρές φυσαλίδες (Kreutz et al., 1996). Την είσοδο του ιού στο κύτταρο του ξενιστή ακολουθεί η απέκδυση και η απελευθέρωση του RNA.

Ο ιός του ΣΑΑΣΧ, όπως και όλοι οι RNA ιοί, πολλαπλασιάζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων (Benfield et al., 1992). Μετά την απελευθέρωση του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα, αυτό χρησιμοποιείται για τη σύνθεση της RNA-εξαρτημένης RNA πολυμεράσης, που θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταγραφή των ιικών mRNAs. Χαρακτηριστικό των ιών του γένους *Arterivirus* (και άλλων *Nidovirales*) αποτελεί η τμηματική παραγωγή υπογονιδιωματικών mRNAs, διαφορετικού μεγέθους με όμοιο 3'-άκρο και διαφορετικό σε έκταση 5'-άκρο, τα οποία σχηματίζουν ομάδες. Υπάρχει ένα υπογονιδιωματικό mRNA για κάθε γονίδιο του ιού, με εξαίρεση το πρώτο γονίδιο που εκφράζεται απευθείας από το γονιδιωματικό RNA. Παρόλο που όλα τα mRNAs περιέχουν περισσότερα από ένα ORF (με εξαίρεση το μικρότερο από αυτά που περιέχει 1 ORF), καθένα από αυτά οδηγεί στη μετάφραση μόνο του πλησιέστερου στο 5' άκρο, ORF (λειτουργικώς μονοσιστρονικά). Κάθε mRNA έχει στο 5' άκρο μία αλληλουχία οδηγό (leader sequence) όμοια με την αλληλουχία στο 5' άκρο του γονιδιωματικού RNA (de Vries AAF et al., 1990). Τα mRNAs των *Arterivirus* συντίθεται από έναν ασυνεχή μηχανισμό μεταγραφής, πιθανά παρόμοιο με αυτόν των *Coronavirus*, ενισχύοντας την υποτιθέμενη κοινή καταγωγή των γονιδίων πολλαπλασιασμού των δύο ομάδων ιών (Snijder and Meulenberg, 1998). Το γονιδιωματικό RNA μεταγράφεται πρώτα σε αρνητικής πολικότητας RNA, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη σύνθεση των mRNAs και του γονιδιωματικού RNA.

Από τις πρωτεΐνες του ιού, η πολυμεράση είναι αυτή που παράγεται πρώτη μετά την απέκδυση του ιού, με σκοπό τον πολλαπλασιασμό του ιικού RNA. Η πολυμεράση

προέρχεται από την πολυπρωτεΐνη 1a (1727-2052 αμινοξέα) και την 1b (3175-3959 αμινοξέα) και συντίθεται από τα αντίστοιχα ORFs. Η πρωτεΐνη M μετά το σχηματισμό της συσσωρεύεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και σχηματίζει διμερή με την γλυκοπρωτεΐνη GP<sub>5</sub>. Τα διμερή GP<sub>5</sub> – M συγκεντρώνονται στην συσκευή Golgi και ενσωματώνονται στα ιικά σωματίδια (de Vries et al., 1995). Οι *Arteriviruses* αποκτούν το λιπιδικό τους περίβλημα (φάκελο) στην περιοχή ανάμεσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τη συσκευή Golgi και όχι από την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Stueckemann et al., 1982). Μετά την εκβλάστηση τα σωματίδια του ιού συσσωρεύονται σε ενδοκυτταρικά κυστίδια και απελευθερώνονται από το κύτταρο μετά από συγχώνευσή τους με την μεμβράνη του κυττάρου (Stueckemann et al., 1982). Εκτός από την εξωκύττωση, ο ιός μπορεί να απελευθερωθεί και μετά από τη λύση του κυττάρου.

## 1.6 Καλλιέργεια του ιού *in vitro*

Οι *Arteriviruses*, με εξαίρεση τον ιό της EAV, έχουν αυστηρή ειδικότητα ξενιστή. Ο ιός του ΣΑΑΣΧ αρχικά απομονώθηκε σε πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειες από χοίρεια κυψελιδικά μακροφάγα (Wensvoort et al., 1991). Μέχρι σήμερα, τα κύτταρα αυτά καθώς και τα μονοκύτταρα του αίματος, παραμένουν τα μόνα χοίρεια κύτταρα που μπορούν αποτελεσματικά να χρησιμοποιηθούν για τον πολλαπλασιασμό του ιού (Voicu et al., 1994). Τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος χρησιμοποιούνται μόνο εφόσον έχουν καλλιεργηθεί για 24 ώρες. Κατά καιρούς, έχουν χρησιμοποιηθεί συνεχείς κυτταρικές σειρές, όπως η MARC-145 και η CL2621, που προέρχονται από την κυτταρική σειρά MA-104 (Benfield et al., 1992). Κατά τον πολλαπλασιασμό του ιού, προκαλείται νέκρωση των μολυσμένων κυττάρων μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Music and Gagnon, 2010). Η μόλυνση των κυττάρων MARC-145 και PAM από τον ιό οδηγεί σε απόπτωση και χαρακτηρίζεται από μορφολογικές αλλαγές και κατακερματισμό του DNA (Music and Gagnon, 2010).

Καταλήγοντας, φαίνεται ότι υπάρχουν δύο αντίθετες αντιδράσεις που πυροδοτούνται στα μολυσμένα από τον ιό μακροφάγα *in vitro*: αρχικά η ισορροπία οδηγείται σε αναστολή της απόπτωσης, άλλα τελικά τα μολυσμένα κύτταρα υφίστανται

απόπτωση (Music and Gagnon, 2010). Η μόλυνση των κυψελιδικών μακροφάγων και των κυτταρικών σειρών είναι αρκετά κυτταροτοξική, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να στρογγυλοποιούνται, να χάνουν την επαφή τους με τα γειτονικά και να αποκολλάται το ταπήτιο που σχηματίζουν (Snijder and Meulenberg, 1998). Το κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα της δράσης του ιού, εμφανίζεται συνήθως σε 1 με 2 ημέρες στα κυψελιδικά μακροφάγα και σε 2 με 4 ημέρες στις κυτταρικές σειρές (Benfield et al., 1992).

## 1.7 Γενετική ποικιλομορφία και εξέλιξη του ιού

Ο ιός του ΣΑΑΣΧ εμφανίζει μεγάλη γενετική ποικιλομορφία και αυτό γίνεται αντιληπτό από τις γενετικές και αντιγονικές διαφορές που εμφανίζονται μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών του ιού στην Ευρώπη και στην Αμερική. Σημαντικό ρόλο στην γενετική ποικιλομορφία αλλά και στην εξέλιξη του ιού, κατέχουν οι μεταλλάξεις και το φαινόμενο του γενετικού ανασυνδυασμού (Yuan et al., 1999). Η έλλειψη διορθωτικών μηχανισμών που χαρακτηρίζει την RNA-εξαρτημένη RNA πολυμεράση οδηγεί στην εμφάνιση μεταλλάξεων στο ιικό RNA. Η συσσώρευση σημειακών μεταλλάξεων, απαλείψεων και προσθηκών στο γονιδίωμα αποτελεί δύναμη εξέλιξης των RNA ιών γενικά, οδηγώντας στην εμφάνιση νέων στελεχών και οροτύπων (Lai, 1992). Για την γενετική ποικιλομορφία του ιού του ΣΑΑΣΧ, όπως προαναφέρθηκε, είναι επίσης υπεύθυνος και ο γενετικός ανασυνδυασμός (Li et al., 2009, van Vugt et al., 2001, Shi et al., 2010) Πράγματι, έχουν παρατηρηθεί ανασυνδυασμοί κατά την καλλιέργεια στελεχών του ιού σε κύτταρα (van Vugt et al., 2001), καθώς και κατά την πειραματική μόλυνση ζώων (Li et al., 2009).

Όσον αφορά στη γενετική ποικιλομορφία, ο ιός του ΣΑΑΣΧ διαιρείται σε δύο διαφορετικούς γονότυπους, τον ευρωπαϊκό, με πρότυπο στέλεχος τον ιό του Lelystad (Lelystad virus, LV) και τον αμερικάνικο, που εκπροσωπείται από το στέλεχος VR-2332 (Shi et al., 2010). Παρόλο που οι δύο αυτοί γονότυποι εμφανίστηκαν σχεδόν ταυτόχρονα και προκαλούν παρόμοια κλινική νόσο, διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό αντιγονικά και γενετικά (Shi et al., 2010). Οι διαφορές ανάμεσα στα στελέχη των δύο γονότυπων, οδήγησαν στο χαρακτηρισμό των ευρωπαϊκών ως στελέχη τύπου 1 και των

αμερικάνικων ως στελέχη τύπου 2. Σήμερα, στελέχη του ευρωπαϊκού γονότυπου του ιού έχουν εισαχθεί και απομονωθεί και σε μη ευρωπαϊκές χώρες, όπως στις ΗΠΑ, στον Καναδά, στην Ν. Κορέα, στην Κίνα και στην Ταϊλάνδη (Shi et al., 2010). Αλλά και στελέχη του αμερικάνικου γονότυπου έχουν βρεθεί στην Ευρώπη (van Vugt et al., 2001) και την Ασία (Thanawongnuwech et al., 2004).

Η ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων και των αμινοξέων των περιοχών ORFs των δύο γονότυπων του ιού, επιβεβαίωσε την έντονη γενετική παραλλακτικότητα ανάμεσά τους. Σε επίπεδο αλληλουχίας νουκλεοτιδίων, οι δύο γονότυποι του ιού, που απομονώθηκαν στις δύο ηπείρους, παρουσιάζουν ομοιότητα 52-78% (Music and Gagnon, 2010) ενώ σε επίπεδο αλληλουχίας αμινοξέων είναι όμοιοι σε ποσοστό 50-80% (Forsberg, 2005). Η πρωτεΐνη GP<sub>5</sub> είναι η πιο μεταβλητή δομική πρωτεΐνη του ιού, εμφανίζοντας ομοιότητα 51-55 % μεταξύ των στελεχών του ευρωπαϊκού και αμερικάνικου γονότυπου, σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Επιπλέον, διαφέρει σημαντικά και μεταξύ των στελεχών του ίδιου γονότυπου. Έτσι, ανάμεσα στα στελέχη του ευρωπαϊκού γονότυπου, η GP<sub>5</sub> είναι ταυτόσημη σε ποσοστό 87,1-99,25 % και του αμερικάνικου σε ποσοστό 89-94 % (Pesente et al., 2006). Η περισσότερο συντηρημένη πρωτεΐνη M, παρουσιάζει ομοιότητα 78-81 % μεταξύ των δύο γονότυπων σε επίπεδο αλληλουχίας νουκλεοτιδίων. Οι πρωτεΐνες GP<sub>3</sub>, GP<sub>4</sub> και M περιέχουν αντιγονικούς επίτοπους, που είναι ιδιαίτερα μεταβλητοί ανάμεσα στα στελέχη του ευρωπαϊκού και αμερικάνικου γονότυπου του ιού του. Αντίθετα, οι επίτοποι της νουκλεοπρωτεΐνης N είναι περισσότερο συντηρημένοι μεταξύ των στελεχών των δύο γονότυπων του ιού στις δύο ηπείρους, αλλά και ανάμεσα στα στελέχη της κάθε ηπείρου χωριστά (Le Gall et al., 1998).

Τα διάφορα στελέχη των δύο γονότυπων του ιού, διαφέρουν σημαντικά και ως προς τη λοιμογόνο δύναμή τους, προκαλώντας διαφορετική κλινική εικόνα (Batista et al., 2002). Φυσικά, η λοιμογόνος δύναμη του ιού σχετίζεται με πολλούς παράγοντες, όπως τους περιβαλλοντικούς, το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή, τις μεικτές λοιμώξεις κ.α., και συνεπώς δεν είναι εύκολο να προσδιοριστούν οι περιοχές του γονιδιώματος του ιού που εμπλέκονται στην παθογένειά του (Music and Gagnon, 2010). Όμως οι Halbur και συνεργάτες (1996), διαπίστωσαν ότι τα διάφορα στελέχη των δύο γονότυπων του ιού, μπορούν να ταξινομηθούν σε χαμηλής και υψηλής λοιμογόνου δύναμης, ανάλογα με τις μακροσκοπικές και μικροσκοπικές αλλοιώσεις που προκαλούν στα μολυσμένα ζώα.

Μελέτες που έγιναν με εννιά διαφορετικά στελέχη του ιού, από τις ΗΠΑ, σε πειραματικά μολυσμένα ζώα, έδειξαν σημαντικές διαφορές ως προς την κλινική εκδήλωση της νόσου (Cho and Dee, 2006). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι οι επιπτώσεις του ιού στις αναπαραγωγικές επιδόσεις των ζώων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη λοιμογόνο δύναμη των διαφόρων στελεχών (Cho and Dee, 2006). Σε μία πρόσφατη έρευνα όπου μολύνθηκαν χοίροι με εξαιρετικά λοιμογόνο στέλεχος του ιού, το αποτέλεσμα ήταν να αυξηθεί το διάστημα ιαιμίας, η βαρύτητα των συμπτωμάτων αλλά και η θνησιμότητα των ζώων (Cho and Dee, 2006).

Επίσης, σημαντική γενετική ετερογένεια παρατηρείται και μέσα στην ίδια ομάδα στελεχών του ευρωπαϊκού ή του αμερικάνικου γονότυπου. Πράγματι, σε χώρες όπως η Δανία και η Ιταλία έχει αναφερθεί υψηλή γενετική απόκλιση μεταξύ των ευρωπαϊκών στελεχών του ιού που έχουν απομονωθεί (Music and Gagnon, 2010). Το 2006 στην Κίνα, εμφανίστηκε ένα υψηλής λοιμογόνου δύναμης στέλεχος, που θεωρήθηκε ως η πιθανή αιτία της μεγάλης επιζωοτίας με υψηλή θνησιμότητα. (Li et al., 2007). Είναι πλέον προφανές, ότι τα απομονωθέντα στελέχη του ιού του ΣΑΑΣΧ έχουν γενετική παραλλακτικότητα και μπορούν να ταξινομηθούν σε πολλούς φυλογενετικούς κλάδους μέσα σε κάθε γονότυπο (Music and Gagnon, 2010).

## **1.2 ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΤΟΥ ΧΟΙΡΟΥ ΑΠΟ ΤΟΝ ΙΟ ΤΟΥ ΣΑΑΣ**

### **1.2.1 Ιστορική ανάδρομή**

Το σύνδρομο του αναπαραγωγικού και αναπνευστικού συστήματος του χοίρου (ΣΑΑΣΧ, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS) εμφανίστηκε για πρώτη φορά σε χοιροτροφικές μονάδες στις ΗΠΑ, στα τέλη της δεκαετίας του 1980. Η ασθένεια, που μέχρι τότε ήταν άγνωστη, εμφανίστηκε με σοβαρά προβλήματα αναπαραγωγής στις σύες, αποβολές στο τελευταίο στάδιο της κυοφορίας, αύξηση του αριθμού των θνησιγενών χοιριδίων, σοβαρή πνευμονία στα νεογέννητα και απογαλακτισθέντα χοιρίδια, μείωση της ανάπτυξης και αύξηση της θνησιμότητας (Keffaber 1989, Loula, 1991). Λίγο αργότερα, και συγκεκριμένα το 1990, η ασθένεια

«πέρασε» τον Ατλαντικό ωκεανό και εμφανίστηκε στην Ευρώπη. Η νόσος εμφανίστηκε αρχικά στην Γερμανία και σε μερικούς μήνες εξαπλώθηκε σε χώρες με υψηλή χοιροτροφία, όπως το Βέλγιο, την Ολλανδία, την Μεγάλη Βρετανία, την Ισπανία, την Γαλλία, τη Δανία, την Πολωνία και την Τσεχία. Στην Ελλάδα η πρώτη αναφορά έγινε το 1993 (Ξυλούρη, 1993). Η ασθένεια αρχικά, εξαιτίας του άγνωστου αιτιολογικού της παράγοντα, ονομάστηκε με διάφορους τρόπους, όπως «Μυστηριώδης νόσος του χοίρου» (Mystery Swine Disease, MSD) ή «Νόσος του κυανού αυτιού» (Terpstra et al., 1991) λόγω του κυανού χρωματισμού των αυτιών σε κάποια ζώα. Στην Β. Αμερική δόθηκε το όνομα «Swine Infertility and Respiratory Syndrome», (SIRS) αλλά τελικά το 1991 η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για να ενοποιήσει τα διάφορα ονόματα που είχε αποκτήσει η νόσος, αποφάσισε να δώσει στην ασθένεια την επίσημη ονομασία «Σύνδρομο του Αναπαραγωγικού και Αναπνευστικού Συστήματος του Χοίρου, ΣΑΑΣΧ» (Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome, PRRS).

Το 1991 στο Κτηνιατρικό Ινστιτούτο στο Lelystad της Ολλανδίας, απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά ο αιτιολογικός παράγοντας του συνδρόμου που ονομάστηκε ιός του Lelystad (Wensvoort et al., 1991, Terpstra et al., 1991). Την ίδια χρονική περίοδο απομονώθηκε στις ΗΠΑ ένα άλλο στέλεχος του ιού, παρόμοιο με το προηγούμενο, που ονομάστηκε VR-2332 (Benfield et al., 1992, Collins et al., 1992), ενώ ένα χρόνο αργότερα απομονώθηκε στον Καναδά (Dea et al., 1992). Από εκείνη την στιγμή και μετά γίνεται σαφές ότι ο ιός που κυκλοφορεί στην Αμερική ήταν διαφορετικός από αυτόν που κυκλοφορεί στην Ευρώπη και ορίζεται η ύπαρξη δύο γονότυπων του ιού του ΣΑΑΣΧ, του ευρωπαϊκού ή τύπου 1 και του αμερικάνικου ή τύπου 2 (Snijder and Meulenberg, 1998). Εν συνεχεία, οι δύο γονότυποι του ιού εμφανίστηκαν και στην Ασιατική ήπειρο (Thanawongnuwech et al., 2004).

Έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες για την πηγή προέλευσης του ιού του ΣΑΑΣΧ. Σε μία πρόσφατη υποστηρίζεται, ότι το 1880 υπήρχε ένας κοινός πρόγονος για τα στελέχη της Ευρώπης και της Αμερικής, που αργότερα εξελίχθηκε παράλληλα στις δύο ηπείρους, και εμφάνισε την κλινική του μορφή στα τέλη της δεκαετίας του 1980 (Forsberg et al., 2005). Πρόσφατα αναπτύχθηκε μία άλλη ενδιαφέρουσα θεωρία μέσα από την σε βάθος φυλογενετική ανάλυση του γονιδιώματος των στελεχών που βρέθηκαν στην Ευρώπη. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτήν, υπάρχει η δυνατότητα εμφάνισης ενός

νέου ιού ή η διάδοση ενός ήδη υπάρχοντος στελέχους στην Ανατολική Ευρώπη λόγω διαφόρων παραγόντων όπως η ανάπτυξη του εμπορίου ή η δημιουργία νέων συνόρων σε διάφορα κράτη (Stadejeck et al., 2007).

Σήμερα, το ΣΑΑΣΧ αποτελεί παγκόσμια ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της χοιροτροφίας, προκαλώντας μεγάλες οικονομικές απώλειες (Music and Gagnon, 2010), ενώ ο ιός ενζωτεί σε παγκόσμιο επίπεδο, με περιστασιακές ενζωτικές εκρήξεις. Παρόλη τη διαθεσιμότητα των εμβολίων, ο έλεγχος του ιού παραμένει δύσκολος, έως αδύνατος, μέχρι σήμερα (Shi et al., 2010).

### 1.2.2 Παθογένεια

Οι χοίροι μπορούν να μολυνθούν μέσω της ενδορινικής, της στοματικής και της γεννητικής οδού, ενώ ο ιός απεκκρίνεται με το σάλιο, τις ρινικές εκκρίσεις, το γάλα, τα ούρα, τα κόπρανα και το σπέρμα (Prieto and Castro, 2005).

Το RNA του ιού του ΣΑΑΣΧ και η πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου N έχουν βρεθεί με τις μεθόδους της ανοσοϊστοχημείας (immunohistochemistry, IHC) και του *in situ* υβριδισμού (*in situ* hybridization, ISH) (Rossow, 1998). Μετά την είσοδο του ιού στον οργανισμό, ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός του, κυρίως στα κυψελιδικά μακροφάγα του πνεύμονα (Rossow, 1998). Αυτά θα διασπείρουν τον ιό σε όλο τον οργανισμό. Έτσι, 12 ώρες μετά την μόλυνση του ζώου, προσβάλλονται τα επιχώρια λεμφογάγγλια. Από τους λεμφικούς ιστούς ο ιός διασπείρεται στους ευαίσθητους ιστούς, με εκλεκτική όμως εντόπιση στα μακροφάγα του πνεύμονα, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (Rossow, 1998). Ο ιός μπορεί επίσης να πολλαπλασιάζεται στα μακροφάγα κύτταρα άλλων ιστών, καθώς και στα σπερματογόνα κύτταρα (Wensvoort et al., 1991, Thanawongnuwech et al., 1998) (Εικόνα 2).

Υποστηρίζεται ότι υπάρχουν τρεις φάσεις στην εξέλιξη της μόλυνσης (Beyer et al., 2000). Στην πρώτη φάση, συμβαίνει μία οξεία λοίμωξη των λεμφικών οργάνων. Αυτό διαρκεί περίπου μία εβδομάδα και χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό μολυσμένων μακροφάγων. Στην δεύτερη φάση, συμβαίνει μία οξεία λοίμωξη του πνεύμονα, που είναι περισσότερο έντονη κατά την 2η-3η εβδομάδα, όπου έχει πλέον μολυνθεί ένας μεγάλος

αριθμός κυψελιδικών μακροφάγων. Στο σημείο αυτό η μόλυνση των λεμφικών ιστών έχει περιοριστεί αρκετά. Στην τρίτη φάση, η μόλυνση συνεχίζεται με αργούς ρυθμούς, περίπου 50 μέρες από την αρχική μόλυνση του ζώου. Στην φάση αυτή παρατηρείται μία επίμονη λοίμωξη των λεμφικών οργάνων, κυρίως των αμυγδαλών, αλλά και των πνευμόνων.

Αν και το ΣΑΑΣΧ είχε περιγραφεί αρχικά ως μία οξεία λοίμωξη που προκαλεί αναπνευστικά προβλήματα στους αναπτυσσόμενους χοίρους και αποβολές στις σύες αναπαραγωγής, αργότερα αποδείχθηκε ότι μπορεί να προκαλεί επίμονες λοιμώξεις (Suarez, 2000). Έτσι, μπορούν να διακριθούν δυο στάδια της μόλυνσης, η οξεία φάση που χαρακτηρίζεται από υψηλούς τίτλους του ιού σε όλα τα ευαίσθητα όργανα και περιλαμβάνει τις 2-3 πρώτες εβδομάδες της μόλυνσης και το δεύτερο στάδιο, αυτό της επίμονης λοίμωξης που χαρακτηρίζεται από περιορισμένη αντιγραφή του ιού σε ορισμένα μόνο όργανα.

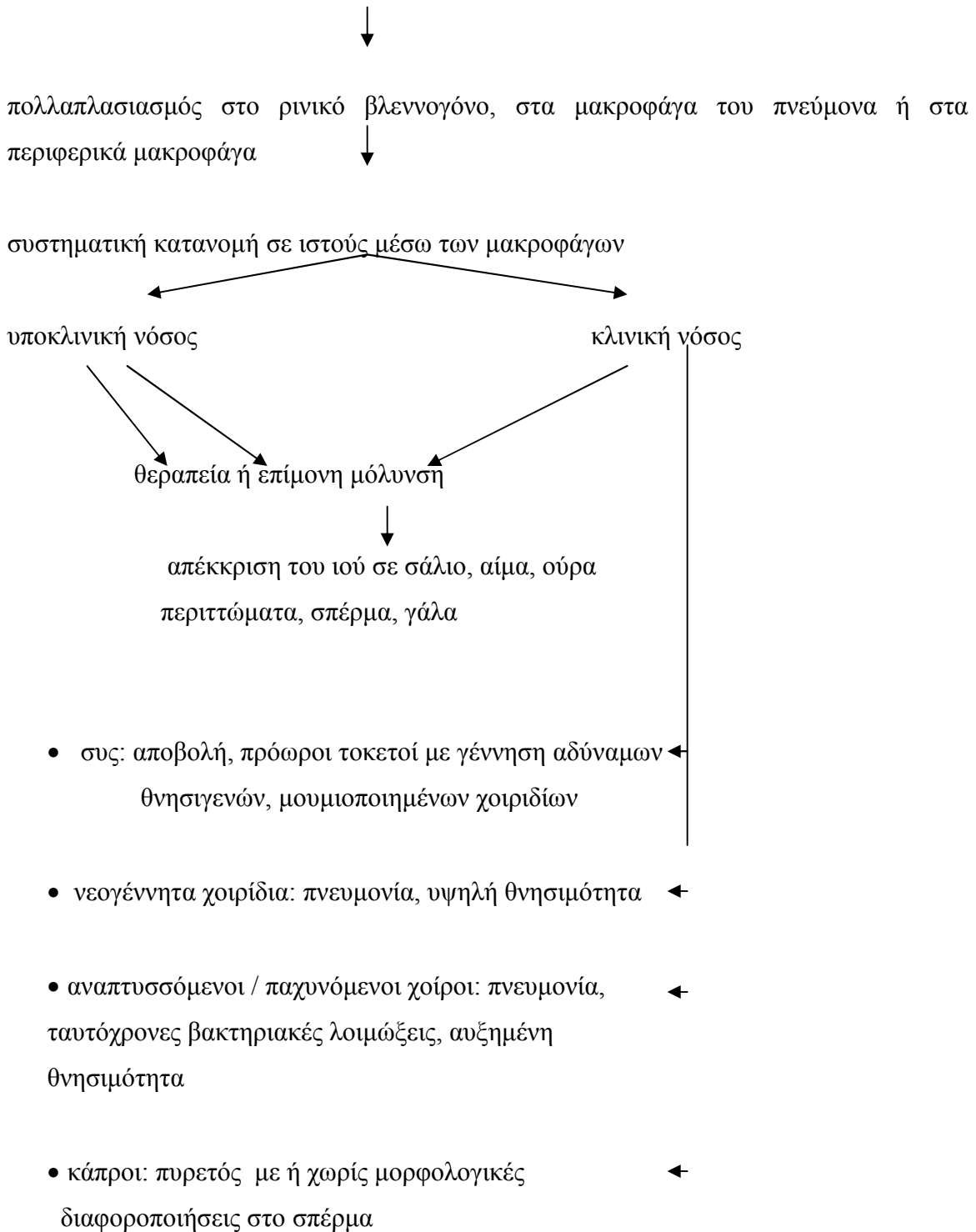
Κατά την οξεία φάση ο ιός πολλαπλασιάζεται μέσα στις πρώτες 12 ώρες και η ιαιμία είναι ανιχνεύσιμη σε 24 περίπου ώρες μετά την μόλυνση. Η ιαιμία είναι ιδιαίτερα παρατεταμένη και μεταβάλλεται από ζώο σε ζώο, με τους νεαρούς χοίρους να είναι περισσότερο ευαίσθητοι (van der Linden et al., 2003). Αυτή η προδιάθεση της ηλικίας μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι δεν είναι όλα τα μακροφάγα ευπαθή στην μόλυνση από τον ιό του ΣΑΑΣΧ. Το 2000, ο Suarez υποστήριξε ότι ο αριθμός των ευπαθών μακροφάγων κυττάρων στη μόλυνση, είναι αντιστρόφως ανάλογος με την ηλικία του προσβεβλημένου ζώου. Ο ιός στο αίμα φθάνει στον υψηλότερο τίτλο του 5-9 ημέρες μετά την αρχική μόλυνση, ενώ παύει να ανιχνεύεται 35 περίπου ημέρες μετά από αυτήν. Στα νεαρά χοιρίδια η ιαιμία μπορεί να διαρκέσει έως και τρεις μήνες, ενώ στα ενήλικα έως και 2-4 εβδομάδες μετά την μόλυνση (van der Linden et al., 2003). Σε γενικές γραμμές, κατά την οξεία φάση της λοίμωξης λαμβάνει χώρα η κλινική εκδήλωση της νόσου και εμφανίζονται οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις των οργάνων, στους πνεύμονες ή τους λεμφαδένες, όπου παρατηρείται και υψηλός ιικός τίτλος.

Ένα από τα κρίσιμα σημεία του ΣΑΑΣΧ είναι η ικανότητα του ιού να προκαλεί επίμονη μόλυνση. Ως επίμονη λοίμωξη, μπορεί να χαρακτηριστεί η αδιάλειπτη παρουσία του ιού στην πύλη εισόδου του στον οργανισμό του ζώου, για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την μόλυνση. Στα επίμονα μολυσμένα ζώα μετά το τέλος της ιαιμίας, η διάρκεια της



οποίας εξαρτάται από παράγοντες όπως η ηλικία των ζώων και η μολυσματική δόση (Van Reeth, 1997), ο ιός του συνδρόμου συνεχίζει να πολλαπλασιάζεται με χαμηλό ρυθμό στους λεμφικούς ιστούς (Zimmerman et al., 2006). Δίνοντας μία νέα διάσταση στην επίμονη μόλυνση, οι Benfield και συνεργάτες (1998), υποστήριξαν ότι ένα ζώο είναι επίμονα μολυσμένο όταν η αντιγραφή του ιού περιορίζεται σε λεμφικά όργανα (αμυγδαλές, σπλήνα, λεμφαδένες) ή στους όρχεις, και όχι στα κυψελιδικά μακροφάγα του πνεύμονα. Η ανίχνευση του ιού φαίνεται να είναι δυνατή, ακόμα και 132 ημέρες μετά την μόλυνση σε αμυγδαλές και λεμφαδένες (Benfield et al., 2000). Οι χοίροι με επίμονη λοίμωξη μπορούν να απεκκρίνουν τον ιό χωρίς οι ίδιοι να εμφανίζουν κλινική εκδήλωση της νόσου. Τα ζώα αυτά, που είναι κλινικά υγιή, αποτελούν φορείς της νόσου. Αποτέλεσμα λοιπόν της επίμονης μόλυνσης, είναι η παρουσία του ιού στο ζώο φορέα και η απέκκριση του από αυτό μετά την οξεία φάση της λοίμωξης (Allende et al., 2000). Είναι καλά τεκμηριωμένο πλέον, ότι χοίροι με επίμονη μόλυνση βρίσκονται στις εκτροφές που αντιμετωπίζουν χρόνια προβλήματα με τον ιό του ΣΑΑΣΧ (Suarez, 2000) και αποτελούν έναν σημαντικό παράγοντα για την επιβίωση και τη μετάδοση του ιού στην εκτροφή (Benfield et al., 2002).

Είσοδος του ιού του ΣΑΑΣΧ στον οργανισμό του ζώου με την εισπνοή, τη γονιμοποίηση ή ιατρογενώς



Εικόνα 2. Παθογένεια της μόλυνσης από τον ιό του ΣΑΑΣΧ (Rossow, 1998) (τροποποιημένο).

### 1.2.3 Μηχανισμοί παθογένειας

Ο ιός του ΣΑΑΣΧ προκαλεί την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων και αλλοιώσεων μέσω διαφόρων μηχανισμών, οι οποίοι περιλαμβάνουν :

1. Απόπτωση: Είναι η κύρια αιτία θανάτου των κυττάρων που μολύνονται από τον ιό του ΣΑΑΣΧ (άμεση απόπτωση), είτε δεν μολύνονται απ' αυτόν (έμμεση απόπτωση). Η αιτία πρόκλησης της άμεσης απόπτωσης πιθανόν να είναι η παρουσία της πρωτεΐνης GP<sub>5</sub> του φακέλου του ιού, η οποία είναι σε θέση να προκαλέσει έντονη και ταχεία κυτταροτοξικότητα (Suarez, 2000). Ο μηχανισμός της έμμεσης απόπτωσης είναι ακόμα άγνωστος, αλλά φαίνεται να οφείλεται στην απελευθέρωση ουσιών από τα μολυσμένα μακροφάγα, όπως κυτταροκίνες και ενεργά παράγωγα οξυγόνου (Zimmerman et al., 2006).

2. Απελευθέρωση κυτταροκινών: Η έκκριση από τα μολυσμένα μακροφάγα παράγοντα νέκρωσης του όγκου-α (tumor necrosis factor alpha, TNF-α), ιντερλευκίνης 1 (IL-1) και ιντερλευκίνης 6 (IL-6), οδηγεί στην προσέλκυση και ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων, αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών (πρόκληση πνευμονικού οιδήματος και βρογχόσπασμου), προκαλώντας συστηματικές επιδράσεις όπως υπερθερμία, ανορεξία και λήθαργο (Zimmerman et al., 2006).

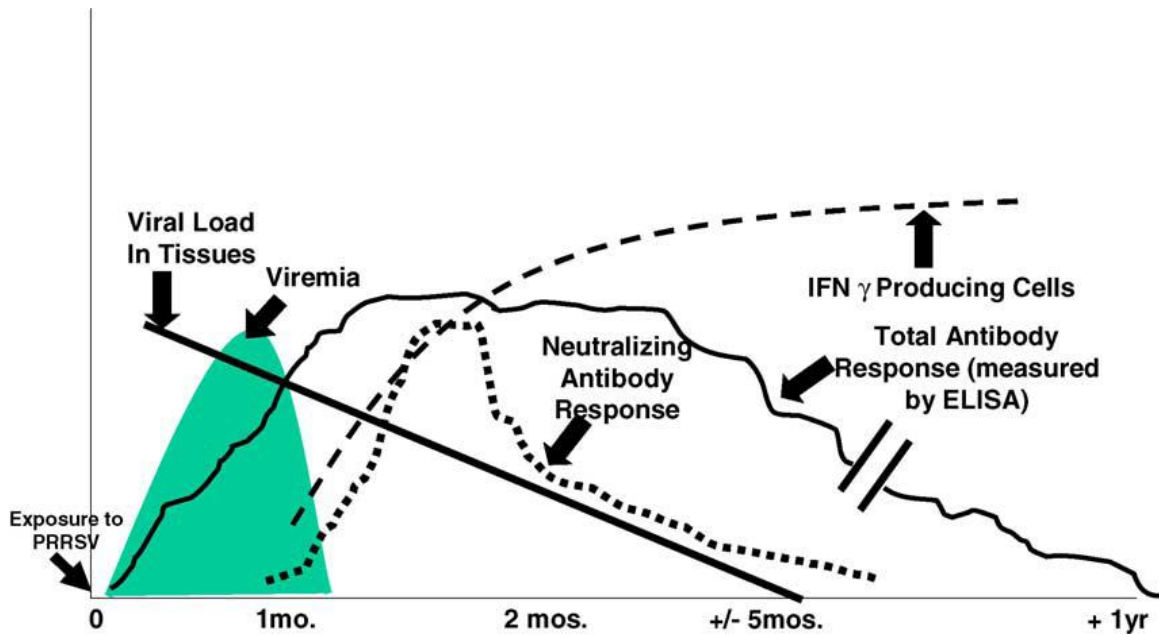
3. Ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων: Τα Β-λεμφοκύτταρα σχετίζονται με υπερπλασία του λεμφοειδούς ιστού και αύξηση των ανοσοσφαιρινών και των κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλόκων (Zimmerman et al., 2006).

4. Μείωση της φαγοκυτταρικής ικανότητας: Τα προσβεβλημένα μακροφάγα εμφανίζουν μείωση της φαγοκυτταρικής τους ικανότητας έναντι των βακτηρίων, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία του οργανισμού σε δευτερογενείς βακτηριακές λοιμώξεις (Zimmerman et al., 2006).

### 1.2.4. Ανοσιακή απάντηση κατά του ιού του ΣΑΑΣΧ

Μερικοί συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η ανοσιακή απάντηση του οργανισμού έναντι του ιού του ΣΑΑΣΧ, δεν είναι σε θέση να αναστείλει την λοίμωξη επιτρέποντας

την εμφάνιση μακράς διάρκειας ιαιμία και επίμονη λοίμωξη στους λεμφικούς ιστούς (Murtaugh et al., 2002). Ωστόσο, το 2004, οι López και Osorio υποστήριξαν, ότι η παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων μαζί με την κυτταρική ανοσιακή απάντηση θα μπορούσαν να εξαλείψουν εντελώς τον ιό από τον οργανισμό του μολυσμένου ζώου (Εικόνα 2). Όμως, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της ανοσιακής απάντησης του οργανισμού έναντι του ιού του ΣΑΑΣΧ, υποδηλώνουν ότι αυτός είναι σε θέση να τη ρυθμίζει (Mateu and Díaz, 2007). Σε όλα αυτά πρέπει να προστεθεί ότι η γενετική ποικιλομορφία του ιού είναι πιθανόν να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, επιτρέποντας του να ξεφεύγει από την ανοσιακή απάντηση του οργανισμού (Meng, 2000) (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3.** Χρονική αλληλουχία γεγονότων μετά την μόλυνση χοίρου με τον ιό του ΣΑΑΣΧ. Η περίοδος που ακολουθεί την αρχική έκθεση στον ιό, χαρακτηρίζεται από την παρουσία συνήθως κλινικών συμπτωμάτων και την ταχεία αντιγραφή του ιού στα κύτταρα στόχο. Η οξεία αυτή περίοδος χαρακτηρίζεται από υψηλό ιικό φορτίο και ιαιμία που μπορεί να διαρκέσει ένα και πάνω μήνα (López and Osorio, 2004).

Η έμφυτη ανοσία είναι ο πρώτος φραγμός έναντι μιας μόλυνσης. Η φτωχή διέγερση της έμφυτης ανοσίας μπορεί να είναι η αιτία της ελλειμματικής χυμικής και

κυτταρικής απόκρισης του οργανισμού έναντι του ιού του ΣΑΑΣΧ (Murtaugh et al., 2002). Κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από τον ιό η έμφυτη ανοσία είναι αδύναμη όσον αφορά την απελευθέρωση κυτταροκινών (Van Reeth et al., 1999, Royae et al., 2004) και την κυτταροτοξική δράση των φυσικών φονικών κυττάρων (NK) (Lamontagne et al., 2003).

Οι ιντερφερόνες α (IFNα) είναι από τις σημαντικότερες κυτταροκίνες για την ανοσιακή απάντηση έναντι ιογενών λοιμώξεων. Ωστόσο, σε ορισμένες μελέτες αποδείχθηκε ότι παράγονται σε χαμηλότερο επίπεδο σε σύγκριση με άλλες ασθένειες των χοίρων (Royae et al., 2004). Επίσης, η μόλυνση από τον ιό του ΣΑΑΣΧ δεν προκαλεί σημαντική παραγωγή και άλλων κυτταροκινών φλεγμονής, όπως είναι ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου (TNFα) και η ιντερλευκίνη 1 (IL-1) (Van Reeth et al., 1999, Thanawongnuwech et al., 2001).

Αποτέλεσμα της μόλυνσης ενός ζώου με τον ιό του ΣΑΑΣΧ είναι η διέγερση της χυμικής ανοσίας και η παραγωγή ειδικών αντισωμάτων, που μπορούν να ανιχνευθούν 10-14 ημέρες μετά την μόλυνση (Labarque et al., 2000). Τα αντισώματα αυτά κατευθύνονται έναντι της πρωτεΐνης N, δεν είναι εξουδετερωτικά και συνυπάρχουν με ιαμία στο ζώο (Labarque et al., 2000). Τα αντισώματα αυτά εμφανίζονται γρήγορα και είναι άφθονα γι' αυτό και χρησιμοποιούνται για διαγνωστικούς σκοπούς. Τα εξουδετερωτικά αντισώματα ανιχνεύονται περίπου 4 εβδομάδες μετά την αρχική μόλυνση και η παρουσία τους συνδέεται με την μείωση του ιικού φορτίου στους πνεύμονες και στο περιφερικό αίμα. Ο κύριος επίτοπος ενάντια του οποίου στρέφονται τα εξουδετερωτικά αντισώματα είναι η γλυκοπρωτεΐνη GP<sub>5</sub> του περιβλήματος του ιού. Επίσης, άλλοι επίτοποι είναι οι γλυκοπρωτεΐνες GP<sub>3</sub>, GP<sub>4</sub> και η πρωτεΐνη M (Mateu and Díaz, 2007). Τα εξουδετερωτικά αντισώματα δεν αναπτύσσονται από την αρχή της μόλυνσης, αλλά μεταξύ 4<sup>ης</sup> και 6<sup>ης</sup> εβδομάδας και παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε χαμηλά επίπεδα (Yoon et al., 1994). Το 2002, οι Osorio και συνεργάτες, υποστήριξαν ότι στις έγκυες χοιρομητέρες τα εξουδετερωτικά αντισώματα συνεργούν στον αποκλεισμό της διέλευσης του ιού μέσω του πλακούντα. Είναι δηλαδή αναγκαία για να αποφευχθεί η διέλευση του ιού στο έμβryo, όμως ο ρόλος τους στη λοίμωξη παραμένει άγνωστος (Mateu and Díaz, 2007).

Η αντίδραση των T λεμφοκυττάρων έναντι του ιού του ΣΑΑΣΧ ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο της ιαιμίας. Δύο εβδομάδες μετά την αρχική μόλυνση, τα επίπεδα των T κυτταροτοξικών-κατασταλτικών λεμφοκυττάρων (CD8+) είναι αυξημένα στον ορό, ενώ τα βοηθητικά (CD4+) λεμφοκύτταρα μειωμένα. Η μείωση των CD4+ λεμφοκυττάρων συνεχίζεται για τουλάχιστον 14 ημέρες, ενώ τα CD8+ λεμφοκύτταρα φθάνουν στο μέγιστο της συγκέντρωσης τους 23-35 ημέρες μετά την μόλυνση. Ο μηχανισμός με τον οποίο ο ιός του συνδρόμου μπορεί να επηρεάσει τους πληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων είναι ακόμα άγνωστος, ωστόσο θεωρείται ότι μπορεί να προκαλέσει τον θάνατο των CD4+ με ταυτόχρονη διέγερση των CD8+ λεμφοκυττάρων (Drew, 2000). Για την αξιολόγηση της κυτταρικής ανοσιακής απάντησης του οργανισμού έναντι του ιού, γίνεται προσδιορισμός της παραγωγής ειδικής ιντερφερόνης γ (IFN-γ) με την τεχνική του ανοσοπροσδιορισμού ELISPOT (Zuckermann et al., 1998). Σήμερα θεωρείται ότι τα κύτταρα που παράγουν IFN-γ είναι τα T λεμφοκύτταρα και τα φυσικά φονικά (NK) κύτταρα. Η IFN-γ είναι σε θέση να αναστέλλει την αντιγραφή του ιού λόγω της παρεμπόδισης σύνθεσης του RNA, μειώνοντας τον αριθμό των μακροφάγων που μολύνονται από τον ιό του ΣΑΑΣΧ *in vitro* (Bautista and Molitor, 1999). Οι Meier και συνεργάτες (2003), διαπίστωσαν ότι η παραγωγή IFN-γ από τα κύτταρα είναι χαμηλή και ακανόνιστη. Σε πειραματική μελέτη διαπιστώθηκε, ότι η μεγαλύτερη ανοσιακή απάντηση με πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων, προκλήθηκε κυρίως ύστερα από την *in vitro* διέγερση με την πρωτεΐνη M και λιγότερο με τις γλυκοπρωτεΐνες GP5, GP3 και GP2 (Bautista et al., 1999). Στην παραπάνω πειραματική εργασία υποστηρίζεται ότι η πρωτεΐνη N του ιού «πυροδοτεί» την πιο αδύναμη παραγωγή T λεμφοκυττάρων.

### **1.2.5 Κλινικά συμπτώματα του ΣΑΑΣΧ**

Τα κλινικά συμπτώματα από την μόλυνση με τον ιό του ΣΑΑΣΧ ποικίλλουν μεταξύ των εκτροφών και εξαρτώνται από το στέλεχος του ιού, τη λοιμογόνο δύναμη του, την ηλικία των ζώων, την ανοσολογική κατάστασή τους, διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες και τη διαχείριση (Zimmerman et al., 2006). Η σοβαρότητα της λοίμωξης από τον ιό ποικίλλει, από παντελή έλλειψη κλινικών

συμπτωμάτων έως απότομα ξεσπάσματα προβλημάτων στο γεννητικό και αναπνευστικό σύστημα. Η ένταση της εκδήλωσης της νόσου φαίνεται να παρουσιάζει διακυμάνσεις σε πειραματικώς μολυσμένα ζώα. Πράγματι, σε μελέτες διαπιστώθηκε ότι χοίροι που μολύνθηκαν πειραματικά με εννέα διαφορετικά στελέχη του ιού (από τις ΗΠΑ) εμφάνισαν μεγάλες διαφορές στα κλινικά συμπτώματα και στις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις του πνεύμονα (Cho and Dee, 2006). Επίσης η κλινική εκδήλωση της νόσου σχετίζεται και με τη συγκέντρωση του ιού στο αίμα και στους ιστούς (Cho and Dee, 2006). Τα στελέχη υψηλής λοιμογόνου δύναμης προκαλούν σοβαρή κλινική νόσο, ενώ τα χαμηλής ενζωτική νόσο (Blaha, 2000).

Όταν ο ιός εισέλθει σε μία εκτροφή με ζώα αναπαραγωγής, προκαλεί σοβαρή κλινική νόσο με επιπολασμό που ανέρχεται σε 86-95% για τις πολύτοκες χοιρομητέρες και 100% για τις νεαρές άτεκνες σύες αναπαραγωγής (Nodelijk et al., 2003). Σε πολλές μολυσμένες εκτροφές ο ιός ενζωτεί στα διάφορα στάδια παραγωγής. Στις χοιροτροφικές εκμεταλλεύσεις η ενζωτική μορφή του συνδρόμου εκδηλώνεται με υφέσεις και εξάρσεις στις νεαρές σύες αναπαραγωγής και αναπνευστικά προβλήματα στους αναπτυσσόμενους χοίρους (Dee, 2003). Το 1997, οι Zimmerman και συνεργάτες, υποστήριξαν ότι η οξεία μορφή του συνδρόμου συνοδεύεται από κλινικά συμπτώματα 2-4 εβδομάδες, υψηλή θνησιμότητα των χοιρομητέρων και των κάπρων (>5%) και υψηλά επίπεδα αποβολών (>10%). Αντίθετα, ο Nodelijk το 2002, υποστήριξε ότι αναπαραγωγικές διαταραχές στις σύες μπορεί να διαρκέσουν τουλάχιστον 1-3 μήνες, κατά την οξεία μορφή της νόσου.

Οι σύες είναι δυνατόν να μολυνθούν από τον ιό του ΣΑΑΣΧ είτε αερογενώς με την βοήθεια μικροσταγονιδίων από τα μολυσμένα ζώα, είτε μετά την γονιμοποίηση τους με μολυσμένο κάπρο ή τη χρήση μολυσμένου σπέρματος μετά από τεχνητή σπερματέγχυση. Η περίοδος επώασης ποικίλλει, αλλά συνήθως οι πρώτες κλινικές εκδηλώσεις εμφανίζονται 2-9 ημέρες μετά την αρχική μόλυνση. Οι συχνότερες κλινικές, αλλά μη ειδικές, ενδείξεις που παρατηρούνται σε σύες είναι ανορεξία, κατάπτωση, πυρετός και λήθαργος (Keffaber et al., 1989, Loula et al., 1991). Κατά καιρούς, έχουν επίσης περιγραφεί υποδόριο οίδημα καθώς και κυάνωση των αυτιών, των μαστών, των άκρων και του αιδοίου (Rossow, 1998). Τα κλινικά συμπτώματα από το γεννητικό σύστημα των σιών περιλαμβάνουν αποβολές κατά το τελευταίο κυρίως στάδιο της κυοφορίας, πρόωρους τοκετούς, μείωση του ποσοστού τοκετών και μείωση της

γονιμότητας, με αύξηση του ποσοστού των επιστροφών σε οίστρο (Zimmerman et al., 2006). Ο ιός μπορεί να διαπεράσει τον πλακούντα και να μολύνει τα έμβρυα. Ορισμένοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι οι επιπτώσεις του ιού στο ποσοστό σύλληψης είναι ασήμαντες (Prieto et al., 1997). Ωστόσο, οι Horper και συνεργάτες (1992), υποστηρίζουν ότι η μόλυνση, από τον ιό του ΣΑΑΣΧ, των κυοφορούντων σιών μειώνει το δείκτη σύλληψης. Όταν η μόλυνση λαμβάνει χώρα στο τελευταίο τρίτο της κυοφορίας, η κλινική εικόνα της νόσου είναι περισσότερο έντονη με αποτέλεσμα τη γέννηση θνησιγενών και μουμιοποιημένων χοιριδίων, αδύναμων διαφόρου μεγέθους χοιριδίων και τη γέννηση φυσιολογικών, φαινομενικά, αλλά ιαμικών χοιριδίων (Prieto et al., 1997). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί θνησιμότητα των προσβεβλημένων σιών σε ποσοστό 1-4% (Loula, 1991).

Οι κάπροι κατά την οξεία φάση της νόσου εμφανίζουν παροδική ανορεξία, λήθαργο, πυρετό, συμπτώματα από το αναπνευστικό αλλά και μείωση της γενετήσιας ορμής που συνοδεύεται από μεταβολή της ποιότητας του σπέρματος (Prieto and Castro, 2005). Οι σημαντικότερες ποιοτικές μεταβολές του σπέρματος είναι η μείωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, η αύξηση των μορφολογικών ανωμαλιών των σπερματοζωαρίων και των κυτταροπλασματικών σταγονιδίων αλλά και η μείωση του ποσοστού των σπερματοζωαρίων με φυσιολογικό ακρόσωμα (Prieto and Castro, 2005).

Στην βιβλιογραφία υπάρχουν δύο θεωρίες σχετικά με την δυνατότητα πολλαπλασιασμού του ιού στο γεννητικό σύστημα των κάπρων. Η πρώτη υποστηρίζει ότι η μόλυνση των όρχεων έχει ως στόχο δύο τύπους κυττάρων που μπορεί να πολλαπλασιαστεί ο ιός του ΣΑΑΣΧ. Το επιθήλιο των σπερματικών σωληναρίων (κυρίως σπερματίδες και σπερματοκύτταρα) και τα μακροφάγα των όρχεων. Οι συνέπειες της μόλυνσης των όρχεων είναι ο σχηματισμός πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων από την συνένωση μακροφάγων και ο μαζικός αποπτωτικός θάνατος των σπερματίδων και σπερματοκυττάρων. Ταυτόχρονα αυξάνεται ο αριθμός όλων αυτών των κυττάρων στο σπέρμα (σπερματίδες, σπερματοκύτταρα και γιγαντοκύτταρα), και καθώς περιέχουν τον ιό του ΣΑΑΣΧ πιθανολογείται ότι αυτός είναι ο λόγος της αφοδίσιας μετάδοσης του ιού (Sur et al., 2000). Η δεύτερη θεωρία υποστηρίζει ότι ιός δεν πολλαπλασιάζεται στο γεννητικό σύστημα των κάπρων, αλλά φθάνει στο σπέρμα με τα μακροφάγα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Η άποψη αυτή θα μπορούσε να δικαιολογήσει τη διαλείπουσα



απέκκριση του ιού στο σπέρμα (Prieto and Castro, 2005). Ο μέγιστος χρόνος απέκκρισης του ιού είναι 92 ημέρες μετά την αρχική μόλυνση (Christopher-Hennings et al., 1995).

Η ηλικία των χοιριδίων κατά την οποία εμφανίζεται η μόλυνση από τον ιό του ΣΑΑΣΧ επηρεάζει την εκδήλωση των συμπτωμάτων (Rossow et al., 1994). Τα μολυσμένα χοιρίδια που γεννιούνται ζωντανά μπορούν να παρουσιάσουν ανορεξία, λήθαργο, δύσπνοια, ταχύπνοια, περιοφθαλμικό οίδημα, επιπεφυκίτιδα, διάρροια, κύανωση και νευρικά συμπτώματα (Rossow, 1998). Αντίθετα, σχεδόν όλα τα αδύναμα και ελλιποβαρή χοιρίδια πεθαίνουν σε λίγες ώρες από την γέννηση τους. Όμως καθώς συνεχίζεται η γαλουχία, ορισμένα χοιρίδια είναι δυνατόν να παρουσιάσουν δύσπνοια, απώλεια σωματικού βάρους, απαγωγή των οπισθίων άκρων, απίσχναση, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η θνησιμότητα και να επιβραδύνεται η ανάπτυξη των γαλουχούμενων χοιριδίων που παραμένουν ζωντανά (Keffaber, 1989). Τέλος, τόσο η θνησιμότητα των χοιριδίων όσο και η σοβαρότητα των συμπτωμάτων της νόσου επηρεάζεται από την παρουσία δευτερογενών βακτηριακών επιπλοκών που πιθανόν να περιπλέκουν την κλινική εικόνα.

Στους αναπτυσσόμενους και παχυνόμενους χοίρους τα συμπτώματα αφορούν κυρίως το αναπνευστικό σύστημα και αν συνυπάρχουν και άλλοι παθογόνοι παράγοντες, τότε η έντασή τους είναι μεγαλύτερη. Συνήθως παρουσιάζεται ανορεξία, κακή όψη του τριχώματος, παροδικός πυρετός και καθυστέρηση της ανάπτυξης (White, 1992, Hopper et al., 1992). Πολλές φορές παρατηρείται απλώς ανομοιομορφία στην ανάπτυξη μεταξύ των ζώων της ίδιας ομάδας (White, 1992). Επιπλέον, οι προσβεβλημένοι χοίροι με τον ιό του ΣΑΑΣΧ, αλλά και με δευτερογενείς βακτηριακές επιπλοκές εμφανίζουν το βήχα ως σταθερό κλινικό σύμπτωμα. Θα πρέπει τέλος να αναφερθεί, ότι στο στάδιο των αναπτυσσόμενων-παχυνόμενων χοίρων η νόσος εμφανίζεται συχνά με υποκλινική μορφή (Nodelijk, 2002).

### **1.2.6 Παθολογοανατομικά ευρήματα**

Οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις που οφείλονται στον ιό του ΣΑΑΣΧ ποικίλλουν και εξαρτώνται από το στέλεχος του ιού, το γενετικό υπόβαθρο του ζώου και τυχόν

δευτερογενείς βακτηριακές επιπλοκές (Rossow, 1998). Οι μακροσκοπικές και μικροσκοπικές αλλοιώσεις θεωρούνται περισσότερο έντονες σε νεαρά ζώα μεταξύ 4-28 ημερών μετά την αρχική μόλυνση, και εντοπίζονται κυρίως στους πνεύμονες και τους λεμφαδένες. Επίσης, αλλοιώσεις, κυρίως μικροσκοπικές, βρίσκονται στους νεφρούς, τον εγκέφαλο, την καρδιά και σε άλλα όργανα που επηρεάζονται λιγότερο από τον ιό (Zimmerman et al., 2006).

Παρόλο που οι πνεύμονες αποτελούν σημαντικό όργανο στόχο για τον ιό του ΣΑΑΣΧ, συχνά εμφανίζονται μακροσκοπικά φυσιολογικοί σε περιπτώσεις που δεν υπάρχουν ταυτόχρονες βακτηριακές επιπλοκές (Goyal, 1993). Οι πνεύμονες φέρουν διάχυτες αλλοιώσεις με εστίες σε όλους τους λοβούς. Στην επιφάνειά τους υπάρχουν περιοχές ήπιου αποχρωματισμού, αλλά και σκουρότερες, ιδιαίτερα όταν συνυπάρχουν βακτήρια όπως το *Mycoplasma hyopneumoniae* και η *Pasteurella multocida* (Goyal, 1993). Επιπλέον είναι διογκωμένοι, εμφυσηματικοί και το παρέγχυμά τους συμπαγές. Οι αλλοιώσεις αυτές είναι περισσότερο εμφανείς σε αναπτυσσόμενους – παχυνόμενους χοίρους αλλά και γαλουχούμενα χοιρίδια. Σε νεογέννητα-γαλουχούμενα χοιρίδια μπορεί να παρατηρηθεί οίδημα, υπερπλασία, υπερτροφία και κυστική εκφύλιση των λεμφαδένων (Rossow, 1998). Το μέγεθός τους είναι 2-10 φορές μεγαλύτερο από το φυσιολογικό και η λεμφαδενοπάθεια μπορεί να διαρκέσει περισσότερο από έξι εβδομάδες (Mengeling and Lager, 2000). Σε πειραματικώς μολυσμένα χοιρίδια έχει αναφερθεί λεμφοκυτταρική αγγειίτιδα στον εγκέφαλο και την καρδιά (Goyal, 1993). Τα έμβρυα που είναι μολυσμένα με τον ιό του ΣΑΑΣΧ μπορεί να είναι θνησιγενή, μουμιοποιημένα ή και αυτολυμένα (Lager and Mengeling, 1995). Συνήθως καλύπτονται από στρώμα μηκωνίου και αμνιακού υγρού, ενώ παρατηρείται οίδημα της νεφρικής κάψας, ασκίτης, υδροθώρακας και υδροπεριτόναιο (Mengeling and Lager, 2000, Zimmerman et al., 2006). Επίσης, συχνές μακροσκοπικές αλλοιώσεις είναι εστιακές αιμορραγίες και διόγκωση του ομφάλιου λώρου (Lager and Halbur, 1996).

Η ιστολογική εικόνα του πνεύμονα αποκαλύπτει διάμεση πνευμονία. Τα κυψελιδικά διαφράγματα των πνευμόνων είναι διευρυμένα λόγω διείσδυσης μακροφάγων και λεμφοκυττάρων στις κυψελίδες, αλλά και λόγω υπερπλασίας των κυψελιδικών κυττάρων τύπου II. Αν δεν υπάρχουν επιπλοκές που οφείλονται σε ταυτόχρονες λοιμώξεις από άλλους παθογόνους παράγοντες, οι αλλοιώσεις υποχωρούν 4

εβδομάδες μετά από την έκθεση στον ιό (Zimmerman et al., 2006). Η μικροσκοπική εξέταση της μήτρας συός που απέβαλλε από τον ιό του ΣΑΑΣΧ, χαρακτηρίζεται από μέτριου έως έντονου βαθμού ενδομητρίτιδα και μυομητρίτιδα (Lager and Halbur, 1996). Τέλος, σε 7-25 ημέρες μετά την αρχική μόλυνση από τον ιό του ΣΑΑΣΧ, παρατηρείται ατροφία των σπερματικών σωληναρίων των όρχεων, που συνδέεται με την εμφάνιση πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων και την απόπτωση των γεννητικών κυττάρων (de Mateo Aznar, 2008).

### **1.2.7 Δευτερογενείς επιπλοκές**

Η παρουσία του ιού σε μία εκτροφή χοίρων συχνά προδιαθέτει στην εμφάνιση δευτερογενών βακτηριακών ή ιογενών επιπλοκών. Στα βακτηριακής αιτιολογίας νοσήματα περιλαμβάνονται: η νόσος του Glasser, η ενζωτική πνευμονία, η ατροφική ρινίτιδα, η κολιβακίλλωση, η υπερπλαστική εντεροπάθεια και η σαρκοπτική ψώρα (Loula, 1991, Blaha, 1992). Οι παραπάνω επιπλοκές εμφανίζονται συνήθως στους αναπτυσσόμενους-παχυνόμενους χοίρους αυξάνοντας το ποσοστό θνησιμότητας. Στα ιογενή νοσήματα ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το Σύνδρομο Απίσχνανσης Απογαλακτισμένων Χοιριδίων (ΣΑΑΧ), αιτιολογικός παράγοντας του οποίου είναι ο κυκλοιός τύπου 2 του χοίρου (PCV 2) (Kennedy et al., 2000). Σε εκτροφές που συνυπάρχουν οι δύο ιοί, προκαλείται αύξηση της έντασης των κλινικών συμπτωμάτων και σύγχυση της κλινικής εικόνας.

### **1.2.8 Επιζωοτιολογία του νοσήματος**

#### **1.2.8.1 Γεωγραφική κατανομή του ιού**

Μετά την εμφάνισή του, ο ιός του ΣΑΑΣΧ έχει μέχρι σήμερα εξαπλωθεί στο μεγαλύτερο μέρος του κόσμου. Οι κοινοποιήσεις των χωρών σχετικά με την εμφάνιση της κλινικής νόσου μαζί με ορολογικές δοκιμές που έγιναν, έχουν δώσει από κοινού μία

εικόνα της εξάπλωσης του ιού: Καναδάς 1979, ΗΠΑ 1985, ΕΣΣΔ-Ασίας 1986, Ιαπωνία 1987, Φιλιπίνες 1987, Ταϊλάνδη 1989 και Ευρώπη 1990 (Stadejeck et al., 2007).

Ο ιός του ΣΑΑΣΧ μπορεί να προκαλέσει μια επιζωοτία με την οξεία μορφή του συνδρόμου, ή να ενζωοτεί για καιρό σε μία εκτροφή ή περιοχή (Blaha, 2000). Μέχρι σήμερα η νόσος είναι κυρίως ενζωοτική στις χώρες με υψηλή χοιροτροφία, και εμφανίζει περιστασιακές επιζωοτικές εκρήξεις, με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα (Shi et al., 2010). Εξαιρέση αποτελούν η Αυστραλία, η Νέα Ζηλανδία και η Ελβετία, που σύμφωνα με τον ΟΙΕ είναι ελεύθερες του ιού ΣΑΑΣΧ. Σε ορισμένες χώρες, όπως στη Βολιβία, στη Χιλή, στη Δημοκρατία της Ντομίνικα και στη Ρουμανία, η νόσος περιορίζεται σε περιφερειακό επίπεδο (Beltran-Alcrudo and Lubroth, 2008).

Το πρώτο κρούσμα αναφοράς της νόσου στην Ευρώπη, έγινε το Νοέμβριο του 1990 στο βορειοδυτικό τμήμα της Γερμανίας και σύντομα εξαπλώθηκε σε όλη την Ευρώπη (Meredith, 1995), προκαλώντας «καταιγίδα» αποβολών των εγκύων συών στις εκτροφές (Blaha, 1992, Grosse Beilage et al., 1992). Από τις αρχές του 1991 η νόσος ανιχνεύθηκε σε εκτροφές της Ολλανδίας και ο αιτιολογικός παράγοντας της ενζωοτίας απομονώθηκε στο Κτηνιατρικό Ινστιτούτο του Lelystad, στην Ολλανδία (Wensvoort et al., 1991). Ο ιός που απομονώθηκε ονομάστηκε Lelystad-ιός και θεωρήθηκε το πρότυπο στέλεχος του ευρωπαϊκού γονότυπου (Τύπος I) του ιού του ΣΑΑΣΧ.

Στην Δυτική Ευρώπη ο ιός του ευρωπαϊκού γονότυπου ήταν η αιτία για διάφορα ξεσπάσματα του νοσήματος. Μελέτες ανέφεραν ότι η εισαγωγή «νέων» στελεχών του ιού και η εμμονή των ήδη υπαρχόντων, αποτέλεσαν σημαντικούς παράγοντες πρόκλησης των διαδοχικών κρουσμάτων του συνδρόμου (Balca et al., 2008, Greiser-Wilke et al., 2009, Indik et al., 2000, Pesente et al., 2006, Stadejek et al., 2008). Η εισαγωγή των «νέων» αυτών στελεχών προέρχονταν από ξένες χώρες, λόγω των εμπορικών συναλλαγών των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Πράγματι, ο χαρακτηρισμός των στελεχών που απομονώθηκαν σε χώρες ανατολικά της Πολωνίας, όπως η Λευκορωσία, η Λιθουανία και η Ρωσία, κατέδειξε ότι ο ευρωπαϊκός γονότυπος του ιού αναδύεται από την Ανατολική Ευρώπη (Stadejek et al., 2006) και τα στελέχη του πιθανόν «κυκλοφορούν» στην Δυτική Ευρώπη. Αν και στην πλειοψηφία τους εντοπίζονται στην Ευρώπη, στελέχη του ευρωπαϊκού γονότυπου έχουν εισαχθεί και σε χώρες όπως οι ΗΠΑ, ο Καναδάς, η Ν. Κορέα, η Κίνα και η Ταϊλάνδη (Shi et al., 2010).

Η πρώτη καταγεγραμμένη επιζωοτία του αμερικάνικου γονότυπου (Τύπος II) του ιού ήταν στα τέλη της δεκαετίας του 1980 (Keffaber, 1989). Ο ιός που απομονώθηκε ήταν το πρότυπο στελέχος του αμερικάνικου γονότυπου, το VR-2332. Όμως και άλλα αμερικάνικα στελέχη που απομονώθηκαν την περίοδο εκείνη και σχετίζονταν με το VR-2332, φάνηκε ότι συνδέονταν με την επιζωοτία (Shi et al., 2010).

Στα τέλη του καλοκαιριού του 1996 εμφανίστηκαν αυξημένα κρούσματα του συνδρόμου του ΑΑΣΧ στην νοτιοανατολική Αιόβα που εξαπλώθηκε γρήγορα και σε άλλες πολιτείες των ΗΠΑ. Τα κρούσματα αυτά χαρακτηρίζονταν από αυξημένο ποσοστό αποβολών και θνησιμότητα στις σύες (Bush et al., 1999, Halbur and Bush, 1997). Παραδόξως, πολλές από τις εκτροφές που αντιμετώπισαν την επιζωοτία είχαν εμβολιαστεί με ένα ή και δύο «ζωντανά» εμβόλια (Bush et al., 1999, Halbur and Bush, 1997), αλλά αυτά δεν στάθηκαν ικανά να προστατέψουν τα ζώα. Αυτό μπορεί να οφείλονταν στο γεγονός ότι τα απομονωθέντα στελέχη της επιζωοτίας του ιού, ήταν γενετικώς ετερογενή από τα αντίστοιχα εμβολιακά της εποχής εκείνης (Key et al., 2001). Στα τέλη του 2001 απομονώθηκαν κάποια λοιμογόνα στελέχη, από έναν φαινομενικά στην αρχή νέο ιό του συνδρόμου, στην πολιτεία της Μινεσότα, ΗΠΑ (Han et al., 2006). Στη συνέχεια, βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της αλληλούχησης, διαπιστώθηκε ότι ανήκαν στον αμερικάνικο γονότυπο του ιού του ΣΑΑΣΧ και ότι ήταν στενά συνδεδεμένα με στελέχη που είχαν βρεθεί στον Καναδά στις αρχές του 1990 (Han et al., 2006). Τα απομονωθέντα στελέχη της παραπάνω επιζωοτίας είναι γνωστά με το όνομα MN184, και πιθανόν η προέλευση τους εντοπίζεται σε στελέχη που «κυκλοφορούν» στον Καναδά.

Μια μεγάλη ενζωοτία, με υψηλής λοιμογόνου δύναμης στελέχη εντοπίστηκε για πρώτη φορά το καλοκαίρι του 2006 στην Κίνα. Το σύνδρομο χαρακτηρίστηκε από παρατεταμένο υψηλό πυρετό, ερυθρό χρωματισμό του σώματος και μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας των ενήλικων χοίρων (An et al., 2007). Στους επόμενους 12 μήνες που ακολούθησαν η νόσος εξαπλώθηκε γρήγορα σε περισσότερες από 20 επαρχίες της Κίνας, προκαλώντας τεράστιες απώλειες στην χοιροτροφία της χώρας. Ο αιτιολογικός παράγοντας φάνηκε να είναι μόνο ο ιός του ΣΑΑΣΧ (Zhou et al., 2008), παρόλο που μπορεί άλλοι άγνωστοι παράγοντες να συνέβαλαν στην σοβαρότητα της ασθένειας.

Παρόλο που ο ιός ενζωοτεί σχεδόν παγκοσμίως, είναι πολύ δύσκολο να γίνει μία πραγματική εκτίμηση του επιπολασμού του, διότι η χρήση των υπάρχοντων εμβολίων

καθιστά αδύνατη τη διάκριση, με ορολογικές μεθόδους, μεταξύ εμβολιασμένων και μολυσμένων με φυσική λοίμωξη ζώων. Οι Zimmerman και συνεργάτες, το 2006, εκτίμησαν ότι το ποσοστό των χοιροτροφικών επιχειρήσεων που έχει πληγεί σε μία μολυσμένη, με τον ιό, περιοχή κυμαίνεται στο 60-80%. Στην Ιταλία, ο επιπολασμός των θετικών μονάδων αγγίζει το 90% (Candotti et al., 2006) και η επιζωοτιολογική κατάσταση του συνδρόμου χαρακτηρίζεται από αυξημένη εξάπλωση του ιού σχεδόν σε όλες τις εκτροφές (Cordioli, 2003).

### **1.2.8.2 Μετάδοση και διασπορά**

Οι χοίροι μπορούν να μολυνθούν με τον ιό του ΣΑΑΣΧ μέσω της ρινικής, της στοματικής και της γεννητικής οδού. Ο ιός απεκκρίνεται με το σάλιο, τις ρινικές εκκρίσεις, τα ούρα, το γάλα, τα κόπρανα και το σπέρμα (Prieto and Castro, 2005). Η περίοδος απέκκρισης δεν είναι σταθερή και μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με την οδό απέκκρισης (Wills et al., 1997, Christopher-Hennings et al., 1995). Έτσι σε δείγματα σπέρματος ο ιός έχει ανιχνευθεί από 4 ημέρες (Christopher-Hennings et al., 2001) έως και 92 ημέρες (Christopher-Hennings et al., 1995) μετά την πειραματική μόλυνση κάπρων. Ο ιός μετά από φυσική μόλυνση έχει ανιχνευθεί στο σάλιο για διάστημα 42 ημερών, στον ορό για 210 ημέρες, στα κόπρανα για 38 ημέρες, στα ούρα για 28 ημέρες, σε ρινικά δείγματα για 21 ημέρες και σε στοματοφαρυγγικά επιχρίσματα έως και 157 ημέρες (Benfield et al., 1996, Christianson et al., 1993, Christopher-Hennings et al., 1995).

Η ελάχιστη μολυσματική δόση ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία του ζώου (Hermann et al., 2005), καθιστώντας τα νεαρότερα πιο επιρρεπή σε μολύνσεις (van der Linden et al., 2003). Ένα ζώο είναι δυνατό να μολυνθεί με τον ιό και μέσω των λύσεων συνεχείας του δέρματος, κατά την κοπή της ουράς, την εξαγωγή των δοντιών ή τη χορήγηση κάποιας ουσίας (χρήση ένεσης). Όπως έχει αναφερθεί ο ιός απεκκρίνεται με το σάλιο και έτσι είναι πιθανόν να εισέλθει σε έναν οργανισμό μέσω των δαγκωμάτων της ουράς ή των αυτιών κατά τις διαμάχες μεταξύ των ζώων (Zimmerman et al., 2006).

Η πιο σημαντική πηγή μόλυνσης θεωρείται τα μικροσταγονίδια που απεκκρίνονται από τα μολυσμένα ζώα και εισπνέονται από τα υγιή, ύστερα από άμεση επαφή. Ο ιός μπορεί να μεταδοθεί μέσω μηχανικών φορέων, όπως τα έντομα (μύγες, κουνούπια), το προσωπικό της εκτροφής (ρουχισμός), διάφορους επισκέπτες (κτηνίατροι), που δεν λαμβάνουν τα σωστά μέτρα πρόληψης μετάδοσης λοιμωδών νοσημάτων (Zimmerman et al., 2006, Cho and Dee, 2006). Στους μηχανικούς φορείς ανήκουν και τα οχήματα μεταφοράς των ζώων και θα πρέπει να τηρείται αυστηρά το πρόγραμμα καθαρισμού και απολύμανσής τους (Cho and Dee, 2006). Ο ρόλος των αιωρούμενων σωματιδίων είναι σημαντικός και στη μετάδοση του ιού μεταξύ δύο εκτροφών. Οι Dee και συνεργάτες, το 2009, υποστήριξαν ότι η αερογενής μετάδοση του ιού μεταξύ των εκτροφών είναι εφικτή ακόμη και σε απόσταση έως και 4,7 km, όταν επικρατούν ιδανικές συνθήκες περιβάλλοντος (θερμοκρασία, σχετική υγρασία, ρεύματα αέρα).

Πρέπει να αναφερθεί ότι σημαντικό ρόλο για την παραμονή του ιού στην εκτροφή, έχει η κάθετη μετάδοση του από τη συστατική έμβρυα. Ο ιός μπορεί να διαπεράσει το φράγμα του πλακούντα και να μολύνει τα έμβρυα, ιδίως κατά το τελευταίο τρίτο της κυοφορίας (Christianson et al., 1993, Prieto et al., 1997, Kranker et al., 1998), προκαλώντας τη γέννηση νεκρών, θνησιγενών, αδύναμων και κλινικά υγιών χοιριδίων. Τα φαινομενικά υγιή χοιρίδια είναι υπεύθυνα για την μετάδοση του ιού στα επόμενα στάδια της παραγωγής. Ωστόσο ο ιός μπορεί να πολλαπλασιαστεί στα έμβρυα σε όλα τα στάδια της κυοφορίας, όταν εκείνα μολυνθούν ενδομητριάως (Christianson et al., 1993, Lager and Mengeling, 1995).

Τέλος, μπορεί να αναφερθεί ότι η διατήρηση του ιού σε μία μονάδα οφείλεται, εκτός των άλλων, και στην παρουσία ζώων-φορέων με επίμονη λοίμωξη αλλά και στην εισαγωγή ευπαθών ζώων αναπαραγωγής.

### **1.2.9 Διάγνωση**

Η διάγνωση του ΣΑΑΣΧ είναι σύνθετη καθώς η κλινική εικόνα της νόσου είναι συμβατή και με άλλες ασθένειες του χοίρου, ενώ οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις δεν είναι

παθογνωμονικές και συχνά συγκαλύπτονται από εκείνες που προκαλούνται από άλλα παθογόνα. Είναι λοιπόν αναγκαία, η διαφορική διάγνωση του ΣΑΑΣΧ με άλλα λοιμώδη νοσήματα όπως η νόσος από κυκλοϊό, η νόσος του Aujeszky, η κλασσική πανώλη του χοίρου, η λεπτοσπείρωση, η παρβοϊώση, η εγκεφαλομυοκαρδίτιδα, η ερυθρά, νόσος από κυτταρομεγαλοϊό, η γρίπη, η μεταδοτική γαστρεντερίτιδα. Γίνεται επομένως αντιληπτό, ότι η κλινική εκδήλωση του ΣΑΑΣΧ δεν είναι χαρακτηριστική και είναι απαραίτητη η εργαστηριακή διάγνωση για την επιβεβαίωση της νόσου (Yoon et al., 2003).

Οι μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εργαστηριακή διάγνωση του συνδρόμου του ΑΑΣΧ είναι: Α) οι ορολογικές δοκιμές για την ανίχνευση αντισωμάτων Β) η ανίχνευση του νουκλεϊκού οξέος ή των αντιγόνων (ικές πρωτεΐνες) του ιού και Γ) η απομόνωση του ιού σε καλλιέργεια ζωικών κυττάρων και η ταυτοποίηση του.

Α) Οι δοκιμές για την ανίχνευση των αντισωμάτων κατά του ιού του ΣΑΑΣΧ είναι οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι ELISA (enzyme-linked, immunosorbent assay), ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (indirect immuno-fluorescence assay, IFA), η δοκιμή της ανοσοϋπεροξειδάσης μονής στιβάδας (indirect immunoperoxidase monolayer assay, IPMA) και η οροεξουδετέρωση (seroneutralization, SN). Η απόδοση των παραπάνω μεθόδων εξαρτάται από το αντιγόνο που χρησιμοποιείται στη δοκιμή αλλά και το στάδιο της ασθένειας (Nodelijk , 2002). Σε γενικές γραμμές τα αντισώματα IgM εμφανίζονται 5-7 ημέρες μετά την αρχική μόλυνση και ο τίτλος τους πέφτει κάτω από ανιχνεύσιμα επίπεδα μετά από 2-3 εβδομάδες. Τα IgG παράγονται 7-10 ημέρες μετά την μόλυνση φθάνοντας στην υψηλότερη συγκέντρωση 3 εβδομάδες αργότερα και παραμένουν σταθερά για αρκετούς μήνες. Ενώ τα μητρικά αντισώματα ανιχνεύονται σε χοιρίδια ηλικίας 3-5 εβδομάδων (Zimmerman et al., 2006).

Η ανοσοϋπεροξειδάση μονής στιβάδας ήταν η πρώτη δοκιμή που αναπτύχθηκε στο Lelystad (Wensvoort et al., 1991) και έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί σε όλη την Ευρώπη. Βασίζεται στην ανοσολογική ανίχνευση αντισωμάτων που είναι σταθερά δεσμευμένα σε χοίρεια κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα, μολυσμένα με τον ιό του ΣΑΑΣΧ. Μία παραλλαγή της δοκιμής που ευρέως χρησιμοποιήθηκε στην Β. Αμερική είναι ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (Yoon et al., 1992b, Frey et al., 1992), αλλά και οι δύο τεχνικές παρέχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα. Η δοκιμή της ELISA είναι μία δημοφιλής



τεχνική στα διαγνωστικά εργαστήρια λόγω του χαμηλού της κόστους, της εύκολης εφαρμογής, του χειρισμού μεγάλου αριθμού δειγμάτων και της ταχύτητας εξαγωγής των αποτελεσμάτων. Η έμμεση ELISA αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τους Albina και συνεργάτες το 1992, ενώ αργότερα διερευνήθηκαν μια σειρά από άλλες μορφές της τεχνικής (Houben et al., 1995). Σήμερα, υπάρχουν διάφορα εμπορικά kit ELISA που μπορούν να διαχωρίσουν τα αντισώματα που προέρχονται από στελέχη των δύο γονότυπων του ιού, αλλά και να διαφοροποιούν πρόσφατες από παλαιότερες λοιμώξεις. Όμως, παρόλο που η ELISA είναι ένα καλό διαγνωστικό εργαλείο μπορεί να δώσει, όπως όλες οι αναλυτικές μέθοδοι, ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα σε ποσοστό 1-3 % των δειγμάτων (Keay et al., 2002). Τόσο ο έμμεσος ανοσοφθορισμός όσο και η ανοσοϋπεροξειδάση, είναι τεχνικές που μπορούν να ανιχνεύσουν την ύπαρξη αντισωμάτων νωρίτερα από την ELISA, ωστόσο είναι επίπονες και η ευαισθησία τους εξαρτάται από την ομολογία μεταξύ του στελεχών, το ενός που χρησιμοποιείται στη δοκιμή και του άλλου που έχει προσβληθεί το ζώο (Kim et al., 2007). Η οροεξουδετέρωση είναι μία τεχνική με υψηλή ειδικότητα, αλλά η χρήση της είναι περιορισμένη λόγω της καθυστερημένης εμφάνισης των εξουδετερωτικών αντισωμάτων και διότι η εξουδετέρωση του ιού πιθανόν εξαρτάται από την ομολογία μεταξύ των στελεχών της δοκιμής και της λοίμωξης (Kim et al., 2007).

B) Τα τελευταία χρόνια η καθιέρωση μοριακών διαγνωστικών τεχνικών έχει συνεισφέρει σημαντικά στη διάγνωση του ΣΑΑΣΧ. Οι μέθοδοι της αντίστροφης μεταγραφής – αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (reverse transcriptase – polymerase chain reaction, RT-PCR) και της ένθετης PCR (nested PCR) χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του νουκλεικού οξέος (RNA) του ιού από ομογενοποιημένους ιστούς, ορό αίματος, σπέρμα, πνεύμονα και σάλιο. Οι μοριακές αυτές τεχνικές θεωρείται ότι διαθέτουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, παρέχοντας έτσι πιο ακριβή αποτελέσματα. Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί διάφορες RT-PCRs για την ανίχνευση του RNA των ευρωπαϊκών ή αμερικανικών στελεχών του ιού, καθώς και για την διαφοροποίηση των δύο αυτών τύπων του ιού (Oleksiewicz et al., 1998). Πέρα από τις αναφερόμενες διαγνωστικές μεθόδους, αναπτύχθηκαν και δοκιμές RT-PCR πραγματικού χρόνου real-time (RT-) PCR, που προσφέρουν πιο γρήγορη διάγνωση, με

απλούστερο τρόπο και με μεγαλύτερη ευαισθησία, ενώ παράλληλα είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός του RNA του ιού στο δείγμα.

Η ανίχνευση των αντιγόνων του ιού μπορεί να γίνει με τις μεθόδους της ανοσοϊστοχημείας (immunohistochemistry, IHC) και του άμεσου ανοσοφθορισμού (direct immuno-fluorescent assay, DFA). Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας είναι πιο ευαίσθητη τεχνική από τον άμεσο ανοσοφθορισμό και το μεγάλο πλεονέκτημα είναι ότι μπορεί να γίνει σε ιστούς που διατηρούνται στην φορμόλη, όμως η διάρκεια και το κόστος της είναι μεγαλύτερο από αυτό του άμεσου ανοσοφθορισμού (Yoon et al., 2003).

Γ) Ένα πολύτιμο, αλλά χρονοβόρο, διαγνωστικό εργαλείο θεωρείται ότι είναι η απομόνωση του ιού σε ευαίσθητες κυτταρικές σειρές. Ο ιός του ΣΑΑΣΧ μπορεί να απομονωθεί από διάφορα όργανα, αλλά συνήθως χρησιμοποιούνται ορός αίματος, πνεύμονας, λεμφαδένες και αμυγδαλές. Τα ίδια δείγματα χρησιμοποιούνται και σε περιπτώσεις αποβολών ή πρόωρων τοκετών, μόνο εφόσον προέρχονται από ζωντανά ή θνησιγενή ζώα και όχι από μουμιοποιημένα, καθώς οι διεργασίες αυτόλυσης που λαμβάνουν χώρα μειώνουν την επιβίωση του ιού (Botner et al., 1994). Σε εμμένουσες λοιμώξεις τα δείγματα εκλογής θεωρούνται οι αμυγδαλές και τα επιχρίσματα φαρυγγικών λεμφαδένων (Zimmerman et al., 2006). Ο ιός του ΣΑΑΣΧ μπορεί να απομονωθεί σε πρωτογενείς κυτταρικές σειρές από χοίρεια κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα προερχόμενα από SPF (Specific Pathogen Free) χοίρους ηλικίας μικρότερης των 4-6 εβδομάδων (Wensvoort et al., 1991). Επιπλέον, απομονώνεται σε συνεχείς κυτταρικές σειρές, με πιο γνωστές τις MA-104 και MARC-145. Υπάρχουν όμως ορισμένα στελέχη του ευρωπαϊκού γονότυπου που δυσκολεύονται να αναπτυχθούν στην MARC-145, γι αυτό είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται και οι δύο τύποι κυττάρων για την απομόνωση του ιού (Dewey et al., 2000, Yoon et al., 2003). Το κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα είναι ορατό μετά από 3-5 ημέρες επώασης στα PAM κύτταρα, όμως είναι πιθανό να καθυστερήσει όταν χρησιμοποιείται η συνεχής κυτταρική σειρά MARC-145. Η απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με άμεσο ανοσοφθορισμό, ανοσοϋπεροξειδάση ή αντίστροφης μεταγραφής PCR. Τονίζεται ότι το σπέρμα κάπρων λόγω της κυτταροτοξικότητάς του δεν χρησιμοποιείται για απομόνωση του ιού, αλλά μόνο για ανίχνευση του RNA του ιού (Mengeling and Lager, 2000).

## 1.3 Πρόληψη και έλεγχος

### 1.3.1 Εμβόλια

Η ταχεία εξάπλωση του ιού του ΣΑΑΣΧ και οι μεγάλες οικονομικές επιπτώσεις που προκάλεσε στην παγκόσμια χοιροτροφία, οδήγησαν στην ανάγκη λήψης αποτελεσματικών μέτρων πρόληψης και ελέγχου της νόσου. Στα μέτρα αυτά ανήκουν και τα εμβόλια, που έχουν ως στόχο την τόνωση της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή και όχι την πρόληψη του από την μόλυνση. Αναπτύχθηκαν δύο τύποι εμβολίων κατά του ιού του ΣΑΑΣΧ, τα «ζωντανά» ή ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης (ΕΛΔ) εμβόλια και τα «νεκρά» ή αδρανοποιημένα εμβόλια.

Το πρώτο αδρανοποιημένο εμβόλιο κατά του ΣΑΑΣΧ, κυκλοφόρησε στην Ισπανία το 1993 και ήταν το Cyblue® (Lab Ford Dodge). Μέχρι σήμερα έχουν υπάρξει διαθέσιμα στην αγορά αρκετά «νεκρά» εμβόλια, όμως η χρήση τους σε κάποιες χώρες, όπως στις ΗΠΑ, είναι περιορισμένη. Το κύριο πλεονέκτημα τους είναι η ασφάλεια τους, ενώ η αποτελεσματικότητά τους έχει αμφισβητηθεί από πολλούς ερευνητές. Μετά την κυκλοφορία του πρώτου αδρανοποιημένου εμβολίου, μελέτες ανέφεραν ότι υπήρξε σημαντική βελτίωση του αριθμού των απογαλακτισθέντων χοιριδίων ανά χοιρομητέρα ανά έτος, λόγω της αποτελεσματικής προστασίας των συών από την αναπαραγωγική μορφή του συνδρόμου (Plana-Durán et al., 1997). Αντιθέτως, υπήρξαν ερευνητές που υποστήριξαν ότι το εμβόλιο δεν παρείχε αποτελεσματική προστασία. Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι το εμβόλιο δεν ήταν ικανό να αποτρέψει την ιαιμία και την κάθετη μόλυνση σε νεαρές εμβολιασμένες σύες που εκτέθηκαν στον ιό κατά το χρόνο της σύλληψης, οδηγώντας σε αύξηση του αριθμού των νεκρών και θνησιγενών χοιριδίων (Prieto et al., 1997, Scotti et al., 2007). Γενικά, υποστηρίζεται ότι τα αδρανοποιημένα εμβόλια δεν είναι αποτελεσματικά ή έχουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα έναντι ομόλογης λοίμωξης και πιθανόν αυτό να οφείλεται στην αδύναμη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος που προκαλούν (Lunney et al., 2010). Ωστόσο, υπάρχουν έρευνες όπου παρατηρήθηκε ότι ο εμβολιασμός των συών με ομόλογο «νεκρό» εμβολιακό στέλεχος, βελτίωσε τις αναπαραγωγικές αποδόσεις των ζώων σε εκτροφές που «κυκλοφορεί» ο ιός (Reynaud et al., 2000) και συνέβαλλε στον έλεγχο της κλινικής εκδήλωσης του συνδρόμου (Alexopoulos et al., 2005, Papatsiros et al., 2006). Επιπλέον,

αντιφατικά είναι τα βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά στην πρόκληση παραγωγής εξουδετερωτικών αντισωμάτων από τα αδρανοποιημένα εμβόλια. Οι Vanhee και συν., το 2009, υποστήριξαν ότι τα αδρανοποιημένα εμβόλια δεν επάγουν την παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων, και ότι αυτό ίσως να εξαρτάται από την διαδικασία αδρανοποίησης του εμβολίου. Αντιθέτως, σε μελέτη αναφέρεται ότι υπήρξε αύξηση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων, ύστερα από εμβολιασμό μολυσμένων ζώων με «νεκρό» εμβόλιο (Nilubol et al., 2004). Καθώς, τα εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι του ιού του ΣΑΑΣΧ, θεωρείται ότι εμποδίζουν τη μόλυνση και την κάθετη μετάδοση σε έγκυες σύες, ερευνητές υποστηρίζουν ότι ένα «νεκρό» εμβόλιο που προκάλεσε την παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων, δεν μπόρεσε να προστατεύσει τα ζώα ύστερα από *in vivo* μόλυνση με τον ιό του ΣΑΑΣΧ παρέχοντας μερική μόνο προστασία (Zuckermann et al., 2007). Παρόλα αυτά, χρησιμοποιήθηκε το αδρανοποιημένο εμβόλιο Progressis® (Merial) και διαπιστώθηκε ότι προκαλεί έντονη κυτταρική ανοσία στις σύες (Piras et al., 2005). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι ο εμβολιασμός των κάπρων με «νεκρό» εμβόλιο, δεν μπόρεσε να μειώσει τη διάρκεια της ιαιμίας και την απέκκριση του ιού με το σπέρμα, κατόπιν μόλυνσης τους με φυσικό ιό (Nielsen et al., 1997).

Τα ΕΛΔ εμβόλια που είναι σήμερα (2011) εμπορικά διαθέσιμα, περιέχουν στελέχη του ευρωπαϊκού αλλά και του αμερικάνικου γονότυπου του ιού και η «κυκλοφορία» τους επιτρέπεται και στις δύο ηπείρους (Ευρώπη και Αμερική). Το πρώτο ΕΛΔ εμβόλιο, το RespPRRS®, κυκλοφόρησε στις ΗΠΑ το Νοέμβριο του 1994 από την εταιρία Boehringer Ingelheim Animal Health, και προοριζόταν για χρήση σε αναπτυσσόμενους χοίρους με στόχο τον έλεγχο της αναπνευστικής μορφής του συνδρόμου. Το ίδιο εμβόλιο εγκρίθηκε αργότερα και για χρήση στα θηλυκά ζώα αναπαραγωγής (RespPRRS® Repro), ενώ σήμερα κυκλοφορεί με την εμπορική ονομασία Ingelvac® PRRS MLV σε χώρες της Ευρώπης, όπως η Ολλανδία, η Γερμανία και η Ισπανία. Από την κυκλοφορία του πρώτου αυτού εμβολίου μέχρι σήμερα, έχουν διατεθεί στην αγορά μια σειρά από «ζωντανά» εμβόλια σε Ευρώπη και ΗΠΑ (Mengeling, 2005).

Σε ότι αφορά τα ΕΛΔ εμβόλια, υπάρχουν ερωτήματα τόσο για την ασφάλεια, όσο και για την αποτελεσματικότητά τους. Μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν εμβόλια που περιείχαν στελέχη του ευρωπαϊκού ή αμερικάνικου γονότυπου του ιού, έδειξαν ότι ο

εμβολιακός ιός μπορεί να πολλαπλασιαστεί προκαλώντας ιαιμία στα εμβολιασμένα ζώα, που διατηρείται για αρκετές εβδομάδες (Lager et al., 1997a, Mengeling et al., 2003). Επιπλέον, ο ιός των «ζωντανών» εμβολίων μπορεί να επανακτήσει τη λοιμογόνο δύναμη του στελέχους από το οποίο προήλθε, να απεκκριθεί και να μολύνει τα ανεμβολίαστα ζώα (Opriessnig et al., 2002, Mortensen et al., 2002). Η μετάδοση μπορεί να είναι και κάθετη, αφού ο εμβολιακός ιός μπορεί να διαπεράσει τον πλακούντα και να μολύνει τα έμβρυα (Scotti et al., 2006a). Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί η περίπτωση της Δανίας, που ήταν η πρώτη Ευρωπαϊκή χώρα που το 1996 χρησιμοποίησε ΕΛΔ εμβόλιο που περιείχε αμερικάνικο στέλεχος του ιού. Το εμβόλιο χρησιμοποιήθηκε σε σύες και απογαλακτισμένα χοιρίδια σε οροθετικές εκτροφές (Done, 2001). Έτσι, το στέλεχος εισήχθη και άρχισε να «κυκλοφορεί» στις εκτροφές της χώρας, επανέκτησε τη λοιμογόνο του δύναμη και προκάλεσε ευρεία διασπορά του συνδρόμου (Mortensen et al., 2002, Nielsen et al., 2001) με τεράστιες οικονομικές ζημιές. Επίσης, αναφέρεται ότι αν σε μία εκτροφή χρησιμοποιηθεί για πρώτη φορά ΕΛΔ εμβόλιο, τότε παρατηρείται αύξηση του αριθμού των θνησιγενών και μουμιοποιημένων χοιριδίων, ειδικότερα όταν ο εμβολιασμός των συών γίνεται μετά την 60<sup>η</sup> ημέρα της κυοφορίας (Dewey et al., 1999). Ο ΕΛΔ εμβολιακός ιός μπορεί να βρεθεί και στο σπέρμα των εμβολιασμένων κάπρων και να προκαλέσει αλλοιώσεις μειώνοντας την ποιότητα του, ενώ είναι πιθανή η μετάδοση του στις σύες (Christopher-Hennings et al., 1997, Nielsen et al., 1997). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ένα βασικό πρόβλημα των «ζωντανών» εμβολίων είναι ο πιθανός ανασυνδιασμός των εμβολιακών με τα «κυκλοφορούντα» στελέχη του ιού. Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, ύστερα από την επιζωοτία του 2006 στην Κίνα, απομονώθηκε ένα νέο στέλεχος του ιού του ΣΣΑΣΧ, που ονομάστηκε Em2007. Διαπιστώθηκε ότι το Em2007 είναι ένα φυσικό ανασυνδιασμένο στέλεχος μεταξύ ενός «ζωντανού» εξασθενημένου εμβολίου CH-1R) και ενός υψηλής λοιμογόνου δύναμης στελέχους (WUH1). Μέχρι τότε, υπήρχαν απλώς μελέτες που ανέφεραν ότι μπορεί να συμβεί γενετικός ανασυνδιασμός μεταξύ εμβολιακών στελεχών του ιού που καλλιεργούνται μαζί (Murtaugh et al., 2002). Έτσι, η απομόνωση του Em2007 κατέδειξε ότι τα «ζωντανά» εμβόλια έχουν την ικανότητα να διαμορφώσουν την εξέλιξη του ιού, μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού με τα «κυκλοφορούντα» στελέχη του ιού (Li et al., 2009).

Όσον αφορά στην αποτελεσματικότητα των ΕΛΔ εμβολίων, τα εμβόλια αυτά, παρόλα τα μειονεκτήματα, είναι περισσότερο αποτελεσματικά από τα «νεκρά», μειώνοντας την σοβαρότητα της κλινικής εκδήλωσης της νόσου καθώς και τη διάρκεια της ιαμίας, ειδικά όταν η μόλυνση προκαλείται από ομόλογα στελέχη του ιού. Ωστόσο, κανένα από τα υπάρχοντα εμπορικά εμβόλια δεν είναι σε θέση να εξαλείψει εντελώς τη λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος, τη μετάδοση του ιού μέσω του πλακούντα, καθώς και την μετάδοση του από ζώο σε ζώο (Murtaugh et al., 2002). Πράγματι, σε έρευνα κατά την οποία πραγματοποιήθηκε σύγκριση τριών εμπορικών εμβολίων ως προς την ικανότητα τους να παρέχουν προστασία έναντι υψηλής λοιμογόνου δύναμης στελεχών του ιού, διαπιστώθηκε ότι και τα τρία παρείχαν προστασία έναντι της κλινικής εκδήλωσης της νόσου, αλλά όχι έναντι της μόλυνσης από τον ιό (Osorio et al., 1998). Ομοίως, οι Cano και συνεργάτες, το 2007, μελέτησαν την αποτελεσματικότητα ενός ΕΛΔ εμβολίου, σε έναν πληθυσμό που ήταν ήδη μολυσμένος με ετερόλογο στέλεχος του ιού και διαπίστωσαν ότι το εμβόλιο δεν εξάλειψε τον ιό του συνδρόμου, αλλά μείωσε τον αριθμό των επίμονα μολυσμένων ζώων με ομόλογο στέλεχος. Στην πραγματικότητα, η αποτελεσματικότητα των ΕΛΔ εμβολίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη γενετική ομοιότητα μεταξύ του εμβολιακού ιού και του στελέχους που προκαλεί την λοίμωξη (Meng, 2000). Αυτό συμβαίνει διότι η αντιγονική ποικιλομορφία των στελεχών του ιού καθιστά τα σημερινά «ζωντανά» εμβόλια που αποτελούνται από ένα μόνο στέλεχος, σχεδόν μη αποτελεσματικά να παρέχουν ικανοποιητική προστασία έναντι ετερόλογου στελέχους. Μία από τις κύριες συνέπειες της έντονης μεταβλητότητας που παρατηρείται μεταξύ των στελεχών του ιού του ΣΑΑΣΧ, είναι η έλλειψη της διασταυρούμενης προστασίας ανάμεσα στα στελέχη του. Το γεγονός αυτό αναφέρεται σε διάφορες πειραματικές μελέτες, όπου ζώα ύστερα από φυσική μόλυνση ανέπτυξαν ανοσία ικανή να τους προστατέψει από μία εκ νέου μόλυνση με το ίδιο στέλεχος του ιού (Lager et al., 1997, 1999, Mengeling et al., 2003). Ωστόσο, όταν χοίροι με φυσική ανοσία εκτέθηκαν σε ετερόλογο στέλεχος, η προστασία τους ήταν λιγότερο πλήρης και σταθερή (μερική) (Lager et al., 1999).

Εκτός των προαναφερθέντων, υπάρχουν έρευνες που αναφέρουν ότι τα ΕΛΔ εμβόλια δεν είναι πλήρως αποτελεσματικά, ακόμη και όταν ο εμβολιακός ιός ανήκει στον ίδιο γονότυπο με το στέλεχος του ιού που προκαλεί την λοίμωξη. Σε σχετικές

έρευνες αναφέρεται, ότι όταν αναπτυσσόμενοι χοίροι που εμβολιάστηκαν με στέλεχος του “Lelystad-like” υποτύπου του ευρωπαϊκού γονότυπου, και εν συνεχεία μολύνθηκαν με στέλεχος του ιταλικού υποτύπου του ίδιου γονότυπου (ευρωπαϊκού), η προστασία ήταν μόνο μερική, με μειωμένη τη διάρκεια της ιαμίας και το ιικό φορτίο στους πνεύμονες (Labarque et al., 2004). Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και πολλοί άλλοι ερευνητές.

Με βάση τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα, είναι σαφές ότι τα εμβόλια έναντι του ιού του συνδρόμου, δεν είναι τόσο αποτελεσματικά όσο αναμένονταν. Στην πραγματικότητα τα μέχρι σήμερα εμπορικά διαθέσιμα εμβόλια, αδυνατούν να παρέχουν πλήρη προστασία από την νόσο, κυρίως έναντι ετερόλογων μολύνσεων. Το φαινόμενο αυτό πιθανολογείται ότι οφείλεται στην έλλειψη αποτελεσματικού ανοσολογικού ελέγχου της νόσου, που καθορίζεται από την έντονη μεταβλητότητα του ιού και την αλληλεπίδραση του με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, είναι επιτακτική ανάγκη η παρασκευή εμβολίων που θα είναι πλήρως αποτελεσματικά έναντι της μόλυνσης από τον ιό του ΣΑΑΣΧ. Οι ιδιότητες που θα πρέπει να περιλαμβάνει ένα βελτιωμένο εμβόλιο έναντι του ιού του συνδρόμου, είναι η ταχεία διέγερση της έμφυτης ανοσίας, η έλλειψη ανεπιθύμητων παρενεργειών και ο η ικανότητα να διαχωρίζει τα εμβολιασμένα από τα μολυσμένα με φυσική λοίμωξη, ζώα (εμβόλια DIVA, Differentiating Infected from Vaccinated Animals) (de Lima et al., 2008, Fang et al., 2008).

Μία ιδιαίτερη πρόκληση για κάθε μελλοντικό εμβόλιο είναι να εμποδίσει την κάθετη και οριζόντια μόλυνση στις εκτροφές αναπαραγωγής, πριν τον απογαλακτισμό των χοιριδίων (Dee and Philips, 1999). Επιπλέον, ιδιαίτερα σημαντική είναι και η ασφάλεια των μελλοντικών εμβολίων, κυρίως των «ζωντανών». Παρόλο που ο ιός του ΣΑΑΣΧ δεν προκαλεί ανοσοκαταστολή, οποιοδήποτε μελλοντικό εμβόλιο δεν θα πρέπει να διευκολύνει την πρόκληση νόσου από άλλα παθογόνα. Υπήρξε μελέτη όπου χοιρίδια που μολύνθηκαν κάθετα με τον ιό του συνδρόμου και δεν έλαβαν πρωτόγαλα, εμφάνισαν σοβαρή νόσο ύστερα από ταυτόχρονη μόλυνση με *Streptococcus suis* (Murtaugh et al., 2002). Οι παρατηρήσεις αυτές προκαλούν ανησυχίες σχετικά με τις δυνατότητες αλληλεπίδρασης του ιού με άλλα παθογόνα. Συνοψίζοντας, είναι φανερό ότι υπάρχει επείγουσα ανάγκη για ένα ασφαλές και πιο αποτελεσματικό εμβόλιο έναντι του ιού του

ΣΑΑΣΧ και ότι οι αναπτυσσόμενες στρατηγικές για τη δημιουργία ενός τέτοιου εμβολίου αποτελούν πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα (Kimman et al., 2009).

### 1.3.2 Μέτρα βιοασφάλειας

Ο εμβολιασμός αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο του συνδρόμου, όμως για να αποτραπεί η είσοδος ενός στελέχους του ιού σε μία εκτροφή θα πρέπει να τηρούνται αυστηρά μέτρα βιοασφάλειας. Ένα πολύ κρίσιμο σημείο για την πρόληψη της νόσου είναι η απομόνωση και ο ορολογικός έλεγχος των νεαρών ζώων αντικατάστασης πριν από την είσοδό τους σε μία εκτροφή που είναι αρνητική από τον ιό του ΣΑΑΣΧ. Σε έρευνα διαπιστώθηκε ότι η πιο συχνή πηγή μόλυνσης μιας εκτροφής, είναι η εισαγωγή ζώων αντικατάστασης που μεταφέρουν ένα νέο στέλεχος του ιού, παρά η μετάλλαξη των ήδη υπάρχοντων στελεχών (Pesente et al., 2006). Γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να υπάρχει ειδικό κτίριο «καραντίνα» όπου θα παραμένουν τα ζώα για τουλάχιστον 30 ημέρες και θα πραγματοποιούνται οι κατάλληλες εξετάσεις. Τα ζώα αυτά θα πρέπει να αγοράζονται από εκτροφές που είναι πιστοποιημένα αρνητικές στον ιό. Το ίδιο πρέπει να ισχύει και για τις εκτροφές που προμηθεύονται σπέρμα για τεχνητή σπερματέγχυση (ΤΣ) στις σύες αναπαραγωγής. Αυτό θα πρέπει να προέρχεται από πιστοποιημένα κέντρα ΤΣ. Επιπλέον, βασικό μέτρο ελέγχου της νόσου είναι η αξιολόγηση της παρουσίας του ιού σε μία εκτροφή. Η καταγραφή του ορολογικού προφίλ της εκτροφής γίνεται με περιοδικές αιματοληψίες σε τυχαίους χοίρους και με την χρήση, συνήθως, της τεχνικής ELISA. Οι ορολογικές αυτές εξετάσεις δείχνουν την ανάπτυξη αντισωμάτων κατά του ιού. Σε διάφορες εκμεταλλεύσεις για την αποτροπή της οριζόντιας μετάδοσης του ιού έχουν εφαρμοσθεί μέθοδοι όπως ο μερικός αποπληθυσμός των ζώων, κυρίως όταν ο ιός εντοπίζεται σε συγκεκριμένο παραγωγικό στάδιο (Dee and Joo, 1994a). Επίσης, η εκτροφή των χοίρων κατά ομάδες («όλα μέσα-όλα έξω» «all in-all out»), μειώνει την καταπόνηση των ζώων άρα και την πιθανότητα δευτερογενών λοιμώξεων, καθώς και το μικροβιακό φορτίο της εκτροφής αφού εφαρμόζονται αποτελεσματικότερα τα προγράμματα απολύμανσης των σταβλικών εγκαταστάσεων. Η μετάδοση του ιού του ΣΑΑΣΧ εκτός από ζώο σε ζώο μπορεί να συμβεί και μεταξύ διαφορετικών εκτροφών.



Έτσι, στις στρατηγικές ελέγχου του νοσήματος πρέπει να δίνεται προσοχή στο προσωπικό της εκτροφής, στον εξοπλισμό, στους επισκέπτες που μπορεί να μετακινούνται από εκτροφή σε εκτροφή (Zimmerman et al., 2006).

Ένας ακόμη παράγοντας κινδύνου είναι η γειτνίαση με μολυσμένες από τον ιό εκτροφές. Βέβαια ο κίνδυνος αυτός μειώνεται καθώς μεγαλώνει η απόσταση μεταξύ των εκτροφών (Zhuang et al., 2002). Ωστόσο, δε θα πρέπει να υποτιμάται η εξάπλωση του ιού σε μία περιοχή μέσω του αέρα ελλείψει άλλων πηγών μόλυνσης, όπως η μετακίνηση μολυσμένων χοίρων, σπέρματος, αντικειμένων και επισκεπτών (Dee et al., 2006, Pitkin et al., 2009). Στις ΗΠΑ ο φόβος αυτός της μετάδοσης του ιού οδήγησε στην έγκριση και στη χρήση εξειδικευμένων συστημάτων διηθήσεως του αέρα, σε περιοχές με μεγάλη πυκνότητα χοιροτροφικών εκμεταλλεύσεων (COST Action 902, 2010).

Σε διάφορες πειραματικές μελέτες υποστηρίζεται ότι τελικά ο ιός εξαλείφεται από τον οργανισμό του ξενιστή και η επίμονη λοίμωξη σπάνια διαρκεί πάνω από 200 ημέρες (Murtaugh, 2009). Στις ΗΠΑ χρησιμοποίησαν αυτές τις πληροφορίες για να αναπτύξουν την έννοια της «κλειστής εκτροφής», σε μια προσπάθεια εξάλειψης του ιού από περιοχές όπου η πυκνότητα των χοιροτροφικών εκμεταλλεύσεων ήταν χαμηλή. Στην «κλειστή εκτροφή» όλα τα ζώα εκτίθενται στον ιό του ΣΑΑΣΧ μέσω εμβολιασμού και στη συνέχεια η εκτροφή παραμένει «κλειστή» στην εισαγωγή ζώων για 200 ημέρες. Όταν νεαροί θηλυκοί χοίροι εισέλθουν στην εκτροφή παραμένουν αρνητικοί στον ιό. Σε περίπτωση νέου κρούσματος τότε ο ιός είναι σχεδόν πάντα από διαφορετικό γονότυπο, δημιουργώντας νέο ξέσπασμα του συνδρόμου (Murtaugh, 2009).

Η γενετική επιλογή των χοίρων με βάση τις διάφορες παραγωγικές παραμέτρους δεν ήταν έντονη για πολλά χρόνια. Για το λόγο αυτό, υπήρχαν ανθεκτικές φυλές έναντι του ιού του ΣΑΑΣΧ, παρόλο που ο ιός «κυκλοφορούσε» σε Ευρώπη και Αμερική. Η έντονη όμως γενετική επιλογή των ζώων που γίνεται τα τελευταία χρόνια, αποτέλεσε την αιτία για περαιτέρω έρευνα, ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν γονίδια του ξενιστή (χοίροι) που ελέγχουν την ανθεκτικότητα ή την ευαισθησία του στη μόλυνση από τον ιό του ΣΑΑΣΧ. Οι διαφορές μεταξύ των φυλών φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ανθεκτικότητα ή στην ευαισθησία των χοίρων στη μόλυνση από τον ιό (Lunney and Chen, 2010). Πράγματι, σε πολλές μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι χοίροι που ανήκουν στις φυλές Meishan ή Large White είναι περισσότερο ανθεκτικοί στις επιπτώσεις από τον ιό

του ΣΑΑΣΧ, από τους αντίστοιχους της φυλής Duroc ή Pietrain (Halbur et al., 1998, Reiner et al., 2010).

Ο ιός του ΣΑΑΣΧ έχει έναν πολύ δυναμικό χαρακτήρα στη φύση, καθώς εξελίσσεται συνεχώς και με γρήγορους ρυθμούς, δημιουργώντας «νέα στελέχη» και επεκτείνοντας την ποικιλομορφία του. Ως εκ τούτου, οι στρατηγικές πρόληψης και ελέγχου του συνδρόμου πρέπει να συμβαδίζουν με την δυναμική του ιού χρησιμοποιώντας τη βοήθεια της φυλογενετικής ανάλυσης, της ποικιλομορφίας, της επιζωοτιολογίας και της εξελικτικής του ιστορίας (Shi et al., 2010).

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **1. ΣΚΟΠΟΣ**

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η μοριακή διερεύνηση της παρουσίας του ιού του ΣΑΑΣΧ σε εκτροφή με συμβατή κλινική εικόνα και ο μοριακός χαρακτηρισμός του.

Παρόλο που μέχρι σήμερα στην Ελλάδα έχει διαπιστωθεί έμμεσα η «κυκλοφορία» του ιού σε ελληνικές εκτροφές, με την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων σε εμβολιασμένα και μη ζώα (Xylouri, 1993, Kyriakis et al., 1996, Papatsiros et al., 2006, Kritis, 2011), δεν υπάρχει καμία επίσημη αναφορά ανίχνευσης του ιού με μοριακές τεχνικές, ή και απομόνωσής του σε κύτταρα. Έτσι πρωταρχικός στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανίχνευση του ιού με μοριακές μεθόδους και ο μοριακός χαρακτηρισμός του.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Ιστορικό εκτροφής**

Κατά την συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ζώα που προέρχονταν από χοιροτροφική μονάδα του νομού Αττικής. Η εκτροφή είναι δυναμικότητας 270 συών με κλινική εικόνα προβλημάτων στην αναπαραγωγή. Συγκεκριμένα, από τον Ιανουάριο έως το Νοέμβριο του 2010, παρατηρήθηκε ανορεξία, πυρετός και κατάπτωση στις μισές περίπου χοιρομητέρες της εκτροφής, σε όλα τα στάδια αναπαραγωγής. Στα 15 ζώα με την παραπάνω κλινική εικόνα υπήρξε θανατηφόρος κατάληξη, ενώ 20 απέβαλλαν νεκρά χοιρίδια. Επιπλέον, 20 χοιρομητέρες είχαν σχετικά πρόωρο τοκετό και κάποιες τοκετοομάδες αποτελούνταν εξ' ολοκλήρου από νεκρά χοιρίδια, ενώ άλλες από νεκρά, θνησιγενή και κλινικά φυσιολογικά χοιρίδια. Από τις 140 σύες που εμφάνισαν συμπτωματολογία, οι 84 παρουσίασαν άνοιτρο μετά τον τοκετό ή την αποβολή, που διήρκεσε έως και 2 μήνες (Πίνακας 1). Στην εκτροφή υπάρχει και ένας μικρός αριθμός κάπρων, που χρησιμοποιούνται για σπερματοληψία. Στην εκτροφή γίνονται εμβολιασμοί για τον ιό του ΣΑΑΣΧ, για Παρβοϊώση, για Ερυθρά και για τη

νόσο του Aujeszky. Για το σύνδρομο του ΑΑΣΧ, γίνεται το «ζωντανό» εμβόλιο Porcilis PRRS® (Intervet), στις σύες 7 ημέρες μετά από κάθε τοκετό. Στις νεαρές σύες αντικατάστασης γίνεται χορήγηση του ίδιου εμβολίου στην ηλικία των 60-70 ημερών, επαναληπτική δόση στην ηλικία των 6,5 μηνών και εν συνεχεία, 7 ημέρες μετά από κάθε τοκετό. Οι κάπροι της εκτροφής εμβολιάζονται 2 φορές ετησίως με το ίδιο εμβόλιο.

**Πίνακας 1.** Τιμές και ποσοστά (επί του συνόλου των συών) ζώων της εκτροφής.

	Σύνολο συών	Νοσηρότητα συών (γενικά συμπτώματα)	Αποβολές και γέννηση νεκρών χοιριδίων	Γέννηση θνησιγενών, νεκρών & φυσιολογικών χοιριδίων	Θνησιμότητα συών	Σύες που εμφάνισαν άνοιστρο
	270					
Αριθμός συών		140	20	20	15	84
Ποσοστά (%)		51,8	7,4	7,4	5,5	31,1

## 2.2 Στοιχεία των ζώων

Στην συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκε παθολογικό υλικό από 40 ζώα, σύες και χοιρίδια. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε υλικό από 17 χοιρομητέρες με κλινική εικόνα προβλημάτων στην αναπαραγωγή και 23 χοιρίδια. Από τα 23 χοιρίδια, τα 20 ήταν προϊόντα αποβολής και τα 3 ήταν θνησιγενή. Τα χοιρίδια προέρχονταν από 6 αποβολές και 2 τοκετούς (Παράρτημα πίνακας 1). Η μελέτη περιλάμβανε την εξέταση δειγμάτων σιέλου από τις 17 σύες και δειγμάτων πνευμόνων, σπλήνα, καρδιάς και νεφρών από τα 23 χοιρίδια (αποβληθέντα και θνησιγενή). Ενώ, από τα 3 θνησιγενή χοιρίδια εξετάστηκε επιπλέον και δείγμα ορού αίματος. Η δειγματοληψία έλαβε χώρα από τον Ιανουάριο έως το Νοέμβριο του 2010.

Από κάθε ζώο λαμβάνονταν παράλληλα το ιστορικό που αφορούσε στην ηλικία του, στη φυλή, στο αναπαραγωγικό στάδιο που βρισκόταν, στο νοσολογικό ιστορικό, καθώς και στην τυχόν εφαρμογή εμβολιασμών. Επιπλέον, λαμβάνονταν πληροφορίες σχετικά με τα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν και τα ευρήματα της κλινικής εξέτασης.

### **2.3 Δειγματοληψία**

Σύες : Από τις σύες που εμφάνιζαν ανορεξία, λήθαργο, κατάπτωση και πυρετό, λαμβάνονταν σίελος με χρήση αποστειρωμένου βαμβακοφόρου στυλεού, μη εμποτισμένου σε υγρό μεταφοράς, από την στοματική κοιλότητα. Όλες οι σύες κυοφορούσαν. Οι βαμβακοφόροι στυλεοί ακολούθως καταψύχονταν στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  και μεταφέρονταν στο εργαστήριο εντός περίπου 60-90 λεπτών από τη δειγματοληψία, με χρήση ισοθερμικών κιβωτίων και κατεψυγμένων παγοκύστεων, οι οποίες τοποθετούνταν σε άμεση επαφή με τα δείγματα. Στο εργαστήριο τα δείγματα αποθηκεύονταν άμεσα στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , μέχρι την εξέτασή τους, καθώς και μετά το πέρας αυτής.

Χοιρίδια : Τα αποβληθέντα χοιρίδια καταψύχονταν στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  και η μεταφορά τους στο εργαστήριο ακολουθούσε την προαναφερθείσα διαδικασία. Στο εργαστήριο ακολουθούσε νεκροτομή του ζώου, λήψη φωτογραφιών, καταγραφή των νεκροτομικών ευρημάτων και συλλογή των οργάνων του κάτω από άσηπτες συνθήκες. Τα όργανα τοποθετούνταν σε αποστειρωμένους περιέκτες με κατάλληλη σήμανση και αποθηκεύονταν στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , μέχρι την εξέτασή τους, καθώς και μετά το πέρας αυτής. Τα τρία θνησιγενή χοιρίδια μεταφέρθηκαν μόλις γεννήθηκαν, στο χώρο του εργαστηρίου, έγινε λήψη αίματος από την καρδιά και στη συνέχεια ακολούθησε η συλλογή και η αποθήκευση των οργάνων τους με την προαναφερθείσα διαδικασία.

### **2.4 Εκχύλιση ιικού RNA από το σίελο, τα όργανα και τον ορό αίματος**

Για την εκχύλιση του ιικού RNA από το σίελο γινόταν αραίωση των δειγμάτων 1:100 με χρήση φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS, Sigma-Aldrich, USA) και

ομογενοποίηση με χρήση οργάνου ανατάραξης (Vortex, Bio-Rad Laboratories Srl, Italy). Ακολουθούσε φυγοκέντρηση των αραιωμένων δειγμάτων στα 8000g επί 5 min, ώστε να καθιζήσουν τα μη διαλυτά στοιχεία. Τέλος, συλλεγόταν το υπερκείμενο υγρό και εφαρμόζονταν οι τυποποιημένες διαδικασίες που αναφέρονται στα QIAamp Viral RNA Mini Kit. Σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή ετοιμάζονταν μίγμα που αποτελούνταν από 140μl υπερκείμενου υγρού (από το βαμβακοφόρο στυλέο) με 560μl AVL ρυθμιστικού διαλύματος και 5,6μl RNA carrier. Στη συνέχεια το μίγμα επωαζόταν σε θερμοκρασία δωματίου για 10min. Στο μίγμα μετά την επώαση γινόταν προσθήκη 560μl αιθανόλης και τοποθετούνταν σε στήλη περιστροφής (spin column), η οποία υποβαλλόταν σε φυγοκέντρηση στις 8000rpm για 1min. Κατόπιν η στήλη υποβαλλόταν σε διαδοχικά ξεπλύματα προκειμένου να απομακρυνθούν στοιχεία που θα λειτουργήσουν ως αναστολείς της PCR. Το πρώτο ξέπλυμα γινόταν με 500μl διαλύματος AW1 και φυγοκέντρηση στις 8000rpm για 1min και στη συνέχεια με 500μl διαλύματος AW2 και φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 3min. Η έκπλυση του τελικού RNA γινόταν σε 60μl ρυθμιστικού διαλύματος AVE (Buffer AVE).

Για την εκχύλιση του ιικού RNA από τον ορό αίματος, έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων μετά την αιμοληψία στις 1200 rpm για 10min, ώστε να ληφθεί ο ορός και εν συνεχεία εφαρμόστηκαν οι προαναφερθέντες οδηγίες του QIAamp Viral RNA Mini Kit.

Για την εκχύλιση του ιικού RNA από τα όργανα, έγινε λήψη τεμαχιδίου 10mg και εφαρμογή της τυποποιημένης διαδικασίας που αναφέρεται στο RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Germany).

## 2.5 Εκκινητές

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ήταν δημοσιευμένοι σε ερευνητικές εργασίες. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για τα γονίδια ORF 7 και ORF 6 (Πίνακας 2). Για το γονίδιο ORF 7, η επιλεγθείσα περιοχή είναι πολύ συντηρημένη μεταξύ όλων των τύπων του ιού του ΣΑΑΣΧ, γι' αυτό το μοναδικό ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε ήταν αναμενόμενο να ενισχύσει όλους τους γνωστούς τύπους του ιού (Oleksiewicz et al., 1998). Εκτός από το προαναφερθέν ζεύγος εκκινητών,

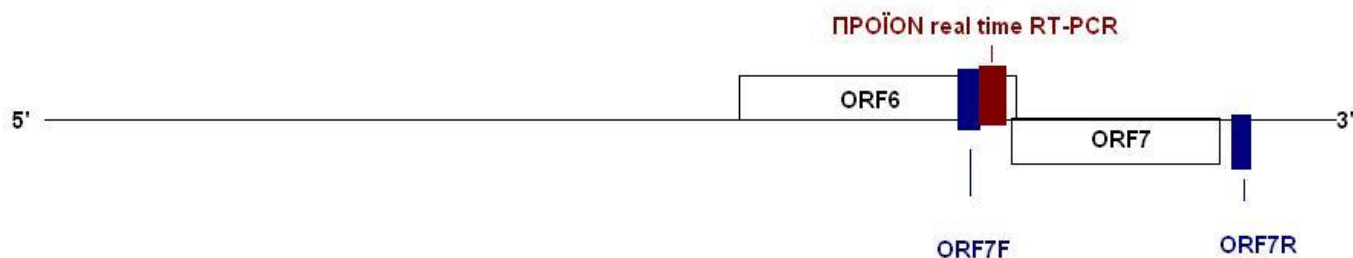
χρησιμοποιήθηκε ένα επιπλέον ζεύγος (EU6-343 f, EU6-462 r) και ένας ανιχνευτής (EU6 p), για την ανίχνευση και ενίσχυση τμήματος του γονιδίου ORF 6, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη M του περιβλήματος του ιού (Revilla-Fernandez et al., 2005).

**Πίνακας 2.** Ζεύγη εκκινητών και ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του ιού του ΣΑΑΣΧ. \* Η θέση πρόσδεσης των εκκινητών δίνονται σε σχέση με το στέλεχος αναφοράς LV (M: 96262.2).

<b>ΟΝΟΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ- ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ</b>	<b>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5' - 3')</b>	<b>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΤΗΞΗΣ Tm [°C]</b>	<b>ΘΕΣΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ*</b>
<b>ORF7F</b>	5'-GCCCCTGCCCAICACG-3'	59,4	14.414–14.429
<b>ORF7R</b>	5'-TCGCCCTAATTGAATAGGTGA- 3'	55,9	15.030-15.050
<b>EU6-343 f</b>	5'- GTAGAAAGTGCTGCAGGTCTCCA- 3'	62,4	14.429-14.451
<b>EU6-462 r</b>	5'-CACGAGGCTCCGAAGTCCT-3'	61,0	14.530-14.548
<b>EU6 pb</b>	6FAM-CTGTGAGAAAGCCCGGAC- NFQ	66,3	14.484-14.501

Οι εκκινητές ORF 7F και ORF 7R, που χρησιμοποιήθηκαν στις RT-PCRs, ενισχύουν όλο το γονίδιο ORF 7 (πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου N) και τμήμα της περιοχής ORF 6 (πρωτεΐνη M). Οι εκκινητές EU6-343 f και EU6-462 r και ο ανιχνευτής EU6 pb, που χρησιμοποιήθηκαν στη real time (RT-) PCR, ενισχύουν τμήμα της περιοχής ORF 6 (Εικόνα 4).





**Εικόνα 4.** Σχηματική αναπαράσταση των θέσεων πρόσδεσης των εκκινητών ORF 7F και ORF7R. Οι εκκινητές EU6-343 f και EU6-462 r και ο ανιχνευτής EU6 pb της real time (RT-) PCR, προσδένονται και ενισχύουν την περιοχή που απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα.

## 2.6 Αντίστροφη μεταγραφή - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) για τα στελέχη του ιού του ΣΑΑΣΧ.

Για όλες τις PCR που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας το ζωντανό εμβόλιο AMERVAC PRRS της HIPRA. Το εμβόλιο περιείχε το VP046 BIS στέλεχος που ανήκει στον ευρωπαϊκό γονότυπο του ιού, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε νερό απαλλαγμένο από RNάση και DNάση. Βελτιστοποίηση των αντιδράσεων έγινε ως προς την συγκέντρωση του  $MgCl_2$  και των εκκινητών, ενώ το βέλτιστο πρωτόκολλο θερμοκρασιών για κάθε ζεύγος εκκινητών προσαρμόστηκε πειραματικά. Όλες οι μοριακές τεχνικές της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης της παρούσας μελέτης, διενεργήθηκαν τρεις φορές προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, όλα τα διαλύματα για τις PCR παρασκευάστηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, με διαφορετικές πιπέτες και ρύγχι πιπετών με φίλτρο, καθώς και κάτω από συνθήκες που ελαχιστοποιούσαν τον κίνδυνο επιμόλυνσης με εξωγενές RNA.

Για την ανίχνευση του ιού του ΣΑΑΣΧ, στα δείγματα σιέλου των συών και οργάνων και ορού των χοιριδίων, έγινε χρήση RT-PCR. Για την ενίσχυση της περιοχής του ιικού γονιδιώματος που αναφέρεται στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το δημοσιευμένο ζεύγος εκκινητών ORF7F (5'-GCCCTGCCCAICACG-3') και ORF7R (5'-

TCGCCCTAATTGAATAGGTGA-3') (Oleksiewicz et al., 1998). Το προϊόν της PCR είναι μήκους 660 ζεύγη βάσεων νουκλεοτιδίων για τον αμερικάνικο και 637 για τον ευρωπαϊκό γονότυπο του ιού, της πρωτεΐνης N και τμήματος της πρωτεΐνης M. Η RT-PCR έλαβε χώρα σε δύο βήματα. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή (RT) του RNA και σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA), με χρήση του εμπορικού kit SuperScript First Strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen). Συγκεκριμένα, 10μl RNA μεταγράφονταν αντίστροφα σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μl που περιείχε 4μl PCR Buffer 5x (KCl 375mM, Tris-HCl 250mM, pH 8,3, 15Mm MgCl<sub>2</sub>), 1μl dNTPs mix (10mM από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2μl DTT 0.1M, 1μl RnaseOUT (40 units/μl), 1 μl SuperScript Reverse Transcriptase (200 units), και 1 μl Random Hexamers. Η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) γινόταν στους 42°C για 70 λεπτά και η αποδιάταξη στους 70°C για 15 λεπτά. Στην συνέχεια, για την εφαρμογή της PCR χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Κάθε φιαλίδιο περιείχε 5μl cDNA, 1μl (50 pmol / μl) των εκκινητών 7F και 7R, 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος PCR Buffer 10x (200Mm Tris-HCL, pH 8.4, 500 Mm KCL), 1,5μl 50Mm MgCl<sub>2</sub>, 1μl dNTPs mix(10Mm από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.3 Taq DNA Polymerase και νερό απαλλαγμένο από RNάση και DNάση ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να ανέρχεται στα 50 μl. Το θερμο-πρωτόκολλο περιλάμβανε αρχική αποδιάταξη του cDNA με θέρμανση στους 94 °C για 2' και στη συνέχεια 40 κύκλοι των 94 °C για 30'', 55 °C για 40'', 72 °C για 40''. Η τελική επιμήκυνση έγινε στους 72 °C για 5'.

Επιπλέον, έγινε χρήση RT-PCR σε ένα στάδιο, για την ανίχνευση του ιού. Χρησιμοποιήθηκε το δημοσιευμένο ζεύγος εκκινητών που αναφέρεται παραπάνω για το γονίδιο ORF 7. Για την RT-PCR έγινε χρήση του εμπορικού kit SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen S.R.L.) και του ακόλουθου πρωτοκόλλου για τους εκκινητές ORF 7F και ORF 7R: αντίστροφη μεταγραφή στους 50 °C για 40' και αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 94 °C για 2', και στη συνέχεια 45 κύκλοι των 94 °C για 40'', 55 °C για 40'', 68 °C για 1'. Η τελική επιμήκυνση έγινε στους 72 °C για 10'.

## **2.7 Αντίστροφη μεταγραφή - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Reverse Transcription-real time Polymerase Chain Reaction) για την ανίχνευση του ιού του ΣΑΑΣΧ.**

Για την ανίχνευση του ιού του ΣΑΑΣΧ εφαρμόστηκε επίσης real time (RT-) PCR. Συγκεκριμένα εφαρμόστηκε real time (RT-) PCR σε δύο βήματα. Η αντίστροφη μεταγραφή (RT) και η σύνθεση συμπληρωματικού DNA (πραγματοποιήθηκε με το ίδιο kit και κάτω από τις ίδιες συνθήκες με ό,τι αναφέρεται στο κεφάλαιο 2.6 Αντίστροφη μεταγραφή-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) για τα στελέχη του ιού του ΣΑΑΣΧ.

Για την ανίχνευση του ιικού RNA, χρησιμοποιήθηκε real time PCR που στόχευε στην ενίσχυση τμήματος 116 νουκλεοτιδίων του ORF6 (πρωτεΐνη M). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το δημοσιευμένο ζεύγος των εκκινητών EU6-343f (5'-GTAGAAAGTGCTGCAGGTCTCCA-3') EU6-462r (5'CACGAGGCTCCGAAGTCCT 3') και ο ανιχνευτής Taqman EU6 p (FAM- CGCTGTGAGAAAGCCCGGACTAACA - BHQ1) (Revilla-Fernandez et al., 2005). Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit LightCycler Taqman Master (Roche), και η αντίδραση έλαβε χώρα στο μηχάνημα Light Cycler 2.0 (Roche), ενώ τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το αντίστοιχο λογισμικό. Ο τελικός όγκος αντίδρασης ήταν 20 ml και αποτελούνταν από 4 μl LightCycler Taqman Master mix (FastStart Taq DNA Polymerase και reaction mix που περιείχε MgCl<sub>2</sub> με μίγμα dNTPs), 1 μl από κάθε εκκινητή ORF 6For και ORF 6Rev (10 pmol/μl), 0,5 μl ανιχνευτή Taqman ORF 6-Pb (5 pmol/μl), 5 μl cDNA και νερό απαλλαγμένο από RNάση και DNάση, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να ανέρχεται στα 20 μl. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής: 94°C για 10' για ενεργοποίηση του ενζύμου και στη συνέχεια 45 κύκλοι των 94 °C για 10'', 60 °C για 1' και 72 °C και 2'', και 1 κύκλος στους 43°C για 30'' για ψύξη (cooling). Στο τέλος κάθε κύκλου γινόταν μέτρηση επιπέδων φθορισμού.

Εκτός από τα δείγματα οργάνων και ορού των χοιριδίων και σιέλου των σιών, η προαναφερθείσα real time PCR με τους εκκινητές EU6-343 f, EU6-462 r και EU6 pb έγινε και σε 3 δείγματα αίματος κλινικά υγιών ανθρώπων. Τα δείγματα αίματος

λήφθηκαν από περιφερικό αίμα και έγινε απομόνωση του DNA με το DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen AG, Germany).

Η διαδικασία έγινε σε ειδικό θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (PCR Workstation) ο οποίος χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την προετοιμασία των αντιδράσεων της RT-PCR. Τα αναλώσιμα και οι πιπέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποκλειστικής χρήσης για RT και real-time PCR.

## **2.8 Ηλεκτροφόρηση των πηκτών αγαρόζης**

Για την παρασκευή πηκτών αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε αγαρόζη υψηλής καθαρότητας (Applichem GmbH, Germany) διαλυμένη σε διάλυμα 1xTAE [40 mM Tris, 20 mM Acetic acid και 1 mM EDTA, pH 8,3 (FLUKA, Switzerland)] σε συγκέντρωση 1,5%. Για την απεικόνιση των προϊόντων της PCR στις πηκτές αγαρόζης, ενσωματώθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml. Για την ηλεκτροφόρηση, οι πηκτές αγαρόζης τοποθετούνταν μέσα σε διάλυμα 1xTAE.

Μετά το πέρας των (RT)-PCRs, ακολουθούσε ανάλυση των προϊόντων σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Για την εν λόγω ανάλυση γινόταν χρήση πηκτής αγαρόζης 1,5% και ρυθμιστικού διαλύματος 1xTAE. Πέντε μl από κάθε προϊόν των (RT)-PCRs, αφού αναμειγνύονταν με 1 μl διαλύματος φόρτωσης (6X Loading Dye Solution, Fermentas, Spain), τοποθετούνταν στα βοθρία της πηκτής αγαρόζης. Σε κάθε πηκτή τοποθετούνταν επίσης ο κατάλληλος DNA δείκτης γνωστών μοριακών βαρών (GeneRuler 100bp DNA Ladder, ready-to-use ή/και Mass Ruler DNA Ladder, ή GeneRuler 1kb, 250-10,000 DNA Ladder, Fermentas, Spain), ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας. Ακολούθως, λάμβανε χώρα εφαρμογή τάσης 90V για 1 ώρα. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης ελεγχόταν σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV transilluminator). Το μέγεθος των προϊόντων προσδιορίζονταν βάσει του δείκτη γνωστών μοριακών βαρών.

## **2.9 Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων**

### **2.9.1 Απομόνωση των προϊόντων των RT-PCRs και real time (RT-) PCRs**

Για την εκχύλιση του DNA από την πηκτή αγαρόζης, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης και κάτω από υπεριώδεις ακτίνες, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη λεπίδα νυστεριού μίας χρήσης, διαχωρίστηκε το προϊόν των PCRs. Στη συνέχεια, εκχυλίστηκε το DNA από το τεμάχιο της πηκτής αγαρόζης με τη βοήθεια του QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Germany).

### **2.9.2 Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων των προϊόντων ενίσχυσης των RT-PCRs και real time (RT-) PCRs**

Για οικονομικούς λόγους επιλέχθηκαν τα 10 (5 από την κάθε μέθοδο) καταλληλότερα δείγματα με βάση την απόδοση της αντίδρασης PCR, που ήταν θετικά στον ιό. Η αποστολή δειγμάτων για αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων των προϊόντων, έλαβε χώρα 4 φορές. Τα προϊόντα των RT-PCRs και real time (RT-) PCRs εστάλησαν για αλληλούχηση νουκλεοτιδίων στα εργαστήρια Biogenomica (Αθήνα) και Macrogen Inc (Κορέα). Η αλληλούχηση έγινε με τεχνολογία BigDye Terminator Cycle Sequencing σε αλληλουχοποιητή 3710xl DNA analyzer (Applied Biosystems, USA). Στη συνέχεια, ακολούθησε σύγκριση των αλληλουχιών με δημοσιευμένες αλληλουχίες γονιδιωμάτων μέσω της βάσης δεδομένων GenBank database ([www.ncbi.nih.gov/GenBank](http://www.ncbi.nih.gov/GenBank)).

## **2.10 Κλωνοποίηση προϊόντος PCR σε πλασμίδιο**

Σε 4 δείγματα που ήταν προϊόντα της RT-PCR σε δύο βήματα με εκκινητές τους ORF 7F και ORF 7R, έγινε κλωνοποίηση στο πλασμίδιο pcRII-TOPO με kit TOPO TA Cloning Dual Promoter, Invitrogen. Συγκεκριμένα, 4 μl προϊόντος PCR, 1 μl διάλυμα αλάτων και 1 μl πλασμίδιο TOPO επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 25°C. Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων (competent cells) και επώαση για 30 λεπτά

στον πάγο, για 90 δευτερόλεπτα στους 42 °C και τοποθέτηση των μετασηματισμένων βακτηρίων σε υγρή καλλιέργεια (Lysogeny Broth sterile, LB) χωρίς αντιβιοτικό. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση για 2 ώρες στους 37 °C, επίστρωση σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με αμπικιλίνη 100 mg/ml και επώαση για 16-18 ώρες στους 37 °C. Ακολούθησε επιλογή των αποικιών και ανακαλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό LB με αμπικιλίνη (100 mg/ml) και επώαση για 16-18 ώρες στους 37 °C. Εν συνεχεία, έγινε η απομόνωση πλασμιδιακού DNA με Nucleospin Plasmid kit. Ακολούθησε η πέψη των πλασμιδίων με EcoRI (Takara Bio Europe S.A.S., St. Germain, France) και η ηλεκτροφόρηση σε gel αραρόζης 3%. Επιλέχθηκαν οι αποικίες που φάνηκε ότι ενσωμάτωσαν το προϊόν της PCR και στάλθηκαν για αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων, με τους εκκινητές του πλασμιδίου M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') και M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Η διαδικασία της κλωνόποιησης του προϊόντος της PCR επαναλήφθηκε 4 φορές.

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **3.1 Παθολογοανατομικά ευρήματα**

Τα χοιρίδια που εξετάστηκαν, προέρχονταν από τοκετομάδες που αποτελούνταν εξ' ολοκλήρου από νεκρά αποβληθέντα χοιρίδια ή από νεκρά, θνησιγενή και κλινικά φυσιολογικά ζώα. Κατά την νεκροτομική εξέταση των αποβληθέντων και θνησιγενών χοιριδίων διαπιστώθηκαν εστιακές αιμορραγίες στο σώμα και στον ομφάλιο λώρο, αλλά και αιμορραγία σε όλο το μήκος του ομφάλιου λώρου. Σε δώδεκα χοιρίδια οι πνεύμονες ήταν ελαφρώς σκουρόχρωμοι και διογκωμένοι. Στα δύο θνησιγενή χοιρίδια παρατηρήθηκε ελαφρά διόγκωση των τραχειοβρογχικών λεμφαδένων. Στο ήπαρ και στην καρδιά δεν διαπιστώθηκε παρουσία αλλοιώσεων. Οι νεφροί εμφανίζονταν ελαφρώς σκουρόχρωμοι σχεδόν σε όλα τα χοιρίδια.



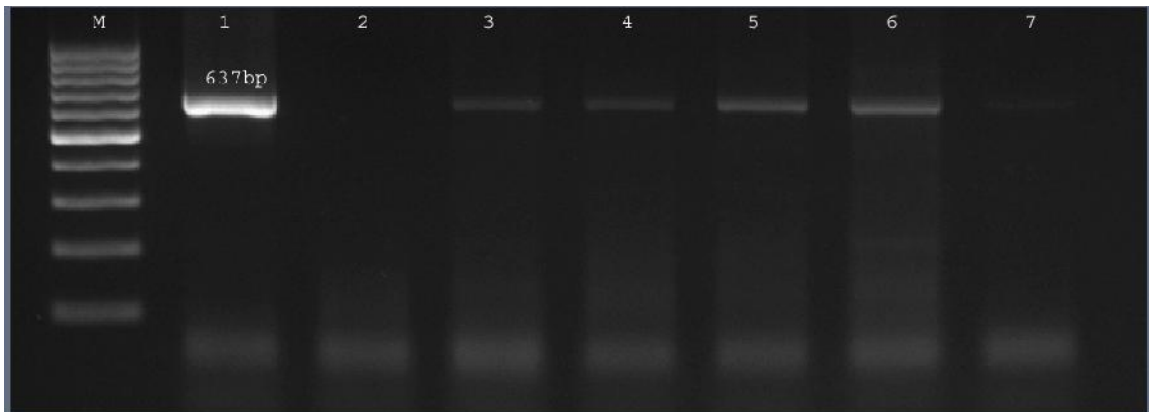
**Εικόνα 5.** Χοιρίδια 18/10, 19/10, 20/10, 21/10. Αιμορραγίες στο σώμα και στον ομφάλιο λώρο. Προϊόντα αποβολής ηλικίας εγκυμοσύνης 72 ημερών.



**Εικόνα 6.** Χοιρίδιο 18/10. Αιμορραγία κατά μήκος του ομφάλιου λώρου. Διάχυτες αιμορραγίες στο σώμα. Προϊόν αποβολής ηλικίας εγκυμοσύνης 72 ημερών.

### 3.2 Ανίχνευση του ιού του ΣΑΑΣΧ με RT-PCRs

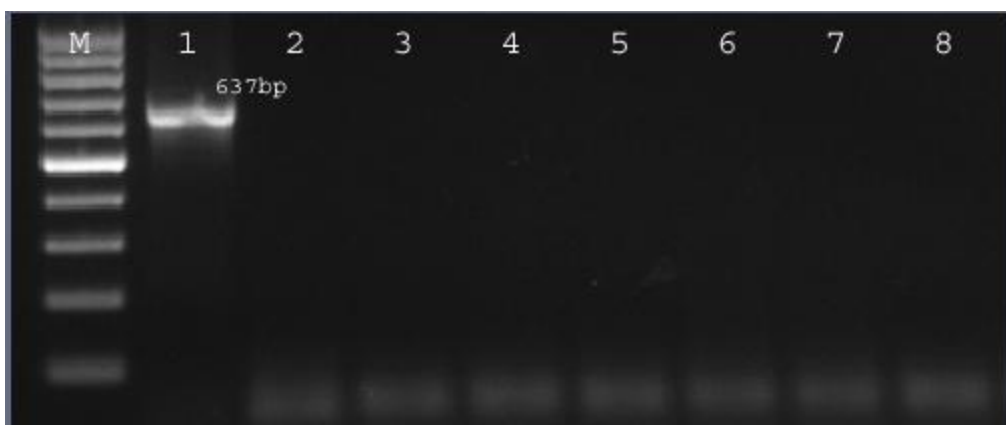
Από το σύνολο των 23 χοιριδίων τα 14 ήταν θετικά για τον ιό του ΣΑΑΣΧ σε ένα ή περισσότερα όργανα και ορούς, με την RT-PCR σε δύο βήματα. Από αυτά, τα 12 χοιρίδια ήταν προϊόντα αποβολής και τα 2 θνησιγενή. Στο σύνολο λοιπόν των 95 δειγμάτων των οργάνων και ορών των χοιριδίων, ο ιός ανιχνεύθηκε σε 55 δείγματα. Συγκεκριμένα, ο ιός ανιχνεύθηκε στους πνεύμονες και στο σπλήνα σε 14 από τα 23 χοιρίδια, στους ορούς των 2 θνησιγενών χοιριδίων, στους νεφρούς 12 και στην καρδιά 13 χοιριδίων (Εικόνα 7). Επίσης, από τα 17 δείγματα σιέλου που συλλέχθηκαν από χοιρομητέρες, ο ιός του ΣΑΑΣΧ δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα με την RT-PCR σε δύο βήματα (Πίνακας 3).



**Εικόνα 7.** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της RT-PCR σε δύο βήματα για την ανίχνευση του ιού του ΣΑΑΣΧ. Αριστερά (M) διακρίνεται ο δείκτης μοριακού βάρους ανά 100 ζεύγη βάσεων. Στις διαδρομές 1 και 2 ο θετικός και αρνητικός μάρτυρας αντίστοιχα, ενώ στις διαδρομές 3, 4, 5, 6 και 7 βρίσκονται 5 θετικά δείγματα. Το προϊόν έχει μήκος 637 ζεύγη βάσεων.

Στο σύνολο των 95 δειγμάτων των οργάνων και ορών των χοιριδίων, ο ιός δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα με την RT-PCR σε ένα βήμα (One step RT-PCR). Ομοίως, σε κανένα από τα 17 δείγματα σιέλου των συών, δεν ανιχνεύθηκε ο ιός (Εικόνα 8).





**Εικόνα 8.** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της RT-PCR σε ένα βήμα για την ανίχνευση του ιού του ΣΑΑΣΧ. Αριστερά (M) διακρίνεται ο δείκτης μοριακού βάρους ανά 100 ζεύγη βάσεων. Στις διαδρομές 1 και 2 ο θετικός και αρνητικός μάρτυρας αντίστοιχα, ενώ στις διαδρομές 3, 4, 5, 6, 7 και 8 βρίσκονται 6 αρνητικά δείγματα. Το προϊόν έχει μήκος 637 ζεύγη βάσεων.

**Πίνακας 3.** Αποτελέσματα με τη μέθοδο RT-PCR διάγνωσης ενός και δύο βημάτων.

	Θετικά δείγματα με την RT-PCR διάγνωσης σε δύο βήματα	Θετικά δείγματα με την RT-PCR διάγνωσης σε ένα βήμα
17 σύες	-	-
Δείγματα σιέλου (σύες)	-	-
23 χοιρίδια	14 (12 αποβληθέντα & 2 θνησιγενή)	-
95 δείγματα οργάνων (χοιρίδια)	55	-
23 δείγματα πνευμόνων	14	-
23 δείγματα σπλήνα	14	-
23 δείγματα καρδιάς	13	-

23 δείγματα νεφρών	12	-
3 δείγματα ορού αίματος	2	-

### 3.3 Ανίχνευση του ιού του ΣΑΑΣΧ με real time (RT-) PCRs

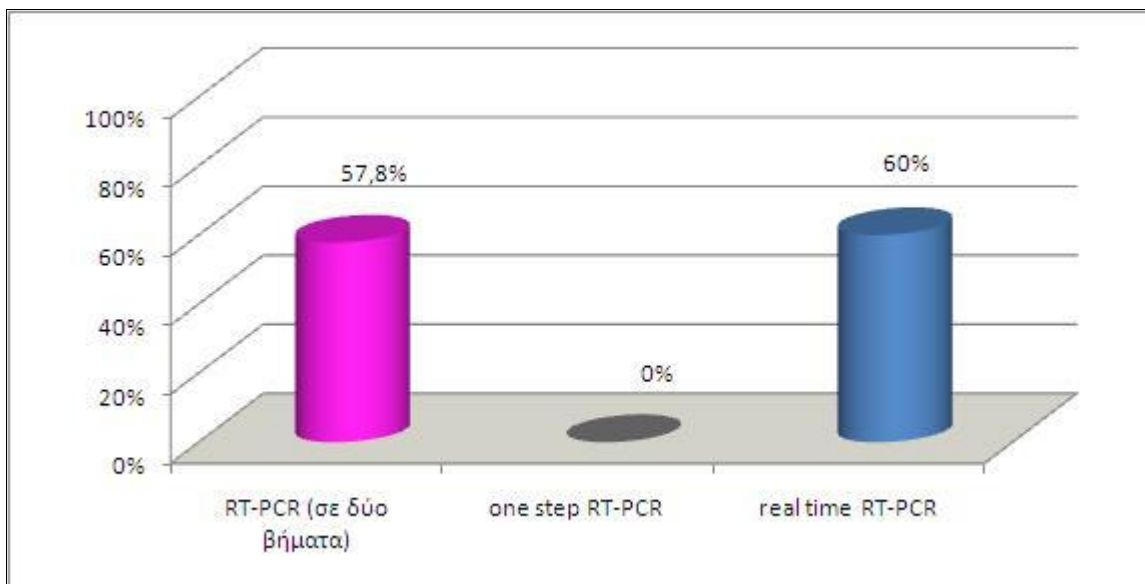
Από το σύνολο των 23 χοιριδίων που συλλέχθηκαν, ο ιός του ΣΑΑΣΧ ανιχνεύθηκε σε όργανα και ορούς 14 χοιριδίων με τη real time (RT-) PCR. Από αυτά, τα δύο ήταν θνησιγενή. Εξετάστηκαν τα δείγματα (πνεύμονες, καρδιά, σπλήνας, νεφροί και ορός αίματος) και ο ιός ανιχνεύθηκε στα 57 από τα 95 δείγματα. Αναλυτικότερα, ο ιός ανιχνεύθηκε στους πνεύμονες, στο σπλήνα και στην καρδιά και των 14 χοιριδίων. Επιπλέον, ανιχνεύθηκε στους ορούς αίματος των δύο θνησιγενών χοιριδίων. Τέλος, ο ιός ανιχνεύθηκε στους νεφρούς 13 χοιριδίων. Από τις 17 χοιρομητέρες πάρθηκε δείγμα σιέλου. Στο σύνολο των 17 δειγμάτων σιέλου, ο ιός του ΣΑΑΣΧ δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα (Πίνακας 4). Στα τρία δείγματα περιφερικού αίματος ανθρώπων που εξετάστηκαν με την ίδια real time (RT-) PCR, ανιχνεύθηκε φθορισμός συμβατός με ενίσχυση προϊόντος, που επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% ενισχύοντας τμήμα 116 βάσεων νουκλεοτιδίων.

**Πίνακας 4.** Αποτελέσματα με τη μέθοδο real time (RT-) PCR.

	Θετικά δείγματα με την real time (RT-) PCR διάγνωσης
17 σύες	-
Δείγματα σιέλου (σύες)	-
23 χοιρίδια	14 (12 αποβληθέντα & 2 θνησιγενή)
95 δείγματα οργάνων (χοιρίδια)	57
23 δείγματα πνευμόνων	14
23 δείγματα σπλήνα	14
23 δείγματα καρδιάς	14
23 δείγματα νεφρών	13
3 δείγματα ορού αίματος	2

### **3.4 Σύγκριση RT-PCRs με τις αντίστοιχες real time (RT-) PCRs.**

Από τα 95 δείγματα οργάνων και ορών των χοιριδίων 57 ήταν θετικά για τον ιό του ΣΑΑΣΧ. Από το σύνολο των 57 θετικών δειγμάτων των χοιριδίων με real time (RT-) PCR ή/και RT-PCR δύο βημάτων, 2 δείγματα βρέθηκαν θετικά μόνο με την real time (RT-) PCR, ενώ τα υπόλοιπα 55 ήταν θετικά και με τις δύο μεθόδους. Συνεπώς το 60% των δειγμάτων ήταν θετικό με real time (RT-) PCR, και το 57,8% ήταν θετικό με RT-PCR δύο βημάτων. Αντιθέτως, από τα 95 δείγματα των χοιριδίων κανένα δεν βρέθηκε θετικό για τον ιό με την One step RT-PCR.



**Γράφημα 1.** Ποσοστά ανίχνευσης του ιού του ΣΑΑΣΧ με RT-PCR δύο βημάτων, one step RT-PCR και real time (RT-) PCR σε δείγματα οργάνων και ορών χοιριδίων.

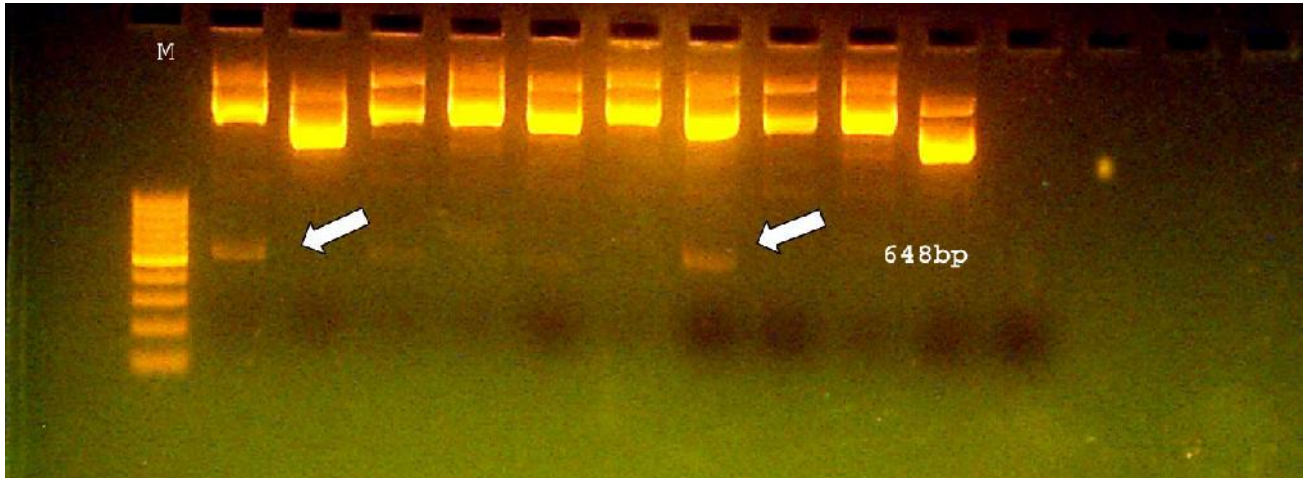
### 3.5 Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων

Από τα αποτελέσματα του χρωμογραφήματος φάνηκε η ενίσχυση μικτού πληθυσμού ή η χαμηλή συγκέντρωση των προϊόντων. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να γίνει κλωνοποίηση των προϊόντων της RT-PCR σε πλασμίδιο.

### 3.6 Κλωνοποίηση προϊόντος PCR σε πλασμίδιο

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, η ύπαρξη μικτού πληθυσμού στα δείγματα, οδήγησε στην κλωνοποίηση κάποιων εξ' αυτών. Στην 4<sup>η</sup> προσπάθεια κλωνοποίησης φάνηκε ότι οι 2 από τις 10 αποικίες είχαν ενσωματώσει το προϊόν της PCR (637 bp) και ακολούθησε αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων. Όμως, μετά τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της μίας αποικίας που είχε ενσωματώσει το ένθεμα (προϊόν PCR), αυτή χαρακτηρίστηκε ως ανθρώπινο DNA μετά από την

εφαρμογή του αλγόριθμου BLAST. Το προϊόν αυτό της PCR της αποικίας, αποτελούνταν από 648 bp (Εικόνα 9) (GenBank accession: DQ 336167). Η δεύτερη αποικία δεν ενσωμάτωσε το προϊόν της PCR.



**Εικόνα 9.** Τα βέλη δείχνουν τις 2 αποικίες που πιθανόν έχουν ενσωματώσει το προϊόν της PCR. Αριστερά (M) διακρίνεται ο δείκτης μοριακού βάρους (100-1000 bp) ανά 100 ζεύγη βάσεων. Η πέψη των πλασμιδίων έγινε με το ένζυμο EcoRI. Η αποικία με το νούμερο 7, είναι η αποικία που ενσωμάτωσε το προϊόν PCR (ανθρώπινο DNA).

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία 20-30 χρόνια υπήρξε ταχεία αύξηση της χοιροτροφίας που είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση νοσολογικών προβλημάτων, άγνωστα μέχρι τότε. Η κλινική εκδήλωση του ΣΑΑΣΧ αναφέρθηκε για πρώτη φορά στα τέλη της δεκαετίας του 1980 στην Αμερική και σύντομα διαδόθηκε στις περισσότερες χώρες με χοιροτροφία, παγκοσμίως. Σήμερα το 2011, 20 χρόνια μετά την ταυτοποίηση του αιτιολογικού παράγοντα του νοσήματος, το ΣΑΑΣΧ συνεχίζει να αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα

προβλήματα, προκαλώντας σημαντικές οικονομικές απώλειες στις χοιροτροφικές εκμεταλλεύσεις.

Στην Ελλάδα η πρώτη αναφορά του ΣΑΑΣΧ έγινε το 1993 (Xylouri E., 1993). Αρχικά, η εμφάνιση του συνδρόμου συνοδεύτηκε με την εκδήλωση της οξείας μορφής, προκαλώντας σημαντικές οικονομικές απώλειες στην ελληνική χοιροτροφία. Στην συνέχεια το σύνδρομο, σε περιοχές με μεγάλη πυκνότητα χοίρειου πληθυσμού, εκδηλώνονταν με αναπνευστικά προβλήματα στους αναπτυσσόμενους / παχυνόμενους χοίρους, καθώς και με σοβαρές εξάρσεις ιογενών και βακτηριακών νοσημάτων (Kygiakis et al., 1997). Μέχρι σήμερα το σύνδρομο συνεχίζει να εκδηλώνεται με την ενζωτική του μορφή, που χαρακτηρίζεται από περιορισμένης διάρκειας εξάρσεις και υφέσεις, πρόωρους τοκετούς, αποβολές, αναφροδισία, αύξηση του ποσοστού των σιών που εμφανίζουν το σύνδρομο της επιλόχειας υπογαλαξίας / δυσγαλαξίας και επιστροφές σε οίστρο μετά την τεχνητή σπερματέγχυση ή την φυσική οχεία (Kygiakis et al., 1997).

Ωστόσο, στην Ελλάδα, μέχρι σήμερα δεν έχουν γίνει μελέτες που να αφορούν την ανίχνευση του ιού με μοριακές τεχνικές και την απομόνωση του σε ειδικές κυτταρικές σειρές, παρά μόνο ορολογική ανίχνευση των αντισωμάτων του (Kritas, 2011). Για τους παραπάνω λόγους, στην συγκεκριμένη έρευνα έγινε προσπάθεια ανίχνευσης του ιού του ΣΑΑΣΧ με μοριακές τεχνικές. Η επιλογή της συγκεκριμένης χοιροτροφικής εκτροφής έγινε με βάση την κλινική εικόνα του αναπαραγωγικού πληθυσμού. Συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε, οι μισές περίπου σύες εμφάνισαν ανορεξία, πυρετό, κατάπτωση και βήχα. Επίσης, παρατηρήθηκαν αποβολές, κυρίως στο τελευταίο τρίτο της κυοφορίας, πρόωροι τοκετοί με γέννηση νεκρών ή και θνησιγενών χοιριδίων, επιστροφές σε οίστρο και αναφροδισία. Η παραπάνω κλινική εικόνα παρατηρήθηκε κατά το έτος 2010, άλλα σύμφωνα με το ιστορικό της εκτροφής, παρατηρούνται εξάρσεις και υφέσεις της συγκεκριμένης συμπτωματολογίας κάθε χρόνο. Με δεδομένο ότι οι αποβολές, οι πρόωροι τοκετοί, η γέννηση νεκρών και θνησιγενών χοιριδίων αποτελούν τις πιο χαρακτηριστικές κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου του ΑΑΣΧ στις εκτροφές (Meredith, 1995, Chung et al., 1997, Terpstra et al., 1991, Hopper et al., 1992), θεωρήθηκε ότι υπήρχαν αυξημένες πιθανότητες «κυκλοφορίας» του ιού στη συγκεκριμένη χοιροτροφική εκμετάλλευση παρόλο που τα ζώα εμβολιάζονται. Το γεγονός μάλιστα, ότι στην εκτροφή είχαν λάβει χώρα στο παρελθόν ορολογικές δοκιμές

και είχαν αποκλειστεί άλλα παθογόνα που ευθύνονται για την πρόκληση προβλημάτων αναπαραγωγής (νόσος του Aujeszky, Παρβοϊωση), ενίσχυσαν την πιθανότητα «κυκλοφορίας» του ιού του ΣΑΑΣΧ στην εκτροφή. Η εκτροφή τα τελευταία δέκα χρόνια είναι αρνητική για τα παραπάνω δύο νοσήματα.

Στην συγκεκριμένη μελέτη, με χρήση RT-PCRs, real time (RT-) PCRs και δημοσιευμένους εκκινητές, ο ιός του ΣΑΑΣΧ ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 60% των δειγμάτων των χοιριδίων. Όμως, από τα αποτελέσματα του χρωμογραφήματος φάνηκε η ενίσχυση μικτού πληθυσμού στα δείγματα των προϊόντων των PCR που στάλθηκαν προς αλληλούχιση των νουκλεοτιδίων. Θεωρήθηκε λοιπόν πιθανή η ύπαρξη δύο στελεχών του ιού, που λόγω της υψηλής γενετικής ποικιλομορφίας του ήταν δύσκολη η αλληλούχιση των νουκλεοτιδίων τους (Yoshii et al., 2005, Kiss et al., 2006).

Για όλους τους παραπάνω λόγους αποφασίστηκε να γίνει κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν δείγματα, στα οποία είχε ανιχνευθεί ο ιός του ΣΑΑΣΧ με την RT-PCR δύο βημάτων. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν προϊόντα PCR στα οποία είχε ενισχυθεί τμήμα του γονιδιώματος του ιού με τους εκκινητές που αναφέρονται από τους Oleksiewicz και συν., το 1998. Σύμφωνα με το δημοσιευμένο αυτό πρωτόκολλο μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ των στελεχών των δύο γονότυπων του ιού, με βάση τη διαφορά μεγέθους των προϊόντων της PCR. Μετά την κλωνοποίηση και τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της μίας αποικίας, αυτή χαρακτηρίστηκε ως ανθρώπινο DNA μετά από την εφαρμογή του αλγόριθμου BLAST. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν αναφερθεί και σε μία άλλη μελέτη (Fetzer et al., 2006) όπου διαπιστώθηκε ότι οι εν λόγω εκκινητές (Oleksiewicz et al., 1998) είναι δυνατό να ενισχύσουν, πέραν του επιθυμητού προϊόντος, ένα τμήμα του ανθρώπινου DNA υπό τις συνθήκες διαγνωστικές εργαστηριακές συνθήκες.

Με βάση τα ευρήματα της κλωνοποίησης, αποφασίστηκε να εξεταστούν δείγματα περιφερικού αίματος κλινικά υγιών ανθρώπων με την real time (RT-) PCR, ώστε να διαπιστωθεί εάν και οι δημοσιευμένοι εκκινητές (Revilla-Fernandez et al., 2005), μπορούν να ενισχύσουν τμήμα ανθρώπινου DNA. Πράγματι εκτός από τα δείγματα των οργάνων των χοιριδίων, θετικό αποτέλεσμα έδωσαν και τα τρία δείγματα αίματος ανθρώπων. Όμως μετά από αλληλούχιση των νουκλεοτιδίων φάνηκε και πάλι από τα αποτελέσματα του χρωμογραφήματος, ότι είχε λάβει χώρα ενίσχυση μικτού πληθυσμού.

Η περιοχή ORF 6 του γονιδιώματος του ιού, στην οποία συνδέονται οι εκκινητές της real time RT-PCR και ο forward εκκινητής (ORF 7F) της RT-PCR, υποδηλώνεται ότι εμφανίζει κάποιο βαθμό ομολογίας με το ανθρώπινο DNA ώστε να είναι δυνατή η ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων (ανθρώπινο DNA).

Στην παρούσα ερευνητική εργασία η ευαισθησία των εκκινητών «εξετάστηκε» σε ένα πολύ περιορισμένο αριθμό δειγμάτων, χωρίς να εξεταστεί ειδικά, εάν μπορούν να αναγνωρίζουν μεγάλο φάσμα στελεχών του ιού. Είναι άλλωστε γνωστό, ότι τα ευρωπαϊκά κυρίως στελέχη του ιού, μπορούν να εμφανίσουν απόκλιση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων έως και 20%, τουλάχιστον στην περιοχή ORF5 του γονιδιώματός του (Stadejek et al., 2002). Συνεπώς είναι πιθανό, σε ορισμένες περιπτώσεις ένα πρωτόκολλο να δίνει προϊόν PCR, ενώ ένα άλλο να δίνει αρνητικό αποτέλεσμα (Fetzer et al., 2006).

Όσον αφορά την ειδικότητα των εκκινητών, θα πρέπει να αναμένονται ψευδώς θετικά αποτελέσματα εάν αυτοί μπορούν να ενισχύσουν όχι μόνο την αλληλουχία-στόχο, αλλά και άλλες RNA και DNA αλληλουχίες, που μπορεί να βρίσκονται μέσα στο δείγμα (Fetzer et al., 2006). Το παραπάνω συνέβη στην περίπτωση των εκκινητών που δημοσιεύτηκαν από τους Oleksiewicz και συν., το 1998. Η έλλειψη αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων φάνηκε από την αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων, τυχαία «θετικών» δειγμάτων, που κλωνοποιήθηκαν και αποδείχθηκε ότι αποτελούν τμήμα ανθρώπινου DNA. Καθίσταται λοιπόν σαφές, ότι υπάρχει πηγή μόλυνσης που δίνει ψευδώς θετικά αποτελέσματα με τους εκκινητές ORF 7F και ORF 7R (Oleksiewicz et al., 1998), και είναι το ανθρώπινο DNA, το οποίο μπορεί να μπει από λάθος σε οποιοδήποτε στάδιο κατά το χειρισμό του δείγματος, την απομόνωση του RNA ή και κατά τη διενέργεια της PCR (Fetzer et al., 2006).

Η συμβατική RT-PCR με εκκινητές τους ORF 7F και ORF 7R (Oleksiewicz et al., 1998) τροποποιήθηκε και χρησιμοποιήθηκε από τους Egli και συνεργάτες, το 2001. Σε καμία όμως από τις δύο ερευνητικές εργασίες δεν υπήρχε υποψία ύπαρξης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ήταν σε αντίθεση και με τα δύο δημοσιευμένα πρωτόκολλα. Πιθανόν ο λόγος να οφείλεται στον τρόπο απομόνωσης του RNA. Και οι δύο μέθοδοι (χρήση διαλύματος Trizol), που χρησιμοποιήθηκαν στις προαναφερθείσες εργασίες αποδίδουν υψηλής καθαρότητας RNA, χωρίς σημαντικά ίχνη DNA. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι σπάνια χρησιμοποιούνται



σε διαγνωστικά εργαστήρια ρουτίνας (Fetzer et al., 2006). Αντιθέτως, στην παρούσα μελέτη έγινε χρήση ενός από τα εμπορικά kit που χρησιμοποιούνται ευρέως σε διαγνωστικά εργαστήρια για την εκχύλιση ιικού RNA, που όμως συχνά το απομονωθέν RNA περιέχει υπολείμματα DNA. Τα υπολείμματα αυτά μπορούν να αποδίδουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Fetzer et al., 2006). Στην εσφαλμένη ερμηνεία των αποτελεσμάτων συνηγορεί και το γεγονός, ότι τα προϊόντα της PCR είναι παρόμοια σε μέγεθος, 648 νουκλεοτίδια για το ψευδώς θετικό αποτέλεσμα και 637 για το προϊόν που προέρχεται από το γονιδίωμα του ιού. Η διαφορά αυτή είναι τόσο μικρή, που είναι αδύνατη η οπτική διαφοροποίηση σε πηκτική αгарόζης 2%, που χρησιμοποιείται σε διαγνωστικά εργαστήρια (Fetzer et al., 2006).

Από τα αποτελέσματα της real time (RT-) PCR φαίνεται ότι εκτός από το τμήμα του ιικού RNA, ενισχύεται και τμήμα ανθρώπινου DNA. Επιπλέον, η αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων δεν κατέστη δυνατή καθώς από τα αποτελέσματα των νουκλεοτιδίων καταδεικνύεται και πάλι ενίσχυση μικτού πληθυσμού. Συνεπώς, και οι εκκινητές EU6-343f, EU6-462r και ο ανιχνευτής EU6p (Revilla-Fernandez et al., 2005), δίνουν προϊόν PCR ανθρώπινου DNA παρόμοιου μεγέθους με εκείνο του ιού του ΣΑΑΣΧ.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, είναι γεγονός ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR, πολλαπλασιάζουν ανθρώπινο DNA. Όμως, δίνουν και ένα ακόμη προϊόν PCR, παρόμοιου μεγέθους, που είναι σχεδόν αδύνατο να διαφοροποιηθεί οπτικά. Το δεύτερο αυτό προϊόν της PCR πιθανόν να προέρχεται από την ενίσχυση τμήματος του γονιδιώματος του ιού του ΣΑΑΣΧ, που με την RT-PCR έχει μέγεθος 637 ζεύγη βάσεων νουκλεοτιδίων (Oleksiewicz et al., 1998), ενώ με την real time (RT-) PCR, 116 (Revilla-Fernandez et al., 2005).

Στην συγκεκριμένη ερευνητική εργασία, για την ανίχνευση του ιού του συνδρόμου του ΑΑΣΧ χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι RT-PCR σε δύο βήματα, one step RT-PCR και real-time (RT-) PCR. Όσον αφορά τα αποτελέσματα της RT-PCR σε δύο βήματα και της real-time (RT-) PCR, αυτά δεν ήταν σε απόλυτη αντιστοιχία, διότι υπήρχαν δείγματα που έδωσαν προϊόν PCR μόνο με τη real time (RT-) PCR. Το γεγονός αυτό δεν αποτελεί έκπληξη, εφόσον είναι γνωστό ότι η real-time (RT-) PCR χαρακτηρίζεται από υψηλότερη ευαισθησία. Με βάση τα αποτελέσματα της RT-PCR σε ένα βήμα, φάνηκε ότι η ευαισθησία της μεθόδου είναι πολύ χαμηλή, μιας και στην

παρούσα μελέτη όλα τα δείγματα ήταν αρνητικά. Ωστόσο, όσον αφορά στον ιό του ΣΑΑΣΧ, δεν υπάρχει μέθοδος που να αποτελεί το χρυσό πρότυπο και ο συνδυασμός των δύο μεθόδων (RT-PCR σε δύο βήματα και real-time (RT-) PCR), μαζί με παράλληλη ερμηνεία των αποτελεσμάτων, επιτυγχάνει την ορθότερη εξαγωγή συμπερασμάτων.

Η απομόνωση του σε κατάλληλες κυτταρικές σειρές και οι μοριακές τεχνικές RT-PCRs, αποτελούν ένα ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση του ιού του ΣΑΑΣΧ σε μεμονωμένους χοίρους ή χοιροτροφικές εκτροφές (Mengeling and Lager, 2000). Παρόλα αυτά, από την συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη καταδεικνύεται ότι δημοσιευμένα και ευρέως χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα, είναι δυνατό να οδηγήσουν μέσω ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, σε διαγνωστικά λάθη (Fetzer et al., 2006). Επιπλέον, η έντονη γενετική ποικιλομορφία που χαρακτηρίζει τον ιό του συνδρόμου, μπορεί να καταστήσει μία καλή διαγνωστική τεχνική, μη λειτουργική. Δεν θα πρέπει όμως να λησμονούμε, ότι οι μοριακές τεχνικές RT-PCRs δίνουν υψηλής ευαισθησίας και ταχύτητας αποτελέσματα, σε αντίθεση με την απομόνωση του ιού σε κυτταρικές σειρές.

Συνοψίζοντας, μετά τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης, οι μελλοντικοί στόχοι είναι η λήψη δειγμάτων από μεγαλύτερο αριθμό ζώων και από περισσότερες εκτροφές με συμβατή κλινική εικόνα. Επιπλέον, είναι βασικό ο σχεδιασμός εκκινήτων σε άλλη περιοχή του γονιδιώματος του ιού και η αξιολόγησή τους. Τέλος, η αλληλούχηση και η φυλογενητική ανάλυση των στελεχών που «κυκλοφορούν» στην Ελλάδα, είναι ένας απώτερος στόχος έρευνας.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Albina E., Leforban Y., Baron T., Plana Duran J., Vannier P., 1992. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Annales de Recherches Veterinaire* 23: 167-76.
2. Alexopoulos C., Kritas S.K., Kyriakis C.S., Tzika E., Kyriakis S.C., 2005. Sow performance in an endemically porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)-infected farm after sow vaccination with an attenuated PRRS vaccine. *Veterinary Microbiology* 111: 151–157.
3. Allende R., Lewis T.L., Lu Z., Rock D.L., Kutish G.F., Ali A., Doster A.R., Osorio F.A., 1999. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *Journal of General Virology* 80: 307–315.
4. Allende R., Laegreid W.W., Kutish G.F., Galeota J.A., Wills R.W., Osorio F.A., 2000. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Description of Persistence in Individual Pigs upon Experimental Infection. *J Virol*, 74: 10834–10837.
5. An T.Q., Zhou Y.J., Liu G.Q., Tian Z.J., Li J., Qiu H.J., Tong G.Z., 2007. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of PRRSV isolates in mainland China from 1996 to 2006: coexistence of two NA-subgenotypes with great diversity. *Vet. Microbiol.* 123: 43–52.
6. Balka G., Hornyak A., Balint A., Kiss I., Kecskemeti S., Bakonyi T., Rusvai M., 2008. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains circulating in Hungarian swine herds. *Vet. Microbiol.* 127: 128–135.
7. Batista L., Pijoan C., Torremorell M., 2002. Experimental injection of gilts with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) during acclimatization. *Journal of Swine Health and Production*: 147-152.
8. Bautista E.M. and Molitor T.W., 1999. IFN gamma inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in macrophages. *Arch Virol.* 144: 117-134.
9. Bautista E.M., Suárez P., Molitor T.W., 1999. T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 144: 117–134.
10. Beltran-Alcrudo D., Lubroth J., 2008, 2: 1-5. Disponibile all'indirizzo: [http://www.fao.org/docs/eims/upload/235243/Focus\\_ON\\_2\\_07.pdf](http://www.fao.org/docs/eims/upload/235243/Focus_ON_2_07.pdf)
11. Benfield D.A., Nelson E., Collins J.E., Harris L., Goyal S.M., Robison D., Christianson W.T., Morrison R.B., Gorcyca D., Chladek D., 1992. Characterization of

swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4: 127–133.

12. Benfield D.A, Rowland R, Nelson J, Neiger J, Nelson E, Rossow K, Collins J, 1996. A model for the study of persistent PRRSV infection. *Conf Res Workers Anim Dis* 76: 187.

13. Benfield D.A., Nelson J., Rossow K., Rowland R.R., Lawson S.R., Steffen M., Collins M., 1998. Pathogenesis and persistence of PRRS. In: *Proceedings Leman Conference*. p.169-186.

14. Benfield D.A., Nelson J., Rossow K., 2000. Diagnosis of persistent or prolonged porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections. *Vet Res* 31: 71.

15. Benfield D.A, 2002. What do we know about PRRSV and replication in the pig. In: *Proceedings of the 31<sup>th</sup> American Association of Swine Veterinarians*, Indianapolis, Indiana : 353-356.

16. Beyer J., Fichtner D., Schirmer H., Polster U., Weiland E., Wege H., 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): kinetics of infection in lymphatic organs and lung. *Journal of Veterinary Medicine Series B. Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 47: 9–25.

17. Blaha T., 1992. Occurrence and course of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) in Germany. *Am. Assoc. of Swine Practitioners' Newsletter* 4: 28.

18. Blaha T., 2000. The “colorful” epidemiology of PRRS. *Vet Res*. 31: 77–83.

19. Botner A., Nielsen J., Bille-Hansen V., 1994. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. *Vet Microbiol* 40: 351-360.

20. Bush E., Corso B., Zimmerman J., Swenson S., Pyburn D., Burkgren T., 1999. Update on the acute PRRS investigative study. *Swine Health Prod*. 7: 179–180.

21. Candotti P., Rota-Nodari S., Leotti G., Longo S., Joisel F., 2006. Relationship between piglet PRRS seroprevalence at the end of nursery and re production disorders due to PRRS in sows. In: *19th IPVS Congress*, Copenhagen, Denmark. Volume 1: 54

22. Cano J.P., Dee S.A., Murtaugh M.P., Trincado C.A., Pijoan C.B., 2007. Effect of vaccination with a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine on dynamics of homologous viral infection in pigs. *Am J Vet Res* 68: 565–571.

23. Cavanagh D., 1997. *Nidovirales*: A new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. *Arch Virol.*, 142: 629-633.

24. Cho J.G. and Dee S.A., 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 66: 655-662.
25. Christianson W.T., Collins J.E., Choi C.S., Molitor T.W., Morrison R.B., Joo H.S., 1993. Pathogenesis of PRRS virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can J Vet Res* 57: 262-268.
26. Christopher-Hennings J., Nelson E.A., 1995. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest* 7: 456-464.
27. Christopher-Hennings J., Nelson E.A., Nelson J.K., Benfield D.A., 1997. Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. *Am. J. Vet. Res.* 58: 40-45.
28. Christopher-Hennings J., Holler L.D., Benfield D.A., Nelson E.A., 2001. Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen, serum, peripheral blood mononuclear cells, and tissues from Yorkshire, Hampshire, and Landrace boars. *J Vet Diagn Invest.* 13(2): 133-42.
29. Chung W.B., Lin M.N., Chang W.F., Hsu M., Yang P.C., 1997. Persistence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Intensive Farrow-to-Finish Pig Herds. *Can J Vet Res.* 61(4): 292-298.
30. Collins J.E., Benfield D.A., Christianson W.T., Harris L., Hennings J.S., Shaw D.P., Goyal S.M., McCullough S., Morrison R.B., Joo H.S., Gorcyca D., Chladek D., 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 4: 117-126.
31. Cordioli P., 2003. Prrs, una sindrome da conoscere a fondo. In: Rivista di suinicoltura. *Edagricole* 5: 59-60.
32. COST Action 902, 2010. Understanding and combating porcine reproductive and respiratory syndrome in Europe. EuroPRRS2010. Warsaw 20-22 October 2010, Poland.
33. COST Action 902, 2010. AN UPDATE ON IMMUNO-PATHOGENESIS AND NEW VACCINE STRATEGIES FOR PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME (PRRS). Brescia 8-9 April 2010, Italy.
34. Dea S.A., Bilodeau R., Athanassios R., Sauvageau R.A., Martineau G.P., 1992. Swine reproductive and respiratory syndrome in Quebec: isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus. *Can. Vet. J* 33: 801-808.

35. Dee S.A. and Joo H.S., 1994. Prevention of the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in endemically infected pig herds by nursery depopulation. *Vet Rec* 135: 6-9.
36. Dee SE and Philips RE., 1999. Use of polymerase chain reaction to detect vertical transmission of PRRS virus in piglets from gilt litters. *Swine Health Prod* 7: 237–239.
37. Dee S.A., 2003. Principles of Prevention, Control, and Eradication. In: PRRS Compendium 2nd edition. Ed: Zimmerman JJ, Yoon KJ. Iowa.
38. Dee S., Deen J., Cano J.P., Batista L., Pijoan C., 2006. Further evaluation of alternative air-filtration systems for reducing the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by aerosol. *Can. J. Vet. Res.* 69: 64–70.
39. Dee S., Otake S., Oliveira S., Deen J., 2009. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Research* 40:39.
40. de Lima M., Kwon B., Ansari I.H., Pattnaik A.K., Flores E.F., Osorio F.A., 2008. Development of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus differentiable (DIVA) strain through deletion of specific immunodominant epitopes. *Vaccine* 26: 3594–3600.
41. de Mateo Aznar M., 2008. SINDROME RIPRODUTTIVA RESPIRATORIA SUINA: VALUTAZIONE DELLA CIRCOLAZIONE VIRALE E DELLA RISPOSTA ANTICORPALE IN AZIENDE DEL VENETO E FRIULI-VENEZIA GIULIA. Thesis, Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA. Sede Consorziata: Istituto Zooprofilattico delle Venezie.
42. de Vries A.A.F., Chirnside E.D., Bredenbeek P.J., 1990. All subgenomic mRNAs of equine arteritis virus contain a common leader sequence. *Nucleic Acids Res* 18: 3241–3247.
43. de Vries A.A.F., Post S.M., Raamsman M.J., 1995. The two major envelope proteins of equine arteritis virus associate into disulfide-linked heterodimers. *J Virol* 69: 4668–4674.
44. de Vries A.A.F., Horzinek M.C., Rottier P.J.M., de Groot R.J., 1997. The genome organization of the *Nidovirales*: Similarities and differences between *arteri*-, *toro*-, and *corona* viruses. *Semin Virol* 8: 33–47.
45. Dewey C.E., Wilson S., Buck P., Leyenaar J.K., 1999. The reproductive performance of sows after PRRS vaccination depends on stage of gestation. *Prev Vet Med.*, 40: 233–241.

46. Dewey C., Charbonneau G., Carman S., Hamel A., Nayar G., Friendship R., Eernisse K., Swenson S., 2000. Lelystad-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) identified in Canadian swine. *Can. Vet. J.* 41: 493–494.
47. Done SH, 2001. Porcine reproductive and respiratory syndrome an update, with regard to vaccination. *Pig Journal*, 48: 159-175.
48. Drew T.W., 2000. A review of evidence for immunosuppression due to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet. Res.* 31: 27-39.
49. Egli C., Thur B., Liu L., Hofmann M.A., 2001. Quantitative TaqMan® RT-PCR for the detection and differentiation of European and North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virological Methods* 98: 63–75.
50. Fang Y., Christopher-Hennings J., Brown E., Liu H., Chen Z., Lawson S.R., Breen R., Clement T., Gao G., Bao B., Knudsen D., Daly R., Nelson E., 2008. Development of genetic markers in the non-structural protein 2 region of a US type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for future recombinant marker vaccine development. *J. Gen. Virol.* 89: 3086–3096.
51. Fetzer C., Pesch S., Ohlinger V.F., 2006. High risk of false positive results in a widely used diagnostic test for detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Veterinary Microbiology* 115: 21–31.
52. Forsberg R., 2005. Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus sub-types. *Molecular Biology and Evolution* 11: 2131–2134.
53. Frey M., Eernisse K., Landgraf J., Pearson J., Chladek D., 1992. Diagnostic testing for SIRS virus at the national veterinary services laboratories (NVSL). *American Association of Swine Practitioners Newsletter* 4: 31.
54. Goyal S.M., 1993. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest* 5: 656-664.
55. Greiser-Wilke I., Fiebig K., Drexler C., Grosse Beilage E., 2009. Genetic diversity of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in selected herds in a pig-dense region of North-Western Germany. *Vet. Microbiol.* 143 (2–4): 213–223.
56. Grosse Beilage E., Grosse Beilage Th., Ohlinge V.-F., Pearson J.E., Blaha Th., 1992. Comparative study on the detection of antibodies against the PRRS virus in German breeding and fattening pigs. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsletter* 4: 4-37.
57. Halbur P.G., Paul P.S., Meng X.J., Lum M.A., Andrews J.J., Rathje J.A., 1996b. Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrums deprived pig model. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 8: 11–20.

58. Halbur P.G. and Bush E.J., 1997. Update on abortion storms and sow mortality. *Swine Health Prod.* 5: 73.
59. Halbur P., Rothschild M., Thacker B., 1998. Differences in susceptibility of Duroc, Hampshire, and Meishan pigs to infection with a high-virulence strain (VR2385) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *J. Anim. Breed. Genet.* 115: 181–189.
60. Han J., Wang Y., Faaberg K.S., 2006. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 122 (1–2): 175–182.
61. Hermann J.R., Munoz-Zanzi C.A., Roof M.B., Burkhart K., Zimmerman J.J., 2005. Probability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection as a function of exposure route and dose. *Vet. Microbiol.* 110(1-2):7-16.
62. Hopper S.A., White M.E., Twiddy N., 1992. An outbreak of blue-eared pig disease (*Porcine reproductive and respiratory syndrome*) in four pig herds in Great Britain. *Vet Rec.* 131(7): 140-4.
63. Houben S., Callebaut P., Pensaert M.B., 1995. Comparative study of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *Journal of Virological Methods* 51: 125-128.
64. Indik S., Valicek L., Klein D., Klanova J., 2000. Variations in the major envelope glycoprotein GP5 of Czech strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 81 (Pt 10): 2497–2502.
65. Keay S., Moreau I.A., Provis P., 2002. A retrospective study of PRRS diagnostic results from routine serologic testing of seven PRRS naïve herds. *Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians* pp 147-148.
66. Keffaber K.K., 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *AASP* 1: 2–10.
67. Kennedy S., Moffett D., McNeilly F., Meehan B., Ellis J., Krakowka S., Allan G.M., 2000. Reproduction of Lesions of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome by Infection of Conventional Pigs with Porcine Circovirus Type 2 Alone or in Combination with Porcine Parvovirus. *J Comp Path.* Vol. 122: 9–24.
68. Key K.F., Haqshenas G., Guenette D.K., Swenson S.L., Toth T.E. Meng, X.J., 2001. Genetic variation and phylogenetic analyses of the ORF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet Microbiol.* 83 (3): 249–263.
69. Kim W.I., Lee D.S., Johnson W., Roof M., Cha S.H., Yoon K.J., 2007. Effect of



genotypic and biotypic differences among PRRS viruses on the serologic assessment of pigs for virus infection. *Vet Microbiol.* 123 (1-3): 1-14.

70. Kimman T.G., Cornelissen L.A., Moormann R.J., Rebel J., Stockhofe-Zurwieden N., 2009. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine* 27: 3704–3718.

71. Kiss I., Sami L., Kecskemeti S., Hanada K., 2006. Genetic variation of the prevailing porcine respiratory and reproductive syndrome viruses occurring on a pig farm upon vaccination. *Archives of Virology* 151: 2269–2276.

72. Kranker S., Nielsen J., Bille-Hansen V., Botner A., 1998. Experimental inoculation of swine at various stages of gestation with a Danish isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol.* 61(1-2): 21-31.

73. Kreutz L.C. and Ackermann M.R., 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH dependent endocytic pathway. *Virus Res* 42: 137–147.

74. Kritas S.K., Pedridou E., Filioussis G., Papageorgiou K., Burriel A.R., Christodouloupoulos G., Stadejek T., 2011. Epidemiological investigation in pig farms in Greece. Part I. Respiratory infections of finishing pigs in Northern Greece. 2<sup>nd</sup> Greek Veterinary Congress for Farm animal medicine, Food safety and hygiene and Consumer protection. Thessaloniki 18-20 March.

75. Kyriakis S.C., Alexopoulos C., Saoulidis K., 1997. Update for present status of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Greece. In: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Meeting of Swine Medicine, Thessaloniki, 17 October 1997. Aristotle University of Thessaloniki, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Studies, Clinic of Productive Animal Medicine: 42-44.

76. Labarque G.G., Nauwynck H.J., Van Reeth K., Penseart M.B., 2000. Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. *J Gen Virol.* 81: 1327–1334.

77. Labarque G.G., Van Reeth K., Nauwynck H.J., Drexler C., Van Gucht S., Pensaert M.B., 2004. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. *Vaccine* 22: 4183–4190.

78. Lager K.M. and Mengeling W.L., 1995. Pathogenesis of in utero infection in porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res* 59: 187-192.

79. Lager K.M and Halbur P.G., 1996. Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest* 8: 275-282.
80. Lager K.M., Mengeling W.L., Brockmeier S.L., 1997. Homologous challenge of porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet Microbiol* 58: 113-125.
81. Lager K.M., Mengeling W.L., Brockmeier S.L., 1999. Evaluation of protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge-exposed with an antigenically distinct PRRSV isolate. *Am. J. Vet. Res.* 60: 1022-1027.
82. Lai M.M.C., 1992. RNA Recombination in Animal and Plant Viruses. *Microbiological Reviews* 56: 61-79.
83. Lamontagne L., Page C., Larochelle R., Magar R., 2003. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence in blood, spleen, lymph nodes, and tonsils of experimentally infected pigs depends on the level of CD8high T cells. *Viral Immunology* 16(3): 395-406.
84. Lee C. and Yoo D., 2006. The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. *Virology* 355: 30-43.
85. Le Gall A., Legeay O., Bourhy H., Arnauld C, Albina E, Jestin A., 1998. Molecular variation in the nucleoprotein gene (ORF7) of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Research* 54: 9-21.
86. Li Y., Wang X., Bo K., Tang B., Yang B., Jiang W., Jiang P., 2007. Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China. *Veterinary Journal* 174: 577-584.
87. Li B., Fang L., Xu Z., Liu S., Gao J., Jiang Y., Chen H., Xiao S., 2009. Recombination in Vaccine and Circulating Strains of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. *Emerging Infectious Diseases* [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid), Vol. 15, No. 12.
88. Lopez O.J. and Osorio F.A., 2004. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102: 155-163.

89. Loula T., 1991. Mystery pig disease. *Agripractice* 12: 23–34.
90. Lunney J.K., Benfield D.A., Rowland R.R., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: An update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Res* 154: 1-6.
91. Lunney J.K. and Chen H., 2010. Genetic control of host resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Virus Res* 154:161–169.
92. Mateu E. and Diaz I., 2007. The challenge of PRRS immunology. *The Veterinary Journal* doi:10.1016/j.tvjl.2007.05.022
93. Meier W.A., Galeota J., Osorio F.A., Husmann R.J., Schnitzlein W.M., Zuckermann F.A., 2003. Gradual development of the interferon-(response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* 309:18–31.
94. Meng X.J., 2000. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet. Microbiol.* 74: 309-329.
95. Mengeling W.L. and Lager K.M., 2000. A brief review of procedures and potential problems associated with the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Res.* 31: 61-69.
96. Mengeling W.L., Lager K.M., Vorwald A.C., Koehler K.J., 2003. Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 93:13–24.
97. Mengeling W.L., 2005. The porcine reproductive and respiratory syndrome quandary. Part II. Vaccines and vaccination strategy. *J. Swine Health Prod.* 13:152–156.
98. Meredith M.J., 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). In: Pig Disease Information Centre, Department of Clinical Veterinary Medicine, University of Cambridge. ISBN 0-9520409-7-2.
99. Meulenber J.J.M., De Meijer E.J., Moorman R.J.M., 1993a. Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence. *J Gen Virol* 74:1697-1701.
100. Meulenber J.J.M., Hulst M.M., de Meijer E.J., Moonen P.L., den Besten A., de Kluyver E.P., Wensvoort G., Moorman R.J., 1993b. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192:62–72.

101. Meulenbergh J.J., Petersen-den Besten A., De Kluyver E.P., Moormann R.J., Schaaper W.M., Wensvoort G., 1995a. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206: 155–163.
102. Mortensen S., Stryhn H., Sogaard R., Boklund A., Stark K.D., Christensen J., Willeberg P., 2002. Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Prev. Vet. Med.* 53:83-101.
103. Murtaugh M.P., Xiao Z., Zuckermann F.A., 2002. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol.* 15: 533–547.
104. Murtaugh M.P., Yuan S., Nelson E.A., Faaberg K.S., 2002. Genetic interaction between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strains in cell culture and in animals. *J Swine Health Prod.* 10:15–21.
105. Murtaugh M., 2009. Update on PRRSV immunology and viral genetics: from hopeless to hopeful. In: Proceedings of the 40th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinary, Dallas, TX, 459–462.
106. Music N. and Gagnon C.A., 2010. The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Animal Health Research Reviews*, Page 1 of 29, ISSN 1466-2523 doi: 10.1017/S1466252310000034.
107. Nielsen T.L., Nielsen J., Have P., Baekbo P., Hoff-Jørgensen R., Botner A., 1997. Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 54:101-112.
108. Nielsen H.S., Oleksiewicz M.B., Forsberg R., Stadejek T., Botner A., Storgaard T., 2001. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *J Gen. Virol.* 82:1263–1272.
109. Nilubol D., Platt K.B., Halbur P.G., Torremorell M., Harris D.L., 2004. The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs. *Vet Microbiol.* 102:11-8.
110. Nodelijk G., 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis: a review. *Vet. Q.* 24: 95-100.
111. Nodelijk G., Nielen M., De Jong M.C., Verheijden J.H., 2003. A review of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Dutch breeding herds: population dynamics and clinical relevance. *Prev. Vet. Med.* 60: 37-52.

112. Oleksiewicz M.B., Botner A., Madsen K.G., Storgaard T., 1998. Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Veterinary Microbiology* 64:7-22.
113. Opriessnig T., Halbur P.G., Yoon K.J., Pogranichniy R., Vaughn E., Harmon K., Evans R., Key K.F., Pallares F., Thomas P., Meng X.J., 2002. Comparison of molecular and biological characteristics of a modified live PRRSV vaccine (RespPRRS/Repro™), the parent strain of the vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and two recent field isolates of PRRSV. *Journal of Virology* 76:11837-11844.
114. Osorio F.A., Zuckermann F., Wills R., Meier W., Christian S., Galeota J., Doster A., 1998. PRRSV: comparison of commercial vaccines in their ability to induce protection against current PRRSV strains of high virulence. *Allen D. Leman Swine Conference* Vol. 25: 176-182.
115. Osorio F.A., Galeota J.A., Nelson E., Brodersen B., Doster A., Wills R., Zuckermann F., Laegreid W.W., 2002. Passive transfer of virus specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. *Virology* 302: 9–20.
116. Papatsiros V.G., Alexopoulos C., Kritas S.K., Koptopoulos G., Nauwynck H.J., Pensaert M.P., Kyriakis S.C., 2006. Long-term administration of a commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-inactivated vaccine in PRRSV-endemically infected sows. *J. Vet. Med. B* 53: 266–272.
117. Pesente P., Rebonato V., Sandri G., Giovanardi D., Ruffoni L.S., Torriani S., 2006. Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: a showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management. *Vet. Microbiol.* 114:214–224.
118. Piras F., Bollard S., Laval F., Joisel F., Reynaud G., Charreyre C., Andreoni C., Juillard V., 2005. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus-specific interferon-gamma(+) T-cell responses after PRRS virus infection or vaccination with an inactivated PRRS vaccine. *Viral Immunol.* 18: 381-389.
119. Pitkin A., Deen J., Dee S., 2009. Use of a production region model to assess the airborne spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 136: 1–7.
120. Plagemann P.G, 2006. Neutralizing antibody formation in swine infected with seven strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as measured by indirect ELISA with peptides containing the GP5 neutralization epitope. *Viral Immunology* 19: 285–293.

121. Plana –Duran J., Bastons M., Urniza A., Vayreda M., Vila X., Mane H., 1997. Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 55: 361-370.
122. Prieto C., Suarez P., Simarro I., Garcia C., Fernandez A., Castro J.M., 1997. Transplacental infection following exposure of gilts to porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the onset of gestation. *Vet. Microbiol.* 57(4):301-11.
123. Prieto C., Suarez P., Simarro I., Garcia C., MartinRillo S., Castro J.M., 1997. Insemination of susceptible and preimmunized gilts with boar semen containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 47: 647-654.
124. Prieto C. and Castro J.M., 2005. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenology* 63 (1):1-16.
125. Reiner G., Willems H., Pesch S., Ohlinger V.F., 2010. Variation in resistance to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Pietrain and Miniature pigs. *J. Anim. Breed. Genet.* 127: 100–106.
126. Revilla-Fernandez S., Wallner B., Truschner K., Benczak A., Brem G., Schmoll F., Mueller M., Steinborn R., 2005. The use of endogenous and exogenous reference RNAs for qualitative and quantitative detection of PRRSV in porcine semen. *Journal of Virological Methods* 126: 21–30.
127. Reynaud G., Charreyre C., Tedeschi L., Brun A., Joisel F., Jeannin P., 2000. Homologous PRRSV challenge after vaccination with an inactivated PRRSV vaccine. *Proc 16th Internl. IPVS Congr.*
128. Rossow K.D., 1998. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Vet Pathol* 35: 1-20.
129. Royae A.R., Husmann R.J., Dawson H.D., Calzada-Nova G., Schnitzlein W.M., Zuckermann F.A., Lunney J.K., 2004. Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102: 199–216.
130. Scotti M., Prieto C., Martinez-Lobo F.J., Simarro I., Castro J.M., 2006a. Effects of two commercial European modified-live vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in pregnant gilts. *Vet. J.* 172: 506-514.
131. Scotti M., Prieto C., Alvarez E., Simarro I., Castro J.M., 2007. Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. *Vet Rec.* 161: 809-813.

132. Shi M., Lam T.T.Y., Hon C.C., Hui R.K., Faaberg K.S., Wennblom T., Murtaugh M.P., Stadejek T., Leung F.C., 2010. Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. *Virus Res.* doi:10.1016/j.virus.res.2010.08.014.
133. Snijder E.J. and Meulenber J.J.M., 1998. The molecular biology of arteriviruses. *Journal of General Virology* 79: 961–979.
134. Spilman M.S., Welbon C., Nelson E., Dokland T., 2009. Cryoelectron tomography of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: organization of the nucleocapsid. *Journal of General Virology* 90: 527–535.
135. Stadejek T., Oleksiewicz M.B., Potapchuk D., Podgorska K., 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J. Gen. Virol.* 87: 1835–1841.
136. Stadejek T., Oleksiewicz M., Stankevicius A., Potapchuk D., Scherbakov A., 2007. Molecular epidemiology of EU-genotype PRRSV in Europe: Clues to PRRSV emergence and implications for disease control. In: Proceedings of the 5th International Symposium on emerging and re-emerging pig diseases. Krakow. pp. 168.
137. Stadejek T., Oleksiewicz M.B., Scherbakov A.V., Timina A.M., Krabbe J.S., Chabros K., Potapchuk D., 2008. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Arch. Virol.* 153 (8): 1479–1488.
138. Stueckemann J.A., Holth M., Swart W.J., 1982. Replication of lactate dehydrogenase-elevating virus in macrophages. 2. Mechanism of persistent infection in mice and cell culture. *J Gen. Virol.* 59: 263–272.
139. Suarez P., 2000. Ultrastructural pathogenesis of the PRRS virus. *Vet. Res.* 31: 47-55.
140. Sur J.H., Doster A.R., Galeota J.A., Wills R.W., Osorio F.A., 2000. PRRSV: Study of in vivo cell tropism and virus-induced apoptosis by in situ detection techniques. *Vet. Res.* 31: 58-59.
141. Terpstra C., Wensvoorst G., Pol J.M.A., 1991. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *Vet. Q.* 13: 131–136.
142. Thanawongnuwech R., Halbur P.G., Ackermann M.R., Thacker E.L., Royer R.L., 1998. Effects of low (modified-live virus vaccine) and high (VR-2385) - virulence strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pulmonary clearance of copper particles in pigs. *Vet Pathol.* 35: 398-406.

143. Thanawongnuwech R., Young T.F., Thacker B.J., Thacker E.L., 2001. Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and Mycoplasma hyopneumoniae co-infection model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79: 115–127.
144. Thanawongnuwech R., Amonsin A., Tatsanakit A., Damrongwatanapokin S., 2004. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Vet. Microbiol.* 101: 9–21.
145. Thanawongnuwech R. and Suradhat S., 2010. Taming PRRSV: Revisiting the control strategies and vaccine design. *Virus Res.* 154: 133-140.
146. Vanhee M., Delputte P.L., Delrue I., Geldhof M.F., Nauwynck H.J., 2009. Development of an experimental inactivated PRRSV vaccine that induces virus neutralizing antibodies. *Vet. Res.* 40: 63.
147. Van Alstine W.G., Kanitz C.L., Stevenson G.W., 1993. Time and temperature survivability of PRRS virus in serum and tissues. *J Vet Diagn. Invest* 5:621-622.
148. Van Breedam W., Delputte P.L., Van Gorp H., Misinzo G., Vanderheijden N., Duan X., Nauwynck H.J., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *Journal of General Virology* 91: 1659–1667.
149. van der Linden I.F., Voermans J.J., van der Linde-Bril E.M., Bianchi A.T., Steverink P.J., 2003. Virological kinetics and immunological responses to a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs at different ages. *Vaccine* 21(17-18): 1952-7.
150. Van Reeth K., 1997. Pathogenesis and clinical aspects of a respiratory porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet. Microbiol.* 55: 223-230.
151. Van Reeth K., Labarque G., Nauwynck H., Pensaert M., 1999. Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res. Vet. Sci.* 67: 47–52.
152. van Vugt Joke J.F.A., Storgaard T., Oleksiewicz M.B., Bøtner A., 2001. High frequency RNA recombination in porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs preferentially between parental sequences with high similarity. *Journal of General Virology* 82: 2615–2620.
153. Wensvoort G., Terpstra C., Pol J.M.A., Lask E.A., Bloemraad M., de Kluyver E.P., Kragten C., van Buitten L., den Besten A., Wagenaar F., Broekhuijsen J.M., Moonen P.J.M., Zetstra T., de Boer E.A., Tibben Ah.J., de Jong M.F., van't Veld P., Groenland G.J.R., van Gennep J.A., Voets M.Th., Verheijden J.H.M., Braamkamp J., 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *The Veterinary Quarterly* 13: 121–130.



154. White M.E.C., 1992. The clinical signs and symptoms of blue-eared pig disease (PRRS). *Pig Veterinary Journal* 28: 62-68.
155. Wills R.W., Zimmerman J.J., Yoon K.J., Swenson S.L., Hoffman L.J., McGinley M.J., Hill H.T., Platt K.B., 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet. Microbiol.* 57(1): 69-81.
156. Wissink E.H., Kroese M.V., van Wijk H.A., Rijsewijk F.A., Meulenbergh J.J., Rottier P.J., 2005. Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virology* 79: 12495–12506.
157. Wu W.H., Fang Y., Farwell R., Steffen-Bien M., Rowland R.R., Christopher-Hennings J., Nelson E.A., 2001. A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* 287: 183–191.
158. Xylouri Frangiadaki E., 1993. First serological diagnosis of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in Greece. *Journal of Hellenic Veterinary Association* 44: 59-60.
159. Yoon I.J., Joo H.S., Christianson W.T., Kim H.S., Collins J.E., Morisson R.B., Dial G.D., 1992b. An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility T and respiratory syndrome virus in swine sera. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4: 144-7.
160. Yoon I.J., Joo H.S., Goyal S.M., Molitor T.W., 1994. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest* 6: 289–292.
161. Yoon K.J., Christopher-Hennings J., Nelson E.A., 2003. Diagnosis of PRRS Virus. In: PRRS Compendium 2nd edition. Ed: Zimmerman J.J., Yoon K.J. Iowa.
156. Yoshii M., Kaku Y., Murakami Y., Shimizu M., Kato K., Ikeda H., 2005. Genetic variation and geographic distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan. *Archives of Virology* 150: 2313–2324.
162. Yuan S., Nelsen C.J., Murtaugh M.P., Schmitt B.J., Faaberg K.S., 1999. Recombination between North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 61: 87–98. DOI:10.1016/S0168-1702(99)00029-5.
163. Zhou Y.J., Hao X.F., Tian Z.J., Tong G.Z., Yoo D., An T.Q., Zhou T., Li G.X., Qiu H.J., Wei T.C., Yuan X.F., 2008. Highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China. *Transbound Emerg. Dis.* 55 (3–4): 152–164.
164. Zhuang Q., Barfod K., Wachmann H., Mortensen S., Willeberg P., 2002. Serological surveillance for PRRS in Danish genetic pig herds and risk factors for PRRS infection. *Proc. Congr. Int. Pig Vet. Soc.* 2: 231.

165. Zimmerman J.J., Yoon K.J., Pirtle E.C., 1997. Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species. *Vet. Microbiol.* 55: 329–336.
166. Zimmerman J.J., Epperson W., Wills R.W., McKean J.D., 1997. Results of the recent survey of membership of the AASP for outbreak of sow abortion and mortality. In: Proceedings of the Ann. Meeting of the Livestock Conservation Institute, Ohio, USA, April 1-3, 1997, pp. 121-128.
167. Zimmerman J., Benfield DA., Murtaugh MP., Osorio F., Stevenson GW., Torremorell M., 2006. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. In Disease of Swine, 9th ed. Ed: Straw B.E., Zimmerman J.J., D’Allaire S., Taylor D. Iowa p387-418.
168. Zuckermann F.A., Husmann R.J., Schwartz R., Brandt J., Mateu E., Martin S., 1998. Interleukin-12 enhances the virus-specific interferon gamma responses of pigs to an inactivated pseudorabies virus vaccine. *Vet Immunol Immunopathol* 63: 57-67.
169. Zuckermann F.A., Garcia E.A., Luque I.D., Christopher-Hennings J., Doster A., Brito M., Osorio F., 2007. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Vet. Microbiol.* 123: 69–85.

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

**Πίνακας 1.** Δείγματα χοιριδίων, προέλευση και αποτελέσματα σχετικά με την ανίχνευση του ιού του ΣΑΑΣΧ. Η αλλαγή χρώματος στον αύξοντα αριθμό επισημαίνει την διαφορετική αποβολή ή τοκετό. Οι κωδικοί 01/10, 02/10 κ.ο.κ είναι τρόπος αρίθμησης των δειγμάτων του εργαστηρίου δηλώνοντας ταυτόχρονα τη χρονιά λήψης αυτών (2010).

A/A	Χοιρίδια	Δείγματα	RT-PCR διάγνωσης σε δύο βήματα	Real time PCR διάγνωσης
01/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	-	-
02/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	-	-
03/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	-	-
04/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	-	-
05/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	+	+
06/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	+	+
07/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	+	+
08/10 Θνησιγενές	Τοκετός	Ορός Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	-	-
09/10 Νεκρό	Τοκετός	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	-	-

A/A	Χοιρίδια	Δείγματα	RT-PCR διάγνωσης σε δύο βήματα	Real time PCR διάγνωσης
10/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	-	-
11/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	-	-
12/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	-	-
13/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	+	+
14/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	+	+
15/10 Θνησιγενές	Τοκετός	Ορός Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	+	+
16/10 Θνησιγενές	Τοκετός	Ορός Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	+	+
17/10 Νεκρό	Τοκετός	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	+	+
18/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	+	+
19/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	+	+

A/A	Χοιρίδια	Δείγματα	RT-PCR διάγνωσης σε δύο βήματα	Real time PCR διάγνωσης
20/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	+	+
21/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	+ + - -	+ + - +
22/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	+	+
23/10	Αποβολή	Πνεύμονας Σπλήνας Νεφροί Καρδιά	+	+

