

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

ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΒΟΕΙΟΥ
ΕΡΠΗΤΟΪΟΥ 1 (BHV-1) ΣΕ ΕΚΤΡΟΦΕΣ ΑΓΕΛΑΔΩΝ
ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΜΠΑΤΖΙΟΥ ΡΟΙΔΩ

Συμβουλευτική Επιτροπή

Εισηγήτρια: Ξυλούρη Ε., Αν. Καθηγήτρια

Μενεγάτος Ι., Καθηγητής

Οικονομόπουλος Ι., Επ. Καθηγητής

Αθήνα, Μάρτιος 2010

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

ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΒΟΕΙΟΥ
ΕΡΠΗΤΟΪΟΥ 1 (BHV-1) ΣΕ ΕΚΤΡΟΦΕΣ ΑΓΕΛΑΔΩΝ
ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΜΠΑΤΖΙΟΥ ΡΟΙΔΩ

Εξεταστική Επιτροπή:

Ξυλούρη Ε., Αν. Καθηγήτρια
Μενεγάτος Ι., Καθηγητής
Κουτσούλη Π., Λέκτορας
Μπιζέλης Ι., Αν. Καθηγητή
Οικονομόπουλος Ι., Επ. Καθηγητής

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλα τα μέλη Δ.Ε.Π του Μ.Τ.Σ του Τ.Ε.Ζ.Π.Υ του Γ.Π.Α. που μου έδωσαν την ευκαιρία να εμβαθύνω στις σπουδές μου. Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων του Γ.Π.Α.

Στην εισηγήτρια της μεταπτυχιακής διατριβής μου Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ε. Ξυλούρη, θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά ευγνωμοσύνη μου, καθώς με την ουσιαστική της καθοδήγηση συνέβαλε καθοριστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης, από το πρώτο έως το τελευταίο βήμα της.

Στον Καθηγητή κ. Ι. Μενεγάτο, Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμησή μου για την ηθική στήριξη και τη βοήθεια που μου παρείχε, δείχνοντας μου πίστη από την έναρξη των μεταπτυχιακών μου σπουδών και διευκολύνοντας κάθε στάδιο της μελέτης μου.

Τις βαθύτατες ευχαριστίες μου θέλω να εκφράσω στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ι. Οικονομόπουλο, για τις ουσιαστικές και εμπειριστατωμένες υποδείξεις του στο πειραματικό τμήμα της εργασίας, καθώς και στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ι. Μπιζέλη και Λέκτορα κ. Π. Κουτσούλη για τις σημαντικές παρατηρήσεις τους. Επίσης, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω βαθύτατα την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Κ. Σωτηράκογλου για την πολύτιμη βοήθειά της σε κάθε στάδιο διεξαγωγής της επιζωοτιολογικής μελέτης. Τέλος, ευχαριστώ τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Α. Λυμπερόπουλο για τη βοήθειά του κατά τη συλλογή των δειγμάτων.

Ευχαριστώ επίσης τον διδάκτορα κ. Γ. Οικονόμου και τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Β. Ντάφη για την αμέριστη στήριξή τους σε κάθε στάδιο της μελέτης μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στο μέλος Ε.Τ.Ε.Π κ. Θ. Βαγγελή για τη συνεχή βοήθειά του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με στήριξε-παρά τους δύσκολους καιρούς- τόσο ηθικά όσο και υλικά, καθώς χωρίς την υποστήριξή τους δεν θα ήταν δυνατή η διενέργεια αυτής της μελέτης.

ΣΤΟΝ ΑΝΙΨΙΟ ΜΟΥ.....

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A/A	Τίτλος	Σελίδα
A	Περίληψη	1
B	Abstract	2
Γ	ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	4
	2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
	2.1 Ιστορική αναδρομή	6
	2.2 Ευπάθεια	7
	2.3 Ταξινόμηση-Μορφολογία	7
	2.3.1 Φυσικές και χημικές ιδιότητες του ιού	10
	2.3.2 Βιολογικές ιδιότητες του ιού	11
	2.3.3 Αντιγονική συγγένεια του ιού	11
	2.4 Γονιδίωμα και πρωτεΐνες του BHV-1	12
	2.5 Επιζωοτιολογία	14
	2.5.1 Εύρος ξενιστών και γεωγραφική κατανομή	15
	2.5.2 Ξενιστές-δεξαμενές του ιού στη φύση-φορείς	15
	2.5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την εξάπλωση του BHV-1	18
	2.6 Δημόσια υγεία	19
	2,7 Παθογένεια	19
	2.7.1 Αντιγραφή του BHV-1 σε κύτταρα	19
	2.7.2 Είσοδος του ιού στον οργανισμό του ξενιστή και τροπισμός	21
	2.7.3 Αντιγραφή του ιού στο βλεννογόνο της πύλης εισόδου	22

	2.7.4 Διάδοση και εξάπλωση μέσα στον ξενιστή	23
	2.7.4.1 Τοπική διασπορά	24
	2.7.4.2 Συστηματική εξάπλωση	24
	2.7.4.3 Προσβολή του νευρικού συστήματος	25
	2.8 Ανοσολογική αντίδραση-Απάντηση	25
	2.8.1 Χυμική ανοσία	27
	2.8.2 Κυτταρική ανοσία	28
	2.8.3 Μητρική ανοσία	28
	2.8.4 Μηχανισμοί ανοσολογικής διαφυγής	30
	2.9 Λανθάνουσα κατάσταση	30
	2.10 Συμπτώματα της νόσου	36
	2.10.1 Λοιμώδης Ρινοτραχεΐτιδα των Βοοειδών Α.Ρ.Β. (IBR)	37
	2.10.2 Λοιμώδης Φλυκταινώδης Αιδοιοκολπίτιδα (IPV)	38
	2.10.3 Λοιμώδης Βαλανοποσθίτιδα (IBP)	39
	2.10.4 Πολυσυστηματική νόσος στα νεογέννητα	42
	2.10.5 Α.Ρ.Β και αποβολές	43
	2.10.6 Αλλοιώσεις στο αναπτυσσόμενο έμβρυο	44
	2.10.7 Α.Ρ.Β - Εγκεφαλίτιδα	45
	2.11 Νοσηρότητα και θνησιμότητα	46
	2.12 Αλλοιώσεις	46
	2.12.1 Λοιμώδης Ρινοτραχεΐτιδα των Βοοειδών	46
	2.12.2 Λοιμώδης Φλυκταινώδης Αιδοιοκολπίτιδα και Λοιμώδης Βαλανοποσθίτιδα	48

	2.12.3 Λ.Ρ.Β -Αποβολή	48
	2.12.4 Λ.Ρ.Β Εγκεφαλίτιδα	49
	2.12.5 Διάγνωση	49
	2.12.5.1 Εργαστηριακή Διάγνωση	49
	2.12.5.1.1 Απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες	51
	2.12.5.1.2 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις	52
	2.12.5.1.3 Ηλεκτρονική μικροσκοπία	53
	2.12.5.1.4 Μοριακές τεχνικές	53
	2.12.5.1.5 Ορολογικές τεχνικές	53
	2.13 Κλασικές μέθοδοι πρόληψης και έλεγχου του BHV-1	55
	2.13.1 Η στρατηγική DIVA (Differentiation of Infected from Vaccinated Animals)	57
	2.13.2 Ο απώτερος στόχος της στρατηγικής DIVA	61
	2.13.3 Τύποι εμβολίων και εφαρμογή τους	62
	2.14.Εκρίζωση της νόσου	64
	Κατάσταση της Λ.Ρ.Β στην Ελλάδα	67
Δ	3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	70
	3.1 Υλικά και μέθοδοι	71
	3.1.1 Σκοπός της έρευνας	71
	3.1.2 Περιοχές δειγματοληψίας	71
	3.1.3 Συλλογή δειγμάτων	72
	3.1.4.Συλλογή επιζωοτιολογικών στοιχείων	73
	3.2 Ανίχνευση αντισωμάτων	74
	3.2.1 Περιγραφή της διαγνωστικής μεθόδου	74
	3.2.2 Διαδικασία	75

		3.2.3 Στατιστική ανάλυση	77
Ε		3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	78
		3.3.1. Παρουσία αντισωμάτων στις δύο κύριες κατηγορίες ζώων	79
		3.3.1.1 Μη εμβολιασμένα ζώα	79
		3.3.1.2 Εμβολιασμένα ζώα	79
		3.3.2 Μέθοδος γονιμοποίησης και BHV-1	81
		3.3.3 Παρουσία του BHV-1 σε διάφορες ηλικιακές κατηγορίες	82
		3.3.4. Ύπαρξη του BHV-1 στις εκτροφές και εμφάνιση αποβολών	84
ΣΤ		3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	84
Ζ		3.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	88
Η		3.6 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ – ΜΕΤΡΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΝΟΣΗΜΑΤΟΣ	88
Θ		ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	90
		Σύντομο Βιογραφικό υποψηφίου	99

**ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΒΟΕΙΟΥ ΕΡΠΗΤΟΪΟΥ 1
(BHV-1) ΣΕ ΕΚΤΡΟΦΕΣ ΑΓΕΛΛΩΝ
ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Λοιμώδης Ρινοτραχειίτιδα των Βοοειδών (Λ.Ρ.Β) είναι ένα ιογενές νόσημα με παγκόσμια εξάπλωση. Οφείλεται σε ιό που ανήκει στην οικογένεια Herpesviridae, στην υποοικογένεια Alphaherpesvirinae και στον υπότυπο 1 (Bovine Herpes Virus-1, BHV-1). Ο BHV-1 προκαλεί νόσο που χαρακτηρίζεται από πυρετό, προσβολή της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ρινοτραχειίτιδα) και επιπεφυκίτιδα. Παρατηρούνται επίσης αποβολές στο τρίτο τρίμηνο της κυοφορίας και γέννηση θνησιγενών μόσχων. Σε μη έγκυα ζώα, στα οποία όμως έγινε σπερματέγχυση με μολυσμένο σπέρμα, παρατηρείται υπογονιμότητα και πιο μικρή διάρκεια κύκλων. Οι νεογέννητοι μόσχοι μπορεί να εκδηλώσουν την πολυσυστηματική μορφή της νόσου με την εκδήλωση μηνιγγοεγκεφαλίτιδας και γαστρεντερίτιδας με θανατηφόρο κατάληξη. Ο BHV-1 μπορεί επίσης να προκαλέσει τη λοιμώδη φλυκταινώδη αιδοιοκολπίτιδα (Infectious Pustular Vulvovaginitis, IPV) και τη λοιμώδη βαλανοποσθίτιδα (Infectious BalanoPosthitis, IBP) στις αγελάδες και στους ταύρους αντίστοιχα.

Σε επιζωοτιολογικές έρευνες βασισμένες στην ανίχνευση αντισωμάτων κατά του BHV-1 που έχουν διεξαχθεί σε ευρωπαϊκές χώρες έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη οροθετικών ζώων. Έκδηλη είναι η παρουσία του ιού και σε γειτονικές της Ελλάδας χώρες προκαλώντας σημαντικές οικονομικές απώλειες.

Στην παρούσα έρευνα έγινε για πρώτη φορά, σε τέτοια έκταση στην Ελλάδα, επιδημιολογική μελέτη της μόλυνσης των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής από τον BHV-1 με την ανίχνευση αντισωμάτων κατά της γλυκοπρωτεΐνης E (gE) του ιού. Η ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων κατέστη δυνατή με τη χρήση της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA. Η έρευνα έλαβε χώρα το καλοκαίρι του 2009 και αφορούσε στη λήψη αίματος από ζώα σε εκτροφές αγελάδων γαλακτοπαραγωγής στη Μακεδονία, τη Θράκη, τη Θεσσαλία, την Ήπειρο, τα Επτάνησα και την Αττική. Συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν 550 δείγματα αίματος από τα οποία τα 366 βρέθηκαν θετικά (ύπαρξη αντισωμάτων κατά της γλυκοπρωτεΐνης E του BHV-1), ποσοστό της τάξης του 66.5 %.

Από το σύνολο των ζώων τα 453 δεν ήταν εμβολιασμένα κατά του BHV-1 και από αυτά τα 295 ήταν θετικά, ποσοστό ίσο με 65,1 % ενώ τα 97 ήταν εμβολιασμένα κατά του BHV-1. Από τα τελευταία, στα 66 ζώα είχε γίνει χρήση συμβατικών εμβολίων και βρέθηκε 71.2 %, ποσοστό οροθετικότητας, γεγονός που προκαλεί αμφιβολίες για τη σωστή εφαρμογή των εμβολιασμών ενώ τα 31 ήταν εμβολιασμένα με τα νεότερης

τεχνολογίας ιχνηθετημένα εμβόλια όπου ανιχνεύτηκαν αντισώματα σε ποσοστό 77.4 %. Στην περίπτωση αυτή το θετικό αποτέλεσμα υποδηλώνει μόλυνση από τον φυσικό ιό καθώς τα εμβόλια αυτά (στρατηγική DIVA) δίνουν τη δυνατότητα διαχωρισμού των εμβολιακών αντισωμάτων από αυτά που προέρχονται από φυσική μόλυνση.

Επιπλέον, βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό οροθετικότητας μεταξύ των ζώων που γονιμοποιήθηκαν με τεχνητή σπερματέγχυση και αυτών που γονιμοποιήθηκαν με φυσική οχεία, με μεγαλύτερο ποσοστό οροθετικών ζώων στην πρώτη περίπτωση, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στη χρήση μη ελεγμένου σπέρματος για τον BHV-1 καθώς και στην ενδεχομένως λανθασμένη και μη άσηπτη εκτέλεση της τεχνητής σπερματέγχυσης.

Στατιστικά σημαντική ήταν η διαφορά που παρατηρήθηκε και στη σύγκριση του ποσοστού οροθετικότητας μεταξύ των ηλικιακών ομάδων από 0 έως και 4 ετών και από 4 ετών και πάνω, το οποίο ήταν μεγαλύτερο στην πρώτη ομάδα, γεγονός που συνάδει με την φύση του ιού που προκαλεί χρόνια μόλυνση και καταλείπει χρόνιους φορείς καθώς και με την ύπαρξη ενζωτικού χαρακτήρα της νόσου στις εξεταζόμενες εκτροφές.

Τέλος, παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό αποβολών στα μη εμβολιασμένα ζώα σε σχέση με τα εμβολιασμένα (20 % και 0.048 % αντίστοιχα), γεγονός που ενδεχομένως μπορεί να δικαιολογηθεί από το ότι τα εμβόλια μπορούν να μειώσουν την ένταση των συμπτωμάτων της μόλυνσης από τον BHV-1 και τη συχνότητα των αποβολών.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μόλυνση από τον BHV-1 είναι διαδεδομένη στις εκτροφές του ευρύτερου Ελλαδικού χώρου, ο ιός υπάρχει και κυκλοφορεί, καθώς σε όλες τις περιοχές δειγματοληψίας βρέθηκαν θετικά ζώα και το ποσοστό οροθετικότητας είναι μεγαλύτερο στην περίπτωση που χρησιμοποιείται τεχνητή σπερματέγχυση (με μη ελεγμένο σπέρμα) καθώς και σε ζώα μεγαλύτερα των 4 ετών.

Λέξεις κλειδιά: BHV-1, αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, επιζωοτιολογία, Ελλάδα.

ABSTRACT

Infectious Bovine Rhinotracheitis is a widespread disease caused by Bovine Herpes virus-1 (BHV-1). BHV-1 is a member of the family Herpesviridae, the subfamily Herpesvirinae and it belongs to subtype 1. It causes a disease characterized of high fever, infection of the upper respiratory tract (rhinotracheitis) and conjunctivitis. It also causes abortions during the last trimester of gestation and stillbirths. Infertility and shorter estric cycles may be observed when contaminated semen is used for the artificial insemination of cows. BHV-1 also causes lethal multisystemic disease to newborn calves where meningoencephalitis and gastroenteritis are observed.

When the genital tract is infected BHV-1 causes Infectious Pustular Vulvovaginitis- IPV to cows and Infectious BalanoPosthitis- IBP to bulls.

Epizootiological surveys based on the detection of antibodies against BHV-1, which were conducted to many European countries, have proved that BHV-1 is present in these areas causing serious economic losses.

In this research an epidemiological study has been conducted for the first time- to such an extent- in Greece regarding the level of BHV-1 infection in dairy cows. A specific ELISA method was used in order for antibodies against BHV-1 glycoprotein E to be detected.

The survey took place during the summer of 2009 and blood samples were taken from dairy herds in Macedonia, Thrace, Thessaly, Epirus, the Ionian Islands and Attiki. Totally, 550 sera were tested using ELISA from which 366 were positive (they had antibodies against BHV-1 glycoprotein E) which equals to 66.5 %.

453 cows were not vaccinated against BHV-1 and were found to be 65.1% seropositive. 66 cows were vaccinated with conventional vaccines and 71.2 % of them were seropositive, which shows that perhaps vaccinations are not properly conducted. 31 cows were vaccinated with marker vaccines and 77.4 % of them had antibodies against BHV-1. In this case the positive result shows the extent of natural infection as marker vaccines (DIVA strategy vaccines) allow the differentiation between antibodies of natural origin and those that are produced after vaccination.

Moreover, a statistically significant difference- regarding seropositivity- was observed between cows that were artificially inseminated and those that were naturally served, which is probably due to the fact that semen is not tested for BHV-1 contamination.

Also, when the percentages of seropositivity of animals that were less than or equal to 4 years old and those that were older than 4 years old were compared, a statistically significant difference was observed, as animals older than 4 years old were found to be more seropositive. This finding is in accordance with the nature of BHV-1, as it establishes life-long infection and animals become life-long latent carriers. Also this result shows that perhaps BHV-1 infection is enzootic in the herds tested.

Lastly, a greater percentage of abortions was observed in non vaccinated animals compared to the vaccinated ones (20% and 0.048 % respectively) which can be possibly justified from the fact that vaccines can reduce the intensity of clinical signs that accompany BHV-1 infection as well as the incidence of abortions.

Consequently, the results of this study clearly show that BHV-1 infection is present in a great extent in Greek herds and BHV-1 circulates in the periphery of Greece as antibodies against it were detected in all the areas of sampling. Also, the percentage of seropositivity was higher in animals that were artificially inseminated as well as in animals older than 4 years old.

Key words: BHV-1, dairy cows, epizootiology, Greece.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΛΟΙΜΩΔΗΣ –ΡΙΝΟΤΡΑΧΕΪΤΙΔΑ ΤΩΝ ΒΟΟΕΙΔΩΝ (ΛΡΒ) INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS (IBR)

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Λοιμώδης Ρινοτραχεΐτιδα των Βοοειδών (ΛΡΒ) είναι μία αναπνευστική νόσος των βοοειδών η οποία χαρακτηρίζεται από ρινίτιδα, τραχεΐτιδα και πυρετό. Προκαλείται από το βόειο ερπητοϊό 1 (Bovine HerpesVirus 1, BHV-1 ή BoHV-1) ο οποίος επίσης προκαλεί τη λοιμώδη φλυκταινώδη αιδοιοκολπίτιδα (Infectious Pustular Vulvovaginitis, IPV), τη λοιμώδη βαλανοποσθίτιδα (Infectious BalanoPosthitis, IBP), αποβολές και επιπεφυκίτιδα. Ακόμη, προκαλεί μία θανατηφόρο πολυσυστηματική νόσο στους νεογέννητους μόσχους καθώς και ήπια, αφανή - λανθάνουσα μόλυνση στα ζώα όλων των ηλικιών.

Ο BHV-1 είναι ένα από τα πιο σημαντικά παθογόνα αίτια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ενός σοβαρού αναπνευστικού συνδρόμου των βοοειδών γνωστό ως «πυρετός της μεταφοράς» (Yates, 1982). Ανήκει στη λίστα Β του καταλόγου του ΟΙΕ που περιλαμβάνει μεταδοτικές ασθένειες με κοινωνικό-οικονομική σημασία, οι οποίες είναι σημαντικές για το διεθνές εμπόριο ζωϊκού κεφαλαίου και ζωϊκών προϊόντων (Turin & Russo, 1999).

Ο ιός BHV-1 έχει παγκόσμια εξάπλωση και είναι υπεύθυνος για σημαντικές απώλειες που οφείλονται στο ίδιο το νόσημα (πτώση γαλακτοπαραγωγής, απώλεια βάρους) αλλά και στους περιορισμούς στο εμπόριο των βοοειδών που αυτό συνεπάγεται.

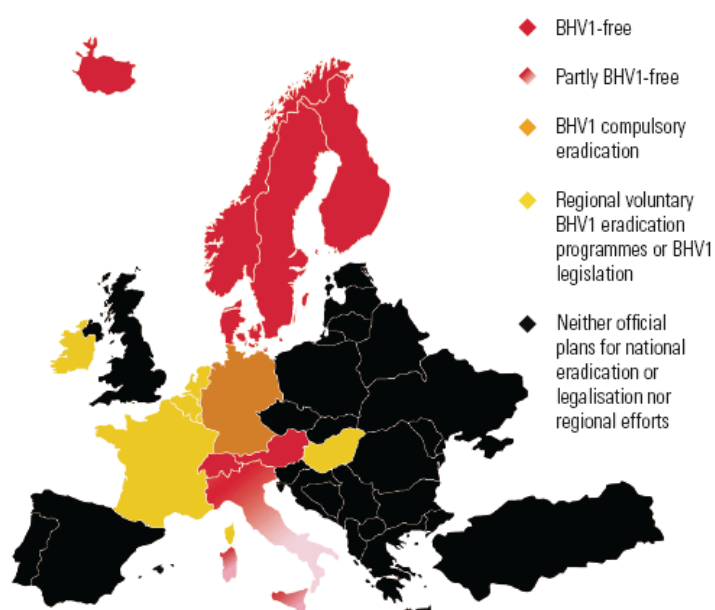
Έτσι, προγράμματα ελέγχου της νόσου αναπτύχθηκαν ραγδαία μετά την αρχική εμφάνιση της Λ.Ρ.Β. στη βόρεια Αμερική. Λαμβάνοντας υπόψη το επίπεδο της παρουσίας του ιού, τα προγράμματα εκρίζωσης βασίζονται στην ανίχνευση των οροθετικών ζώων και απομάκρυνσή τους είτε στους επαναλαμβανόμενους εμβολιασμούς των μολυσμένων εκτροφών (Ackermann *et al.*, 2006).

Εξαιτίας της αδυναμίας των εμβολίων να εμποδίσουν τη μόλυνση από τον BHV-1 καθώς και την εγκατάσταση λανθάνουσας μόλυνσης, τα προγράμματα εκρίζωσης του νοσήματος μπορεί να διαρκέσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα πριν τελικά εκλείψει αυτός ο (καλά προσαρμοσμένος σε αυτά) ιός των βοοειδών.

2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Οι Büchner και Trommsdorf περιέγραψαν στη Γερμανία το 19^ο αιώνα το λεγόμενο “*Bläschenausschlag* (αφροδίσιο φυσαλιδώδες εξάνθημα, coital vesicular exanthema), μία νόσο των βοοειδών που πιθανότατα οφειλόταν στον βόειο ερπητοϊό-1 (BHV-1) (Straub, 1990). Ο αιτιολογικός παράγοντας αποδείχθηκε το 1928 από τους Reisinger και Reimann, οι οποίοι κατάφεραν να μεταδώσουν την αφροδίσια νόσο μέσω ενός διηθητού παράγοντα. Η εκδήλωση της μόλυνσης από τον BHV-1, γνωστή ως λοιμώδης φλυκταινώδης αιδοιοκολπίτιδα (IPV) στις αγελάδες και λοιμώδης φλυκταινώδης βαλανοποσθίτιδα (IBP) στους ταύρους, εντοπιζόνταν μόνο στα γεννητικά όργανα μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1950. Εκείνη την εποχή εμφανίστηκε η αναπνευστική μορφή της νόσου στις εκτροφές εντατικής πάχυνσης των μόσχων στη βόρεια Αμερική. Αυτή η πιο σοβαρή μορφή της νόσου οφειλόμενη σε μόλυνση από τον BHV-1, ονομάστηκε Λοιμώδης Ρινοτραχεΐτιδα των Βοοειδών (Λ.Ρ.Β). Η Λοιμώδης Ρινοτραχεΐτιδα των Βοοειδών επίσης αναγνωρίστηκε ως κλινική οντότητα το 1950 σε εκτροφές βοοειδών στις δυτικές περιοχές των Η.Π.Α. Παρόλο που η ασθένεια παρέμεινε σε μικρή συχνότητα στις εκτροφές της βόρειας Αμερικής, έγινε πολύ συχνή στις μεγάλες εκτροφές του Colorado και της California, όπου τράβηξε την προσοχή των ειδικών όσο καμία άλλη νόσος των βοοειδών (Straub, 1990).

Η Λ.Ρ.Β εξαπλώθηκε ραγδαία στην Ευρώπη όταν άρχισαν οι εισαγωγές γαλακτοπαραγωγών αγελάδων από τη βόρεια Αμερική με στόχο τη βελτίωση της γαλακτοπαραγωγής των αγελάδων. Στην Ελλάδα διαπιστώθηκε για πρώτη φορά το 1968 (Παπαδόπουλος Ο., 1998).



Εικόνα 2.1.1. Κατάσταση της Λ.Ρ.Β στην Ευρώπη (Pfizer Animal Health, Μάιος 2006).

Όπου

BHV-1 free: χώρα απαλλαγμένη από τον ιό BHV-1.

Partly BHV-1 free: μερικώς απαλλαγμένη από τον ιό χώρα

BHV-1 compulsory eradication: πρόγραμμα υποχρεωτικής απαλλαγής από τον ιό.

Regional voluntary BHV-1 eradication programs or BHV-1 legislation: κατά περιοχές ύπαρξη εθελοντικών προγραμμάτων απαλλαγής από τον BHV-1 ή ύπαρξη σχετικής νομοθεσίας.

Neither official plans for national eradication or legislation nor regional efforts: Έλλειψη νομοθεσίας ή επίσημου σχεδιασμού για την απαλλαγή από τον BHV-1 καθώς και απουσία παρέμβασης κατά περιοχές.

2.2 ΕΥΠΑΘΕΙΑ

Ο ιός προσβάλλει μόνο τα βοοειδή. Αναφέρθηκε όμως η απομόνωσή του και από αίγες με αναπνευστική νόσο, καθώς και από θνησιγενή χοιρίδια (Straub, 1990; Six *et al.*, 2001).

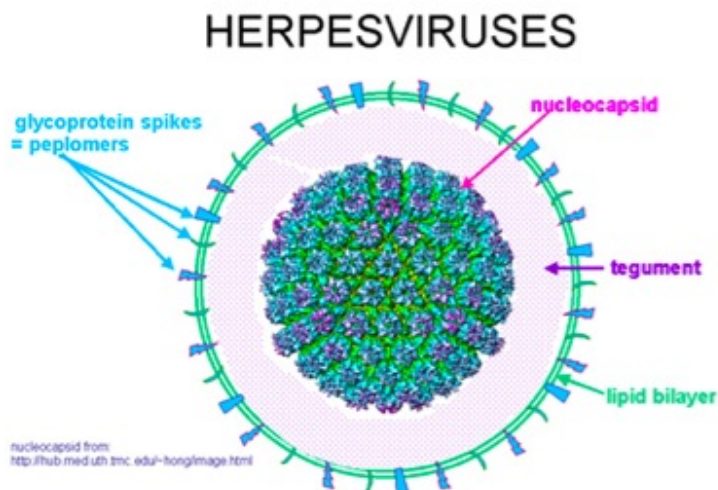
2.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ-ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Ο βόειος ερπητοϊός 1, (Bovine Herpes Virus -1, BHV -1) είναι ένας DNA ιός που ανήκει στην οικογένεια Herpesviridae, στην υποοικογένεια Alphaherpesvirinae και στο γένος Varicellovirus. Τα μέλη της οικογένειας των α-ερπητοϊών κατατάσσονται με βάση το ποικίλο εύρος των ξενιστών τους, τον σχετικά μικρό κύκλο αντιτυπίας τους, το γρήγορο πολλαπλασιασμό τους στις κυτταροκαλλιέργειες, την καταστροφή των κυττάρων που μολύνουν και τέλος, με βάση την ικανότητά τους να εγκαθιστούν λανθάνουσα μόλυνση πρωτογενώς -αλλά όχι αποκλειστικά- στα γάγγλια των αισθητικών νευρώνων (Τσότσος Α., 1992).

Η υποοικογένεια περιλαμβάνει τα εξής γένη στον άνθρωπο: Herpes Simplex Virus (HSV-1), Varicellovirus (VZV) και στα ζώα: τον ιό BHV-1 των βοοειδών, τον ιό της νόσου του Marek των πτηνών, τον ιό της νόσου του Aujeszky των χοίρων (Pseudo Rabies Virus, PRV) κ.α.

Οι ιοί της οικογένειας των ερπητοϊών, βασίζονται στην αρχιτεκτονική δομή του βιρίου. Ένα βίριο αυτής της οικογένειας αποτελείται από τον πυρήνα, ο οποίος

περιέχει ένα ευθύγραμμο δίκλωνο μόριο DNA, από ένα εικοσαεδρικό καψίδιο 100-110 nm σε διάμετρο που περιλαμβάνει 162 καψομερίδια, από τη θεμέλια ουσία και τέλος, από έναν φάκελο που φέρει ροπαλοειδείς προεξοχές (spikes) των γλυκοπρωτεϊνών του ιού στην επιφάνειά του (Roizman *et al.*, 2001).



Εικόνα 2.3.1. Απεικόνιση της δομής του βιρίου των ερπητοϊών. (<http://homepage.usask.ca/~vim458/virology/studpages2007/ehv/viralcharacteristics.html>. Προσπελάστηκε στις 18/1/2010).

Όπου:

nucleocapsid: νουκλεοκαψίδιο

glycoprotein spikes: ροπαλοειδείς προεξοχές των γλυκοπρωτεϊνών του ιού

peplomers: πεπλομερή

tegument: θεμέλια ουσία

lipid bilayer: λιπιδική διπλοστιβάδα

Στα συνήθη κριτήρια ταξινόμησης των ιών στην οικογένεια Herpesviridae έχει προστεθεί και η συντήρηση της αλληλουχίας του DNA του ιού (Straub, 1990). Οι ιοί που έχουν απομονωθεί από ποικιλόθερμα ζώα, διατηρούν σταθερά τα δομικά χαρακτηριστικά των ερπητοϊών, ωστόσο το DNA τους φαίνεται να έχει μικρή, αν όχι καθόλου ομοιότητα, με το DNA ερπητοϊών που απομονώνονται από ομοιόθερμα ζώα.

Μόνο ένας συγκεκριμένος ορότυπος του BHV-1 έχει αναγνωριστεί αλλά έχουν περιγραφεί διάφοροι υπότυποι του, χρησιμοποιώντας μεθόδους διάκρισης του ιϊκού DNA με περιοριστικά ένζυμα. Οι εν λόγω τύποι αναφέρονται ως BHV-1.1 (υπότυπος που προσβάλλει το αναπνευστικό σύστημα) και BHV-1.2 (υπότυπος που προσβάλλει το αναπνευστικό και το γεννητικό σύστημα) (Nuotio *et al.*, 2007). Ο υπότυπος BHV-1.2 διακρίνεται σε BHV-1.2 α και BHV-1.2 β (Muylkens *et al.*, 2007). Έχει περιγραφεί και ο υπότυπος BHV-1.3, ο οποίος είναι νευροτρόπος και τελικά

καθιερώθηκε η ταξινόμησή του ως BHV-5 (Edwards *et al.*, 1990). Οι υπότυποι BHV-1.1 και BHV-1.2α, έχουν συσχετιστεί με σοβαρή νόσο ακόμη και με λοίμωξη του εμβρύου και αποβολή. Αντίθετα ο υπότυπος 1.2β, δεν έχει συσχετισθεί με αποβολές (Edwards *et al.*, 1990).

Παρόλο που τα περισσότερα στελέχη του BHV-1.1 έχουν απομονωθεί από περιστατικά αναπνευστικής νόσου ή αποβολών και τα περισσότερα στελέχη του BHV-1.2 από αλλοιώσεις των γεννητικών οργάνων, το μόνο αξιόπιστο διαχωριστικό κριτήριο είναι η ανάλυση του ιϊκού DNA με τη μέθοδο ταυτοποίησης με περιοριστικά ένζυμα (Muylkens *et al.*, 2007).

Πράγματι, μόσχοι, οι οποίοι μολύνθηκαν πειραματικά - ενδορρινικά με τον υπότυπο BHV-1.2, εμφάνισαν αναπνευστικά συμπτώματα και ήταν ικανοί να μεταδώσουν νόσο με αναπνευστικά συμπτώματα σε μόσχους - μάρτυρες. Ομοίως, αλλοιώσεις του γεννητικού συστήματος παρατηρήθηκαν σε μοσχίδες μετά από ενδοκολπικό ενοφθαλμισμό του υπότυπου BHV-1.1.

Ο ιός BHV-1 πολλαπλασιάζεται σε πολλά είδη συνεχών κυτταρικών σειρών προκαλώντας κυτταροπαθόγνο αποτέλεσμα, διευκολύνοντας έτσι τη διάγνωση καθώς και την έρευνα πάνω στην παθογένεια και την επιζωοοτιολογία του ιού, αλλά και στην τεχνολογία παρασκευής εμβολίων.

Πίνακας 1. Άλφα-ερπητοϊοί των μηρυκαστικών που σχετίζονται με τον BHV-1 (Thiry *et al.*, 2005).

Ιός	Φυσικός ξενιστής	Νόσος	Γεωγραφική κατανομή
BHV-1	Βοοειδή	IBR IBP	Ευρώπη, Ασία, Αμερική, Αυστραλία
BHV-5	Βοοειδή	Εγκεφαλίτιδα των βοοειδών	Ευρώπη, Αμερική, Αυστραλία
Ερπητοϊός-1 των βούβαλων	Νεροβούβαλοι	Υποκλινική μόλυνση του γεννητικού	Ευρώπη, Αυστραλία
Ερπητοϊός-1 των αιγών	Αίγες	Βαλανοποσθίτιδα Αποβολές Συστηματική μόλυνση νεογέννητων	Ευρώπη, Αμερική, Αυστραλία
Ερπητοϊός-1	Κόκκινα	Οφθαλμικό	Ευρώπη

των ελαφοειδών	ελάφια	σύνδρομο	
Ερπητοϊός-2 των ελαφοειδών	Τάρανδοι	Υποκλινική μόλυνση του γεννητικού	Ευρώπη
Ερπητοϊός-1 των άλκεων	Άλκη	Υποκλινική μόλυνση του γεννητικού	Βόρεια Αμερική

2.3.1 ΦΥΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΙΟΥ

Τα ιικά σωματίδια του ιού BHV-1 περιέχουν λιπίδια στο περίβλημά τους που τα καθιστούν ευαίσθητα σε πολλά απολυμαντικά και ιδιαίτερα σε διαλύτες, όπως ο διαιθυλαιθέρας και το χλωροφόρμιο. Ο BHV-1 επιζεί στο περιβάλλον για τριάντα ημέρες κατά τη διάρκεια του χειμώνα και μέσα στα κτίρια για 6 ως 13 ημέρες το χειμώνα και 5 ως 9 ημέρες την άνοιξη. Μπορεί να επιζήσει περισσότερο κάτω από πιο ευνοϊκές συνθήκες όπως για παράδειγμα στις τροφές. Ωστόσο, φαίνεται απίθανο ο ιός να έρχεται σε επαφή με τις τροφές με την εξαίρεση ίσως του χόρτου, της αποθηκευμένης χορτονομής και του άχυρου.

Αν κρίνεται απαραίτητο, όπως στην εκτροφή αξενικών ζώων (ζώων απαλλαγμένων από ειδικά παθογόνα, Species Pathogen Free, SPF) είναι δυνατό να εξυγιανθεί η τροφή, καθώς ο ιός αδρανοποιείται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 63 ° C μέσα σε δευτερόλεπτα. Ο ιός είναι πολύ σταθερός σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των -65° C αλλά είναι λιγότερο σταθερός στους -20°C όταν η αποθήκευσή του διαρκεί περισσότερο από έναν χρόνο. Αδρανοποιείται αργά στους + 4° C και στους +37° C μπορεί να επιζήσει για δέκα ημέρες (Straub, 1990).

Συνεπώς, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι ο ιός μπορεί να επιζήσει σε δοχεία συγκέντρωσης σπέρματος όπου μπορεί να μολύνει υγιές σπέρμα, όταν το μολυσμένο σπέρμα αποθηκεύεται στο ίδιο δοχείο με το μη μολυσμένο. Για την επιβίωση του ιού στον αέρα, η υγρασία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο. Από μελέτες των Elazhary και Derbyshire (1979), διαπιστώθηκε ότι η επιβίωση του ιού είναι άριστη σε σχετική υγρασία 90% και χαμηλή θερμοκρασία. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες η απαιτούμενη υγρασία είναι χαμηλότερη.

Ο ιός είναι σταθερός σε περιβάλλον με pH μεταξύ 6 και 9. Τέτοιες τιμές pH βρίσκονται στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα (pH κυρίως κάτω του 7) και στο γεννητικό σύστημα (στα αρσενικά ζώα pH πάνω από 8, ενώ στα θηλυκά η τιμή του pH ποικίλλει) (Straub, 1990).

2.3.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΙΟΥ.

Οι γνωστοί ερπητοϊοί έχουν τέσσερις κοινές βιολογικές ιδιότητες.

- Όλοι φέρουν ένα μεγάλο εύρος ενζύμων, τα οποία σχετίζονται με τη σύνθεση του DNA (DNA πολυμεράση, ελικάση) και την επεξεργασία των πρωτεϊνών (πρωτεϊνικές κινάσες) παρόλο που ο ακριβής αριθμός των ενζύμων μπορεί να ποικίλλει από είδος σε είδος.
- Η σύνθεση του DNA και η συνένωση του καψιδίου γίνεται μέσα στον πυρήνα. Τα καψίδια αποκτούν το περίβλημά τους (φάκελος) κατά τη δίοδό τους μέσω της πυρηνικής μεμβράνης. Ένα θέμα που προκαλεί διχογνωμία είναι η κατάληξη του βιρίου καθώς περνά από το κυτταρόπλασμα και αν υφίσταται μία μοναδική εσωτερική σύντηξη ή αν υφίσταται διαδοχικές διαδικασίες τοποθέτησής του μέσα και έξω από το φάκελο.
- Η παραγωγή μολυσματικού ιού συνοδεύεται πάντα από καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων.
- Οι ερπητοϊοί που έχουν εξεταστεί μέχρι σήμερα έχουν την ικανότητα να παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση στους φυσικούς ξενιστές τους. Στα κύτταρα που φιλοξενούν τον ιό κατά τη λανθάνουσα φάση του, το γονιδίωμά του παίρνει τη μορφή κλειστών κυκλικών μορίων και μόνο μία μικρή υποομάδα από γονίδια του ιού εκφράζονται. Το γονιδίωμα που παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση, διατηρεί την ικανότητα να αντιγράφεται και να προκαλεί τη νόσο κατά τη φάση της επανενεργοποίησης.

Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν από τη λανθάνουσα κατάσταση σε αυτήν της επανενεργοποίησης δεν είναι πλήρως κατανοητοί και διαφέρουν από ιό σε ιό. Η λανθάνουσα κατάσταση διαφέρει από τη χρόνια λοίμωξη στο ότι δεν υπάρχουν «απόγονοι» του λοιμογόνου ιού (Roizman *et al.*, 2001).

2.3.3 ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΙΟΥ

Έχει βρεθεί μία μονόδρομη ορολογική σχέση μεταξύ του ιού της IBR/IPV και του ιού της νόσου του Aujeszky (ψευδολύσσα). Αυτή η σχέση όμως δεν επαρκεί για την παροχή προστασίας με τη χρήση ετερόλογων εμβολίων. Με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού διαπιστώθηκε ότι η παρουσία αντισωμάτων έναντι του

BHV-1 σε ζώα τα οποία εμβολιάστηκαν με εμβόλιο κατά της νόσου του Aujeszky δεν επηρεάστηκε (Straub., 1990).

Επίσης, υπάρχει μονόδρομη ορολογική συσχέτιση μεταξύ του BHV-1 και του ερπητοϊού των αιγών (BHV-6) (Engels *et al.*, 1983).

2.4 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ BHV-1

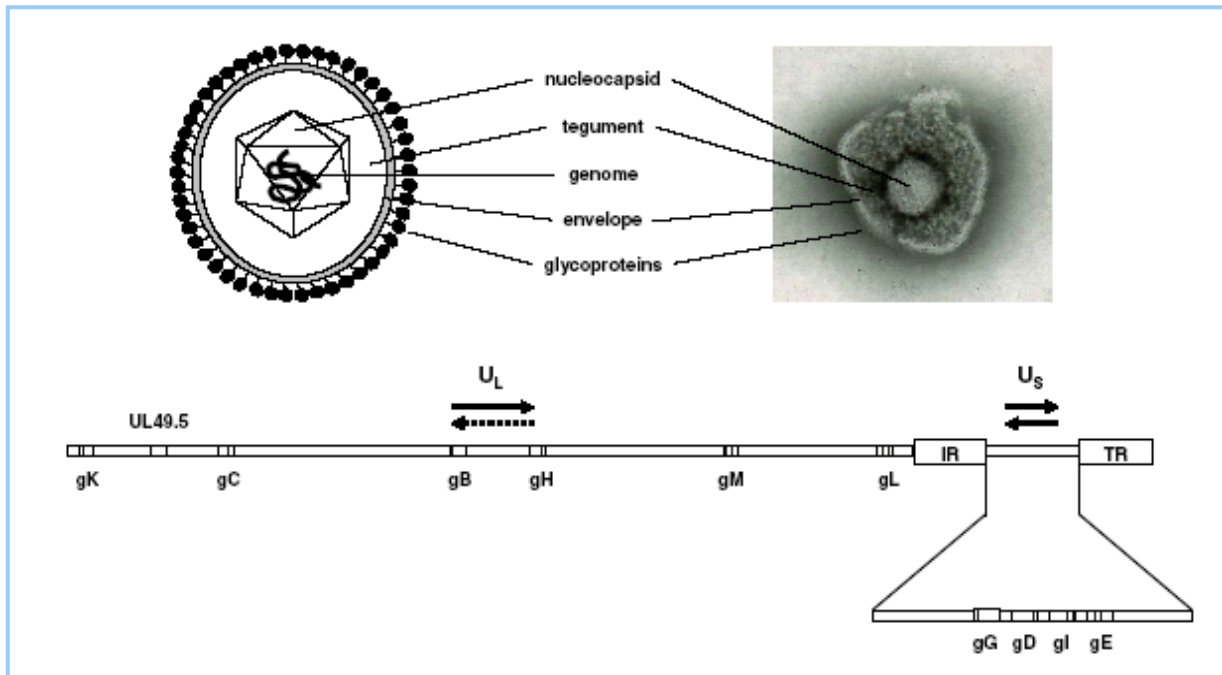
Το γονιδίωμα του ιού BHV-1 αποτελείται, όπως προαναφέρθηκε, από ένα ευθύγραμμο δίκλωνο μόριο DNA το συνολικό μέγεθος του οποίου είναι 135,3 χιλιοβάσεις (Kbp) και είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση 70 περίπου πρωτεϊνών. Από αυτές, οι 33 είναι γνωστό ότι αποτελούν δομικές πρωτεΐνες του ιού ενώ περίπου 15 είναι μη δομικές πρωτεΐνες (Muylkens *et al.*, 2007).

Κατατάσσεται στην τάξη γονιδιώματος D. Αυτό σημαίνει ότι αποτελείται από δύο μοναδικές αλληλουχίες. Μία μοναδική μακριά αλληλουχία (unique long, UL) και μία μοναδική βραχεία αλληλουχία (unique short, US) (βλ. εικόνα 2.4.1).

Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA, οι δύο περιοχές (UL και US) μπορεί να μεταπηδήσουν η μία στη θέση της άλλης περιοχής, σχηματίζοντας έτσι 4 ισομερείς μορφές γονιδιώματος DNA (Schyns *et al.*, 2003).

Η πλήρης αλληλούχηση του γενετικού υλικού του ιού ολοκληρώθηκε το 1995 στα πλαίσια μιας διεθνούς συνεργασίας. Έτσι, ένα σύνολο από 72 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs) έχει ταυτοποιηθεί πλήρως. Η πλειοψηφία των γονιδίων του BHV-1 αποτελείται από ORFs τα οποία είναι ομόλογα με γονίδια που βρίσκονται σε άλλους α-ερπητοϊούς. Ωστόσο το γονίδιο UL0.5 είναι ειδικό για τον BHV-1.

Το γονιδίωμα του BHV-1 περιλαμβάνει δέκα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τη σύνθεση των γλυκοπρωτεϊνών του. Ανάμεσα σε αυτά, τα 6 βρίσκονται στο UL τμήμα και κωδικοποιούν τη σύνθεση των γλυκοπρωτεϊνών gK (UL53), gC (UL44), gB (UL27), gH (UL22), gM (UL10) και gL (UL1). Τα υπόλοιπα 4 γονίδια βρίσκονται στο τμήμα US και ελέγχουν τη σύνθεση των γλυκοπρωτεϊνών gG (UL4), gD (UL6), gI (US7) και gE (US8) (Muylkens *et al.*, 2007).



Εικόνα 2.4.1 Μορφολογία και οργάνωση του γονιδιώματος του BHV-1. Το γονιδίωμα αποτελείται από ευθύγραμμο δίκλωνο μόριο DNA, το οποίο περιέχει μία μοναδική μακριά μονάδα (UL) και μία μοναδική βραχεία μονάδα (US) οι οποίες περικλείονται ανάμεσα σε δύο αντεστραμμένες επαναλαμβανόμενες ακολουθίες, την εσωτερική (Internal Repeat, IR) και την τελική επαναλαμβανόμενη (Terminal Repeat, TR). Το τμήμα US μπορεί να έχει δύο πιθανούς προσανατολισμούς (όπως απεικονίζεται από τα βέλη) ενώ το τμήμα UL έχει έναν κυρίαρχο προσανατολισμό (το διακεκομμένο βέλος δηλώνει ότι το 5% του γονιδιώματος μπορεί να φέρει την UL αλληλουχία και με τον αντεστραμμένο προσανατολισμό). (Muylkens *et al.*, 2007).

Όλα τα γονίδια του BHV-1 κατατάσσονται σε δύο κύριες κατηγορίες, με βάση την επίδραση της απόλειψης ενός μοναδικού γονιδίου και την ικανότητα του μεταλλαγμένου ιού να μπορεί να αναπτύσσεται σε κυτταροκαλλιέργειες.

Τα μη απαραίτητα γονίδια είναι εκείνα τα οποία επιτρέπουν την παραπέρα ανάπτυξη, τουλάχιστον *in vitro*, του αντίστοιχου μεταλλαγμένου ιού που φέρει την απόλειψη. Τα απαραίτητα γονίδια είναι αυτά, των οποίων η αφαίρεση οδηγεί σε ένα θανάσιμο μεταλλαγμένο BHV-1 ιό ο οποίος, όμως, δεν έχει ικανότητα αντιγραφής.

Η κατηγοριοποίηση μιας πρωτεΐνης του BHV-1 ως απαραίτητης ή μη, δεν είναι πάντα καθοριστική. Κάτω από ειδικές περιπτώσεις, η λειτουργία της γλυκοπρωτεΐνης D (gD) του BHV-1 στην είσοδο και στην απευθείας εξάπλωση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο, μπορεί να αντισταθμιστεί από μεταλλάξεις σε άλλες τικές πρωτεΐνες (Liang *et al.*, 1995; Schroder *et al.*, 1997; Schroder & Keil., 1999). Επιπλέον, η gD θεωρείται ως απαραίτητη στον BHV-1, ενώ δεν κωδικοποιείται στον έρπη-ζωστήρα ιό (Varicello Zoster virus, VZV) και δεν είναι απαραίτητη στον ιό της νόσου του

Marek. Αντίθετα, η γλυκοπρωτεΐνη E (gE) δεν είναι απαραίτητη στον ιό BHV-1, ενώ είναι απαραίτητη στον VZV (Muylkens *et al.*, 2006).

2.5 ΕΠΙΖΩΟΤΙΟΛΟΓΙΑ

Ο BHV-1 είναι ένα παθογόνο με παγκόσμια εξάπλωση το οποίο εμφανίζει αξιοσημείωτες διαφορές σχετικά με την παρουσία του ανά περιοχές, γεγονός που εξαρτάται από τις γεωγραφικές συνθήκες και τη διαχείριση της κάθε εκτροφής (Ackermann & Engels., 2006). Κατά καιρούς έχουν γίνει διάφορες έρευνες που αποσκοπούν στην εξακρίβωση των παραγόντων κινδύνου για την οροθετικότητα στον BHV-1. Κάποιοι απ' αυτούς όπως η ηλικία, το φύλο (τα αρσενικά εμφανίζονται πιο συχνά θετικά απ' ότι τα θηλυκά) και το μέγεθος της εκτροφής έχουν περιγραφεί εκτενέστερα (Boelaert *et al.*, 2005).

Η άμεση επαφή μεταξύ των ζώων, όπως κατά τις εμπορικές συναλλαγές και τη συμμετοχή τους σε εκθέσεις, είναι επίσης παράγοντες κινδύνου για την εισαγωγή του BHV-1 (Van Schaik *et al.*, 2002). Άλλοι παράγοντες, όπως η πυκνότητα των ζώων στην εκτροφή καθώς και η πυκνότητα των εκτροφών σε μία περιοχή, μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο μετάδοσης του BHV-1 (Vonk Noordegraaf *et al.*, 2004).

Όπως έχει αναφερθεί για άλλα νοσήματα στα ζώα και στον άνθρωπο, που οφείλονται σε ερπητοϊούς, ο κύκλος λανθάνουσας περιόδου-επανενεργοποίησης του ιού έχει μεγάλη επιζωοτιολογική σημασία, καθώς είναι υπεύθυνος για τη διατήρηση του BHV-1 σε ένα πληθυσμό βοοειδών. Η μόλυνση μίας νέας γενιάς βοοειδών από φορείς, με αφορμή ένα ερέθισμα που μπορεί να οδηγήσει στην επανενεργοποίηση του ιού, μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή και ιδιαίτερα κατά τη γέννηση, την οχεία, τη μεταφορά ή την εισαγωγή νέων μοσχίδων σε μία εκτροφή γαλακτοπαραγωγών αγελάδων. Συνεπώς, η ανίχνευση των ζώων-φορέων θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη κατά την κατάστρωση ενός προγράμματος ελέγχου της νόσου. Αυτό γίνεται συνήθως με την ανίχνευση των ειδικών κατά του BHV-1 αντισωμάτων.

Ωστόσο, η παθητική μητρική ανοσία μπορεί να παρέμβει στην ενεργό αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος που ακολουθεί μία μόλυνση. Έτσι, μετά από πειραματικό ενοφθαλμισμό λοιμογόνου BHV-1 σε μόσχους με μητρικά αντισώματα, προέκυψε μετά από 7 μήνες οροαρνητικός BHV-1 λανθάνων φορέας (Straub, 1990).

Καθίσταται λοιπόν αναγκαίο να βρεθούν άλλες μέθοδοι ανίχνευσης των ζώων με λανθάνουσα λοίμωξη. Η άμεση ταυτοποίηση του BHV-1 με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) από δείγματα αμυγδαλών, θα μπορούσε εναλλακτικά να αποτελέσει μια τέτοια μέθοδο (Winkler *et al.*, 2000).

2.5.1 Εύρος ξενιστών και γεωγραφική κατανομή

Παρόλο που ο BHV-1 έχει ευρεία κατανομή στα βοοειδή σε διάφορες ηπείρους, το εύρος των ξενιστών του είναι περιορισμένο.

Ωστόσο, ένα πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί κατά την εφαρμογή των προγραμμάτων εκρίζωσης της IBR προκύπτει από την ικανότητα του ιού BHV-1 να υπερπηδά το φραγμό του είδους. Δεδομένα υπό φυσικές και πειραματικές συνθήκες, έχουν δείξει ότι διάφορα μηρυκαστικά μπορεί να μολυνθούν από τον BHV-1. Δεν υπάρχει μέχρι σήμερα απόδειξη ότι τα άλλα μηρυκαστικά -πλην των βοοειδών- θα μπορούσαν να παίξουν εναλλακτικά το ρόλο της δεξαμενής του ιού στη φύση.

Σε φυσικές συνθήκες ο ιός έχει βρεθεί σε πρόβατα με οξεία αλλά και λανθάνουσα μόλυνση. Ωστόσο τα πρόβατα δεν μπορούν να παίξουν ρόλο στη μετάδοση του BHV-1 στα βοοειδή (Hage *et al.*, 1997).

Σε πειράματα που έγιναν το 1957 και επιβεβαιώθηκαν το 1985, βρέθηκε ότι οι αίγες είναι ευαίσθητες στον BHV-1. Η κλινική τους αντίδραση είναι ήπια αλλά μπορεί να συμβεί φυσική μετάδοση. Σ' αυτή την έρευνα στη Louisiana, σε 5 από 38 εκτροφές που εξετάστηκαν βρέθηκαν οροθετικές αίγες (συνολικά 6 από τα 502 ζώα) (Straub, 1990). Αντίθετα τα κόκκινα ελάφια δείχνουν μικρή ευπάθεια στον ιό (Thiry *et al.*, 2007).

Τα ποντίκια δεν είναι ευαίσθητα στη μόλυνση από τον BHV-1, αλλά έχουν βρεθεί να είναι ευπαθή στη νόσο στις Η.Π.Α όχι όμως και στην Ευρώπη (Porter *et al.*, 1975). Μεταγενέστερα, χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς τα κουνέλια ως πειραματικά μοντέλα (Rock and Reed, 1982). Τα κουνέλια μπορεί να μολυνθούν μέσω του επιπεφυκότα ή της ενδορινικής οδού.

Πειραματικά έχει βρεθεί ότι τα νεογέννητα κουνάβια (*Mephitis mephitis*) είναι επίσης ευπαθή. Το ίδιο ισχύει πιθανόν και για τα ινδικά χοιρίδια, όπως βρέθηκε σε προγενέστερα πειράματα (Straub, 1990).

2.5.2 Ξενιστές-δεξαμενές του ιού στη φύση-φορείς

Παρόλο που η IBR και η IPV είναι γνωστές στην Ευρώπη εδώ και έναν αιώνα, φαίνεται ότι τα άγρια μηρυκαστικά στην Αφρική και σε ζωολογικούς κήπους είναι η πραγματική δεξαμενή του ιού στη φύση (Straub, 1990). Πιθανώς, ο BHV-1 έχει συνυπάρξει στην Αφρική με τα άγρια μηρυκαστικά για τόσο μεγάλο χρονικό διάστημα, ώστε να έχει δημιουργηθεί μια πιο συμβιωτική σχέση μεταξύ τους. Πολλά στελέχη του ιού μπορούν να εγκατασταθούν στα ζώα μετά από τη μόλυνση. Μετά

από μία περίοδο αντίστασης του ξενιστή φτάνουν σε μία λανθάνουσα κατάσταση, από την οποία μπορεί να επανεμφανιστεί η νόσος έπειτα από φυσική ή τεχνητή καταπόνηση.

Ο BHV-1 έχει επίσης απομονωθεί από ένα μαλακό κρότωνα (*Ornithodoros coriaceus*). Το εύρημα αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς οι μολυσμένοι κρότωνα είχαν συλλεχθεί από περιοχές όπου διαβιούσαν ελάφια στη δυτική Αμερική σε παραπάνω από μία περιπτώσεις το 1979 και το 1981. Χρησιμοποιώντας μεθόδους με περιοριστικά ένζυμα αποδείχθηκε ότι τα έξι από τα εννέα στελέχη είναι πανομοιότυπα με τον BHV-1, ενώ τα άλλα τρία είχαν μικρές διαφορές. Τα βοοειδή και τα ελάφια (*Odocoileus lemionus*) συχνά βόσκουν μαζί σ' αυτή την περιοχή και βρέθηκαν και τα δύο είδη οροθετικά στον BHV-1. Σε αναφορά που έγινε από τον Taylor και τους συνεργάτες του το 1982, (Straub, 1990), μένουν μερικά ερωτήματα αναπάντητα, καθώς η ιαιμία -εφόσον συμβαίνει- είναι πολύ σύντομη κατά τη διάρκεια της κλινικής νόσου. Παρόλα αυτά, οι κρότωνα μπορεί να φιλοξενήσουν τον ιό για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Πίνακας 2.5.2.1 Ερπητοϊοί που απομονώθηκαν από φυσικώς μολυσμένα βοοειδή (Muylkens *et al.*, 2007).

ΕΙΔΟΣ ΙΟΥ ΒΟΟΕΙΔΗ ΩΣ	ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙ Α ΕΡΠΗΤΟΪΟΥ	ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΟ ΝΟΣΗΜΑ
A. ΦΥΣΙΚΟΙ ΞΕΝΙΣΤΕΣ		
Βόειος ερπητοϊός-1 (BHV-1)	α	Λοιμώδης ρινοτραχεΐτιδα των βοοειδών
Βόειος ερπητοϊός-2 (BHV-2)	α	Ερπητική θηλίτιδα των βοοειδών
Βόειος ερπητοϊός-4 (BHV-4)	γ	Δεν έχει προσδιοριστεί
Βόειος ερπητοϊός-5 (BHV-5)	α	Ερπητική εγκεφαλίτιδα των βοοειδών
Βόειος λεμφοτρόπος ερπητοϊός (BLHV)	γ	Δεν έχει προσδιοριστεί
B. ΜΗ ΦΥΣΙΚΟΙ ΞΕΝΙΣΤΕΣ		
Alcelaphine ερπητοϊός-1 (AIHV-1)	γ	Κακοήθης καταρροϊκός πυρετός
Ερπητοϊός-2 προβάτων (OHV-2)	γ	
Ερπητοϊός-1 χοίρων (SuHV-1)	α	Νόσος του Aujeszky

2.5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την εξάπλωση του BHV-1

Υπάρχει η άποψη ότι ο ιός της IPV βρήκε ευνοϊκό περιβάλλον για την εξάπλωσή του κατά τις διαδοχικές διόδους του -μέσω του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος βοοειδών που διαβιούσαν σε μονάδες εντατικής πάχυνσης (feedlots) όπου πρωτοεμφανίστηκε η νόσος IBR. Πέρασαν κάποια χρόνια μέχρι να εμφανιστεί η νόσος και σε μικρότερες εκτροφές βοοειδών. Μετά από ένα μεσοδιάστημα, εξάρσεις IBR σημειώθηκαν και στην Ευρώπη, κάποιες από τις οποίες οφείλονταν σε εισαγωγές ζώων από τη βόρεια Αμερική. Ο ιός μπορεί να μεταδοθεί με τους ακόλουθους τύπους φορέων:

- Ζώα, τα οποία έχουν μολυνθεί και δεν εμφανίζουν συμπτώματα αλλά απεκκρίνουν ακόμη τον ιό.
- Ζώα, στα οποία τα επίπεδα των αντισωμάτων έχουν σημειώσει αξιοσημείωτη πτώση. Μετά την επαναμόλυνση των βοοειδών, ο ιός πολλαπλασιάζεται στο βλεννογόνο του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος χωρίς φανερές κλινικές εκδηλώσεις -για κάποιο χρονικό διάστημα- ή εμφανίζοντας συμπτώματα, τα οποία αποδίδονται στη μεταφορά των ζώων ή σε κάποιον άλλο παράγοντα καταπόνησης.
- Ζώα, τα οποία έχουν λανθάνουσα λοίμωξη. Αυτά απεκκρίνουν τον ιό έπειτα από οποιαδήποτε καταπόνηση, χωρίς συνήθως να εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα.
- Ζώα, στα οποία η παθητική (μητρική) ανοσία έχει εξασθενήσει. Ο ιός επίσης εγκαθίσταται και πολλαπλασιάζεται στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα (μέχρι $10^{7,5}$ TCID -Tissue Culture Infective Dose- ανά ml ρινικής βλέννας) και αυτοί οι μόσχοι δεν εκδηλώνουν κανένα σύμπτωμα.

Τα βοοειδή όλων των ηλικιών είναι ευπαθή, ενώ τα νεογέννητα χωρίς μητρική ανοσία προσβάλλονται πιο σοβαρά από τα μεγαλύτερα ζώα.

Στους μόσχους η λοίμωξη είναι πολυσυστηματική αφορώντας σε περισσότερα του ενός όργανα, περιλαμβανομένου και του πεπτικού συστήματος. Αυτό το φαινόμενο πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι το ήνυστρο των νεαρών μόσχων προσομοιάζει στο στόμαχο των μονογαστρικών ζώων. Επιπλέον αν το pH του ήνυστρου δεν είναι αρκετά όξινο, κάτι που παρατηρείται σε μεγαλύτερης ηλικίας μόσχους, τότε ο ιός BHV-1 μπορεί να διέλθει από το στόμαχο ενώ αδρανοποιείται όταν το ήνυστρο λειτουργεί φυσιολογικά.

Η μετάδοση του ιού που προκαλεί τη φλυκταινώδη αιδοιοκολπίτιδα (IPV), γίνεται με μολυσμένο σπέρμα κατά τη φυσική οχεία, από τον ταύρο-ανιχνευτή, από τα άτομα της εκτροφής, ακόμη και από τον κτηνίατρο μερικές φορές..

Σχετικά με τη μετάδοση μέσω εμβρύων, από πειράματα προέκυψε ότι δεν υπάρχει κίνδυνος, καθώς ο ιός δεν μπορούσε να διαπεράσει τη διαφανή ζώνη βλαστοκύστης εμβρύου στο στάδιο των 16 κυττάρων, παρόλο που μπορούσε να προσκολληθεί σ' αυτή τη δομή. Επιπλέον, δεν βρέθηκε κανένα στοιχείο τέτοιας μετάδοσης όταν εξετάστηκαν για τον ιό BHV-1 τριανταένα έμβρυα από οροθετικές αγελάδες-δότριες (Singh *et al.*, 1982).

Δεν υπάρχει γενετική προδιάθεση στον φυσικό ξενιστή του ιού, δηλαδή στα βοοειδή. Δεν είναι ακόμη γνωστό γιατί μερικά στελέχη του ιού προκαλούν αποβολές και άλλα όχι. Επίσης, είναι άγνωστο γιατί μερικά στελέχη μπορούν να φτάσουν μέσω νευρικών ινών στο κεντρικό νευρικό σύστημα προκαλώντας εγκεφαλίτιδα και μηνιγγίτιδα. Η νευρική μορφή της νόσου παρατηρείται κυρίως στα νεαρά ζώα.

2.6 ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Καθώς οι ερπητοϊοί παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε νοσήματα του ανθρώπου, ο κίνδυνος μόλυνσης του ανθρώπου από τον BHV-1 απασχόλησε έντονα τους ερευνητές. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκαν τρεις ομάδες ατόμων για την παρουσία αντισωμάτων έναντι στον BHV-1. Η πρώτη ομάδα απαρτιζόταν από άτομα που έρχονταν σε στενή επαφή - για πολλά χρόνια - με ζώα πειραματικώς μολυσμένα. Η δεύτερη ομάδα από κτηνιάτρους που είχαν χρησιμοποιήσει επανειλημμένα εξασθενημένα εμβόλια και έναν επαγωγέα ιντερφερόνης που προερχόταν από ένα στέλεχος IPV. Η τρίτη ομάδα αποτελούνταν από άτομα και των δύο φύλων, τα οποία είχαν περάσει ασθένεια παρόμοια με την IPV και την IBP και τα οποία είχαν επαφή με ένα κέντρο τεχνητής σπερματέγχυσης όπου είχε εκδηλωθεί κρούσμα IBP.

Σε καμία περίπτωση δε βρέθηκε θετικό αποτέλεσμα. Συνεπώς δεν υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης του ανθρώπου από τον ιό BHV-1 (Straub, 1990).

2.7 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

2.7.1 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ BHV-1 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η μόλυνση των ευαίσθητων κυττάρων από τον BHV-1 είναι μία διαδικασία που αποτελείται από τρία στάδια:

Η πρώτη αλληλεπίδραση αφορά στην χαμηλής συνάφειας προσκόλληση του ιού μέσω των gB και /ή της gD σε δομές της επιφάνειας των κυττάρων όπως τμήματα

από θειούχες ενώσεις ηπαρίνης και βλεννοπολυσακχαριτών (Li *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 1991, 1995, 1997; Okazaki *et al.*, 1994).

Το στάδιο αυτό ακολουθείται από τη σταθερή σύνδεση της γλυκοπρωτεΐνης gD σε ειδικούς κυτταρικούς υποδοχείς. Ένα μεγάλο εύρος από υποδοχείς έχουν ταυτοποιηθεί ως πιθανοί στόχοι της gD σε διάφορους άλφα-ερπητοϊούς (Campadelli-Fiume *et al.*, 2000). Παρόλο που αυτό το μεγάλο εύρος των υποδοχέων περιλαμβάνει τουλάχιστον τέσσερις ομάδες μορίων, μόνο η νεκτίνη-1-μέλος της υπερομάδας των ανοσοσφαιρινών-παρουσιάστηκε ως υποδοχέας εισόδου του ιού BHV-1 (Geraghty *et al.*, 1998).

Μετά από αυτή την σύνδεση υψηλής συνάφειας μεταξύ της gD και των κυτταρικών υποδοχέων, η ακόλουθη διείσδυση του ιού επιτυγχάνεται με τη συγχώνευση του φακέλου του ιού με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αυτή η κρίσιμη διαδικασία περιλαμβάνει την εμπλοκή τουλάχιστον τεσσάρων γλυκοπρωτεϊνών του BHV-1, της gD (Liang *et al.*, 1995) της gB (Gerdtts *et al.*, 2000) και των ετεροδιμερών που σχηματίζονται από τις gH και gL (Meyer *et al.*, 1998).

Μετά την είσοδό τους στο κυτταρόπλασμα, τα ιϊκά σωματίδια πρέπει να μεταφερθούν με τη βοήθεια του κινητικού συστήματος της δυνεΐνης που σχετίζεται με μικροσωληνίσκους, προς τους πυρηνικούς πόρους όπου θα επιτραπεί η απελευθέρωση του ιϊκού DNA. Αυτή η κεντρομόλος μεταφορά σε συνδυασμό με τους μικροσωληνίσκους, αποδείχτηκε στον ιό HSV-1 αλλά είναι πολύ πιθανό να έχει διατηρηθεί και στους άλφα-ερπητοϊούς (Dohner *et al.*, 2002).

Η ιϊκή ή οι ιϊκές πρωτεΐνες που μεσολαβούν στη μεταφορά αυτή είναι ακόμη άγνωστες αλλά πιθανότατα είναι πρωτεΐνες του περιβλήματος ή συστατικά επιφανείας του ίδιου του καψιδίου (Antinone *et al.*, 2006). Καθώς τα ιϊκά σωματίδια μεταφέρονται στον πυρήνα, οι πρωτεΐνες του περιβλήματος διαχέονται στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου όπου μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πρώιμες φάσεις λοίμωξης καθώς είναι οι πρώτες που έρχονται σε επαφή και αλληλεπιδρούν με το ενδοκυττάριο περιβάλλον. Η VP8, είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη του περιβλήματος του BHV-1 (Carpenter & Misra., 1991). Εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου αμέσως μετά τη μόλυνση, χάρη σε ένα σήμα ανίχνευσης του πυρήνα. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος της πρωτεΐνης VP8 στη λοίμωξη από τον ιό BHV-1 παραμένει ακόμη ασαφής.

Η πρωτεΐνη του περιβλήματος που κωδικοποιείται από το γονίδιο UL41, είναι γνωστή ως η πρωτεΐνη απομόνωσης του ξενιστή του ιού BHV-1 (vhs, virion host shut off). Υπάρχει και σε άλλους άλφα-ερπητοϊούς και προκαλεί μια ραγδαία παύση της πρωτεϊνοσύνθεσης στα κύτταρα του ξενιστή που έχουν μολυνθεί από τον BHV-1 (Hinkley *et al.*, 2000).

Μία άλλη σημαντική πρωτεΐνη του περιβλήματος είναι η VP16 (πρωτεΐνη του βιρίου 16) που είναι ακόμη γνωστή ως BoHV-1 α-TIF. Είναι υπεύθυνη για την

έναρξη έκφρασης των γονιδίων του BHV-1, ενεργοποιώντας τα γονίδια του BHV-1 που σχετίζονται με την πολύ πρόωμη και άμεση φάση της μόλυνσης από τον ιό (immediate early genes -IE genes, alpha genes) τα λεγόμενα άλφα γονίδια του ιού.

Η έκφραση των γονιδίων του BHV-1 ρυθμίζεται παροδικά κατά τη φάση της μόλυνσης. Η ακολουθία της έκφρασης των γονιδίων του ιού περιλαμβάνει την έκφραση τριών γονιδίων και τον αντίστοιχο σχηματισμό του RNA που σχετίζεται με την πολύ πρόωμη (IE, immediate early), την πρόωμη (E, early) και την καθυστερημένη (L, late) φάση της μόλυνσης από τον ιό (Wirth *et al.*, 1989).

Έτσι, συνθέτονται πρωτεΐνες που συμμετέχουν κυρίως στη ρύθμιση του κύκλου του ιού, στην αντιγραφή του ιϊκού DNA και στο σχηματισμό των νέων βιρίων. Ταυτόχρονα με την έναρξη της έκφρασης των γονιδίων, το γονιδίωμα του BHV-1, πιστεύεται ότι παίρνει κυκλική διάταξη κατά την είσοδό του στον πυρήνα του κυττάρου (Fraefel *et al.*, 1993). Η υπόθεση αυτή βασίστηκε σε πληθώρα παρατηρήσεων σύμφωνα με τις οποίες παρατηρήθηκαν γονιδιώματα ιού με ενωμένα τα τελικά τους τμήματα σε κύτταρα μολυσμένα με διαφόρους άλφα-ερπητοϊούς, όπως για παράδειγμα σε κύτταρα μολυσμένα από τον HSV-1 (Garber *et al.*, 1993), τον VZV και τον ιό της νόσου του Aujeszky (Jones & Chowdhury., 2008).

Οι τρεις κύριες πρωτεΐνες του BHV-1 που σχετίζονται με την IE φάση της μόλυνσης είναι οι BICP0 (Bovine Infected Cell Protein 0, BICP0), η BICP4 και η BICP22, οι οποίες ενεργοποιούν την έκφραση των γονιδίων του BHV-1 και ακολουθεί η αντιγραφή του ιϊκού DNA.

2.7.2 ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ ΚΑΙ ΤΡΟΠΙΣΜΟΣ

Η φυσική πύλη εισόδου του BHV-1 στον οργανισμό είναι μέσω των βλεννογόνων του ανώτερου αναπνευστικού ή του γεννητικού συστήματος. Άλλος τρόπος μόλυνσης είναι με ενοφθαλμισμό του ιού μέσω του επιθηλίου του οφθαλμικού επιπεφυκότα. Η άμεση επαφή των ρινικών κοιλοτήτων των ζώων και η ανταλλαγή των ρινικών εκκρίσεων αποτελεί τον πιο συνηθισμένο τρόπο μετάδοσης της λοιμώδους ρινοτραχειΐτιδας των βοοειδών. Ωστόσο, μπορεί να συμβεί και αερογενής μετάδοση σε κοντινές αποστάσεις (Mars *et al.*, 2000).

Η μετάδοση στο γεννητικό σύστημα απαιτεί την άμεση επαφή των ζώων κατά την οχεία. Επιπλέον, μπορεί να συμβεί μετάδοση και μέσω μολυσμένου σπέρματος (Kupferschmied *et al.*, 1986). Η κρυοδιατήρηση της λοιμογόνου ικανότητας του ιού έχει καταστήσει αναγκαίο οι ταύροι που προορίζονται για τεχνητή σπερματέγχυση να είναι απαλλαγμένοι από τον BHV-1 (δηλαδή αποδεδειγμένα ορολογικά αρνητικοί).

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει μοριακή απόδειξη για τον τροπισμό του BHV-1 στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού ή του γεννητικού συστήματος.

Παρόλο που η γλυκοπρωτεΐνη gC θεωρείται ότι είναι η πρώτη που έρχεται σε επαφή με τα κύτταρα του ξενιστή (Li *et al.*, 1995; Liang. *et al.*, 1991; 1995; 1997; Okazaki *et al.*, 1994) και παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του ιού στο δέρμα καθώς και στην λοιμογόνο δύναμη των άλφα-ερπητοϊών των ανθρώπων, ωστόσο ο ρόλος της στην παθογένεια του BHV-1 δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και πιθανότατα δεν είναι απαραίτητη για τη λοιμογόνο ικανότητα του ιού. Αυτό φαίνεται και από το γεγονός ότι τα μεταλλαγμένα προϊόντα του BHV-1 που προκύπτουν από την αφαίρεση της gC, διατηρούν την λοιμογόνο ικανότητά τους σε φυσικούς ξενιστές (Kaashoek *et al.*, 1998).

Ωστόσο η gC μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση των διαφορών που παρατηρούνται στον τροπισμό των διαφόρων υποειδών του BHV-1. Πράγματι, οι διαφορές που έχουν παρατηρηθεί στην gC των HSV-1 και HSV-2 επηρεάζουν την ικανότητα σύνδεσης των δύο ιών με τα κύτταρα των ξενιστών τους και μπορούν να συμβάλουν στη διαφοροποίηση των ορότυπων και στον τροπισμό τους, στους ανθρώπους.

Ομοίως, μπορεί να αναφερθεί ότι οι διαφορές που παρατηρούνται στη gC των BHV-1.1 και BHV-1.2 (Rijsewijk *et al.*, 1999; Spilki *et al.*, 2005) μπορεί να συμβάλουν στις αλλαγές του τροπισμού μεταξύ των στελεχών του ιού που προκάλεσαν την παρέκκλιση από IPV σε IBR. Είναι σημαντικό να διευκρινιστεί ότι αυτές οι διαφορές δεν είναι καθοριστικές, καθώς ο πειραματικός ενοφθαλμισμός των στελεχών IPV ήταν ικανός να προκαλέσει πολλαπλασιασμό του ιού στο αναπνευστικό επιθήλιο όπως έχει προαναφερθεί. Ομοίως, στελέχη IBR ήταν ικανά να πολλαπλασιαστούν στο γεννητικό επιθήλιο.

2.7.3 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΣΤΟ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟ ΤΗΣ ΠΥΛΗΣ ΕΙΣΟΔΟΥ

Κατά τη διείσδυση του BHV-1 στα κύτταρα «στόχος» του ξενιστή αρχίζει ο λυτικός κύκλος αντιγραφής του ιού, κατά τον οποίο παρατηρείται διαδοχική έκφραση των ιικών γονιδίων που καταλήγει τόσο στην παραγωγή απογόνων ιικών σωματιδίων όσο και στον κυτταρικό θάνατο.

Η κυτταροπαθογόνος δράση του BHV-1 χαρακτηρίζεται από εξοίδηση των κυττάρων και από σχηματισμό ενδοκυτταρικών εγκλείστων. Ο κυτταρικός θάνατος οφείλεται τόσο στη νέκρωση όσο και στην απόπτωση των κυττάρων, διαδικασίες που παρατηρούνται κατά τον κύκλο αντιγραφής του BHV-1. Μία από τις πρώτες ενδείξεις της νέκρωσης που οφείλεται στον ιό BHV-1, είναι η παύση της σύνθεσης πρωτεϊνών

στα μολυσμένα κύτταρα, η οποία μερικώς οφείλεται στην vhs πρωτεΐνη του περιβλήματος του ιού (Hinkley *et al.*, 2000; Koppers-Lalic *et al.*, 2001).

Η πρωτεΐνη αυτή που κωδικοποιείται από το γονίδιο UL41 θεωρείται ότι προκαλεί εκφύλιση του αγγελιοφόρου RNA (m RNA) που ήδη υπάρχει μέσα στα κύτταρα-«στόχος» γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με αυτό που παρατηρείται και με την αντίστοιχη πρωτεΐνη του ιού HSV του ανθρώπου.

Έχουν γίνει πολλές έρευνες για τη μελέτη της ρύθμισης της απόπτωσης των κυττάρων κατά την παραγωγική φάση της μόλυνσης από τον BHV-1. Σε μία πρώτη ομάδα πειραμάτων, η επίδραση της μόλυνσης από τον BHV-1, εκτιμήθηκε στα μονοπύρηννα κύτταρα φρέσκου περιφερικού αίματος (fresh peripheral blood mononuclear cells-PBMC). Τόσο ο ζωντανός όσο και ο αδρανοποιημένος ιός έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν απόπτωση σε αυτά τα κύτταρα, συνεπώς υπάρχει ένα δομικό συστατικό του BHV-1, το οποίο έχει την ικανότητα να προκαλεί απόπτωση στα PBMC κύτταρα (Hanon *et al.*, 1998). Επιπλέον, μόνο η προσκόλληση του ιού ήταν ικανή να προκαλέσει προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Hanon *et al.*, 1998). Η γλυκοπρωτεΐνη gD θεωρείται ότι εμπλέκεται στην κυτταρική απόπτωση που προκαλείται από τον BHV-1 (Hanon *et al.*, 1999).

Ωστόσο, επειδή τα PBMC κύτταρα δεν είναι τα κύτταρα - στόχος του BHV-1, η απόπτωση αυτών δε συνεπάγεται απαραίτητα το ίδιο και για τα επιθηλιακά κύτταρα. Αντίθετα, μία ραγδαία απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων θα προκαλούσε μείωση της δυνατότητας αντιγραφής του ιού στο σημείο εισόδου και συνεπώς θα προλάμβανε την εξάπλωση του ιού.

Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη caspase-3, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην κυτταρική απόπτωση ενισχύοντάς την, ενεργοποιείται καθυστερημένα κατά την μόλυνση από τον BHV-1, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται και στην πρωτεΐνη BICP0, μέσω ενός έμμεσου μηχανισμού που ενεργοποιεί την κυτταρική διάσπαση της caspase 3 (Henderson *et al.*, 2004).

Ο BHV-1 αφού προκαλέσει το κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμά του μπορεί επίσης να επιβραδύνει την αποκατάσταση του αναπνευστικού επιθηλίου με την παρεμπόδιση της μετανάστευσης νέων επιθηλιακών κυττάρων στις αλλοιωμένες περιοχές. Σε σχετικά πειράματα η μόλυνση από τον BHV-1, είχε σημαντικό αντίκτυπο στην αλληλεπίδραση των κυττάρων του βρογχικού επιθηλίου με την εξωκυττάρια ουσία μειώνοντας έτσι την κυτταρική μετανάστευση.

2.7.4 ΔΙΑΔΟΣΗ ΚΑΙ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΜΕΣΑ ΣΤΟΝ ΞΕΝΙΣΤΗ

Η μόλυνση από τον BHV-1, προκαλεί στο σημείο εισόδου μαζική παραγωγή ιικών σωματιδίων τα οποία στη συνέχεια εξαπλώνονται στο ρινικό βλεννογόνο και

απεκκρίνονται στο ρινικό έκκριμα σε υψηλούς τίτλους, με αποτέλεσμα την ταχεία διασπορά του ιού -άρα και της μόλυνσης- μέσα στην εκτροφή.

Τα νέα σωματίδια του ιού διασπείρονται επίσης στο μολυσμένο ζώο με τοπική εξάπλωση, καθώς και συστηματικά μέσω της παρατηρούμενης αιμίας και τελικά με τη διείσδυση του ιού στο νευρικό σύστημα.

2.7.4.1 Τοπική διασπορά

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι εξάπλωσης των νέων ιικών σωματιδίων του BHV-1 στον προσβεβλημένο βλεννογόνο.

Σύμφωνα με τον πρώτο τρόπο, τα σωματίδια του ιού που απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο υγρό είναι πλήρως καλυμμένα από το περίβλημα του ιού και ικανά – έτσι -να συνδεθούν με τους υποδοχείς των ευαίσθητων κυττάρων. Κατά τον δεύτερο τρόπο, τα ιικά σωματίδια μπορούν να εξαπλωθούν άμεσα από το ένα μολυσμένο κύτταρο στα γειτονικά μη μολυσμένα (μετάδοση από κύτταρο σε κύτταρο). Αυτός ο τρόπος διάδοσης είναι πιο πλεονεκτικός καθώς μπορεί να συμβεί παρά την παρουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων στο εξωκυττάριο υγρό. Οι γλυκοπρωτεΐνες gB, gD και η gH και gL, είναι απαραίτητες για την άμεση διάδοση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο ενώ η gG και τα ετεροδιμερή που σχηματίζονται από τις gI και gE προάγουν αυτόν τον τρόπο εξάπλωσης στον HSV-1.

2.7.4.2 Συστηματική εξάπλωση.

Ένας άλλος τρόπος εξάπλωσης του BHV-1, είναι μέσω της αιμίας που αυτός προκαλεί. Μ' αυτόν τον τρόπο ο ιός μπορεί να φτάσει σε περισσότερους ιστούς και όργανα προκαλώντας έτσι και άλλες κλινικές εκδηλώσεις όπως αποβολή σε έγκυες αγελάδες και θανάσιμη πολυσυστηματική λοίμωξη σε πολύ μικρής ηλικίας οροαρνητικούς μόσχους (Bryan *et al.*, 1994; Mechor *et al.*, 1987).

Υπάρχουν λίγα δεδομένα σχετικά με τον μηχανισμό της συστηματικής εξάπλωσης του BHV-1. Βρέθηκε ότι μετά από τον ενδορινικό ενοφθαλμισμό ενός πολύ λοιμογόνου στελέχους, ο ιός μπορούσε να απομονωθεί για αρκετές ημέρες αργότερα από τον ορό μολυσμένων μόσχων υποδεικνύοντας έτσι μία πιθανή αιμία ανεξάρτητη από κύτταρα. Παρόλο που η αιμία που σχετίζεται με κύτταρα έχει περιγραφεί ενδελεχώς στον ερπητοϊό -1 των ιπποειδών, το ίδιο δεν έχει αποδειχθεί για τον BHV-1.

Σε πειράματα βρέθηκε ότι τα περιφερικά λευκοκύτταρα του αίματος είναι ικανά να υποστηρίξουν μία μόλυνση από BHV-1 καθώς και μία περιορισμένη αντιγραφή του ιού (Hanon *et al.*, 1998). Υπάρχει, όμως, διάσταση απόψεων σχετικά με την απομόνωση λοιμογόνου BHV-1 από επίχρισμα στιβάδας λευκοκυττάρων (buffy coat)

βοοειδών μετά από αναπνευστική μόλυνση. Ωστόσο, τα θετικά αποτελέσματα της απομόνωσης του ιού από τα επιχρίσματα στιβάδας λευκοκυττάρων θα πρέπει να ερμηνεύονται με μεγάλη προσοχή καθώς απαιτούνται ακόμη πολλά στοιχεία που να ξεκαθαρίσουν το χρονικό «παράθυρο» κατά το οποίο ο BHV-1 μπορεί να ανιχνευτεί στα περιφερικά λευκοκύτταρα και να προσδιοριστεί η ομάδα εκείνη των λευκοκυττάρων που αποτελούν τα κύτταρα που χρησιμοποιεί ο ιός για τη συστηματική του εξάπλωση.

2.7.4.3 Προσβολή του νευρικού συστήματος.

Κατά την αντιγραφή του πρωτογενούς ιού στους βλεννογόνους, ο BHV-1 μπορεί να μολύνει και νευρώνες μέσω των νευρικών απολήξεων αυτών στους βλεννογόνους και να κατευθυνθεί έτσι προς το Κ.Ν.Σ. Η περιοχή του βλεννογόνου της στοματικής κοιλότητας, του φάρυγγα και της ρινικής κοιλότητας, νευρώνεται από 6 κύρια εγκεφαλικά νεύρα από τα οποία το οσφρητικό και το τρίδυμο νεύρο παρέχουν νευρικές ίνες για το ρινικό βλεννογόνο (Gerdtz *et al.*, 2000).

Αυτές οι δύο οδοί (οσφρητικό και τρίδυμο νεύρο) αντιπροσωπεύουν τους κύριους τρόπους με τους οποίους γίνεται η διείσδυση στο Κ.Ν.Σ από τους δύο νευροτρόπους άλφα-ερπητοϊούς που σχετίζονται με τον BHV-1 οι οποίοι είναι ο BHV-5 και ο ιός της ψευδολύσσας. Αντίθετα, ο BHV-1 χρησιμοποιεί κατά προτίμηση μόνο την οδό του τριδύμου νεύρου. Επιπλέον ο BHV-1, δεν εισδύει πέραν των νευρώνων του τριδύμου γαγγλίου όπου και εγκαθίσταται η λανθάνουσα μόλυνση. Ωστόσο, ο BHV-1 έχει απομονωθεί σποραδικά από βοοειδή με διαταραχές του Κ.Ν.Σ και πιθανότατα σε απομονώσεις τέτοιου είδους να οφείλονται περιστατικά οξείας μηνιγγοεγκεφαλίτιδας σε ενήλικα βοοειδή. Πιθανώς όμως τα περιστατικά αυτά οφείλονται περισσότερο σε ατομική ευπάθεια του ζώου απέναντι σε λοιμώξεις του Κ.Ν.Σ παρά σε διαφοροποίηση των στελεχών του BHV-1 με αυξημένη ικανότητα διείσδυσης και λοιμογόνου δύναμης στο Κ.Ν.Σ.

Πράγματι, με τη χρήση μεθόδων απομόνωσης του DNA από εγκεφάλους βοοειδών, φάνηκε ότι το γενετικό υλικό που απομονώθηκε είχε μεγάλες διαφορές μεταξύ αυτού του BHV-1 και του νευροπαθογόνου BHV-5 (Meyer *et al.*, 2001). Παράγοντες που σχετίζονται με τον ξενιστή μπορεί να ευθύνονται για την αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις του Κ.Ν.Σ από τον BHV-1, όπως φάνηκε από περιστατικά σποραδικών εγκεφαλίτιδων από τον HSV-1 σε ανθρώπους.

2.8 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ - ΑΠΑΝΤΗΣΗ

Η ανοσοποιητική απάντηση έναντι στη Λ.Ρ.Β περιλαμβάνει πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις χυμικής και κυτταρικής ανοσίας που ενεργοποιούνται μετά από τη

φυσική μόλυνση με τον BHV-1 ή τον εμβολιασμό. Η τοπική ανάπτυξη στοιχείων της κυτταρικής ανοσίας παίζει πολύ κρίσιμο ρόλο στην αντίσταση αλλά και στην ίαση από την πρώιμη λοίμωξη.

Μετά την πρωτογενή μόλυνση από τον BHV-1, η πρώτη αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος περιλαμβάνει μη ειδικούς αλλά και ειδικούς μηχανισμούς άμυνας. Κάποιοι από τους μηχανισμούς της μη ειδικής ανοσίας είναι πρωταρχικοί, όπως η ενεργοποίηση του συμπληρώματος, ενώ άλλοι όπως οι ιντερφερόνες ενεργοποιούνται από τον πολλαπλασιασμό του ιού.

Η πρώιμη παραγωγή κυτταροκινών οδηγεί στην ενεργοποίηση διαφόρων κυττάρων όπως των μακροφάγων, των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων και των μεγάλων κοκκωδών λεμφοκυττάρων (τα οποία λειτουργούν ως φυσικά φονικά κύτταρα, NK natural killer cells) στα βοοειδή. Αυτά τα κύτταρα εκκρίνοντας κυτταροκίνες στις περιοχές του επιθηλίου που έχουν προσβληθεί, προκαλούν το θάνατο των μολυσμένων από τον ιό κυττάρων (Muyllkens *et al.*, 2007). Οι μηχανισμοί της μη ειδικής ανοσίας είναι επίσης απαραίτητοι για την έναρξη και τη ρύθμιση της ειδικής κυτταρικής ανοσοποιητικής απάντησης απέναντι στον BHV-1.

Η ειδική κυτταρική ανοσία ανιχνεύεται από την 5η ημέρα μετά τη μόλυνση και φτάνει στο μέγιστο την 7^η με 10^η ημέρα. Γενικά συμπίπτει με την ανάρρωση από τις κλινικές εκδηλώσεις. Τα ειδικά T-λεμφοκύτταρα μεσολαβούν στη λύση των μολυσμένων κυττάρων με το να ενεργοποιούν τα μακροφάγα και τα φυσικά φονικά κύτταρα μέσω της έκκρισης της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) και της ιντερλευκίνης 2 (IL-2). Επιπλέον, προωθούν τον πολλαπλασιασμό των ειδικών κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων.

Η ειδική χυμική ανοσία γίνεται ανιχνεύσιμη από την 7η ημέρα μετά τη μόλυνση. Η παρουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων στον ορό του αίματος δεν είναι ακριβής δείκτης της αντίστασης στη λοίμωξη και στη νόσο. Μπορεί να υποδηλώνει παλιότερη μόλυνση ή εμβολιασμό, ενώ σε μόσχους ηλικίας μικρότερης των 6 μηνών μπορεί να οφείλεται στη λήψη πρωτογάλακτος κατά την πρώτη ημέρα της ζωής τους (παθητική ανοσία).

Τα αντισώματα, παρόλο που παίζουν λιγότερο σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση της πρωτογενούς μόλυνσης, πιθανά ασκούν επικουρικό ρόλο αφενός εξουδετερώνοντας τα ιικά σωματίδια που βρίσκονται εκτός κυττάρων, εμποδίζοντας έτσι την εξωκυτταρική εξάπλωση του ιού, αφετέρου δε συμμετέχοντας στην εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταροτοξικότητα (antibody dependent cell cytotoxicity, ADCC). Εξάλλου, ο ρόλος της χυμικής ανοσίας είναι πολύ σημαντικός στην πρόληψη δευτερογενών λοιμώξεων και στον περιορισμό των επιπτώσεων από την επανενεργοποίηση του ιού. Σε αυτήν ακριβώς τη διαπίστωση βασίζεται η εφαρμογή των εμβολιασμών ως μέτρο πρόληψης και αντιμετώπισης κατά του BHV-1.

Επιπλέον η παθητική ανοσία που παρέχεται μέσω των αντισωμάτων του πρωτογάλακτος, από αγελάδες ανοσοποιημένες έναντι του BHV-1, προσφέρει

ικανοποιητική προστασία στα νεογέννητα απέναντι στη θανάσιμη, πολυσυστηματική μορφή της IBR (Mechor *et al.*, 1987).

2.8.1 Χυμική ανοσία

Η ανάπτυξη των διαφόρων κλάσεων ανοσοσφαιρινών μελετήθηκε λεπτομερώς από τους Matthaeus και Straub το 1978 (Straub, 1990). Κατά τα πειράματα αυτών των ερευνητών, σε 4 από τα 5 ζώα που εξετάστηκαν, οι μέγιστοι τίτλοι των IgA αντισωμάτων παρατηρήθηκαν 2 εβδομάδες μετά τη μόλυνση. Τα επίπεδα των IgM ανοσοσφαιρινών φτάνουν στο μέγιστο επίπεδό τους την ίδια χρονική περίοδο, οι ανοσοσφαιρίνες της κλάσης IgG έφτασαν στο μέγιστο κατά τη 2^η εβδομάδα μετά τη μόλυνση σε δύο ζώα, ενώ σε άλλα 3 ζώα αυτό παρατηρήθηκε μετά την τέταρτη εβδομάδα από τη μόλυνση.

Δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου των ανοσοσφαιρινών, της έκκρισης του ιού και της έντασης των κλινικών συμπτωμάτων όπως επιβεβαιώθηκε από τον Rüschi και τους συνεργάτες του το 1981 (Straub, 1990). Τα αντισώματα διατηρούνται για χρόνια, αλλά υπάρχει διαφορά σε σχέση με την εστία της μόλυνσης. Οι υψηλότεροι τίτλοι είναι συνήθως αποτέλεσμα αναπνευστικής λοίμωξης, ενώ χαμηλότεροι τίτλοι παρατηρούνται μετά από μόλυνση του γεννητικού συστήματος.

Καθώς οι τίτλοι των αντισωμάτων μειώνονται, εγκαθίσταται λανθάνουσα λοίμωξη και ο ιός διασπείρεται με ενδεχόμενο να μολύνει τα γειτονικά ζώα, όπως π.χ. μέσω της ουράς. Έχει βρεθεί και μία άλλη συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου των αντισωμάτων και της διάρκειας της απέκκρισης του ιού, αν η πρόκληση γίνει με λοιμογόνο ιό. Αυτή η συσχέτιση δεν υπάρχει, αν η έκκριση του ιού προκαλείται με τη χορήγηση κορτικοστεροειδών.

Ανοσοσφαιρίνες και των τριών τάξεων είναι παρούσες στις απεκκρίσεις τόσο του αναπνευστικού όσο και του γεννητικού συστήματος, με υψηλότερο τον τίτλο των IgG ανοσοσφαιρινών στη μήτρα κατά τη διάρκεια του οίστρου περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη φάση του οιστρικού κύκλου. Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του τίτλου των αντισωμάτων στον ορό του αίματος και στο ωοθυλακικό υγρό.

Τα βοοειδή με χυμική ανοσία που προέρχονται από φυσική μόλυνση ή επιτυχή εμβολιασμό είναι μερικώς προστατευμένα. Αυτή η μερική ανοσία μπορεί να διαρκέσει για μια ολόκληρη ζωή, αλλά για να διατηρηθεί σε ανιχνεύσιμα επίπεδα μπορεί να απαιτηθεί περιστασιακή επανενεργοποίηση από εξωγενή έκθεση (εμβολιασμό) ή από ενδογενή απελευθέρωση του ιού. Τα βοοειδή που είναι μερικώς καλυμμένα μπορεί να υφίστανται επιφανειακές μολύνσεις των βλεννογόνων τους, αλλά είναι λιγότερο πιθανό να προκληθεί αποβολή ή κλινική νόσος, σε αντίθεση με τα ευαίσθητα βοοειδή που μολύνονται για πρώτη φορά.

2.8.2 Κυτταρική ανοσία

Η κυτταρική ανοσία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην προστασία του οργανισμού έναντι των λοιμώξεων από τον ιό BHV-1. Η παρουσία υπεραιμικών οζιδίων κατά μήκος της γεννητικής οδού σε άνοσα ζώα, τα οποία είχαν επαναμολυνθεί, θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα της κυτταρικής ανοσοποιητικής απάντησης. Έχουν περιγραφεί αλλαγές στον πληθυσμό των λευκών αιμοσφαιρίων, μετά από ενδοφλέβιο ενοφθαλμισμό σε ζώα καθώς και μία αξιοσημείωτη αλλαγή στη δραστηριότητα της μυελώδους μοίρας των λεμφογαγγλίων 5 ώρες μετά από ενδορινικό ενοφθαλμισμό (Straub, 1990). Οι Darcel και Dorward (1972) ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν τη δοκιμή υπερευαισθησίας σε διαγνωστικές ενδοδερμικές δοκιμασίες. Αν οι δοκιμασίες διεξάγονται σε ανοσοκατεσταλμένα ζώα, τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμών είναι λιγότερο εμφανή (Straub, 1990). Οι Rouse και Babiuk το 1975 απέδειξαν ότι τα T-λεμφοκύτταρα παίζουν τον πιο σημαντικό ρόλο. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι πέρα από τα λεμφοκύτταρα, τα κύτταρα που ανευρίσκονται στο υγρό της τραχειοβρογχικής έκπλυσης μπορεί να εμπλέκονται στη διαδικασία (Babiuk *et al.*, 1975)

Η μεσολαβούμενη από αντισώματα κυτταροτοξικότητα κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία των αλλεργιών του πνεύμονα των μηρυκαστικών (Straub, 1990). Οι ανοσοσφαιρίνες IgE μεταφέρονται παθητικά μέσω του πρωτογάλακτος οδηγώντας στην ευαισθητοποίηση των νεογέννητων μόσχων. Οι Jarrett και Hall το 1983 (Straub, 1990) πρότειναν την πιθανότητα η καταστολή της ανταπόκρισης των IgE αντισωμάτων από τα μητρικά IgG αντισώματα, να είναι μία φυσιολογική προστατευτική διαδικασία, αποσκοπώντας στην παρεμπόδιση εμφάνισης αλλεργιών στα νεογέννητα.

2.8.3 Μητρική ανοσία

Ο BHV-1 έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προκαλέσει μία πολύ θανατηφόρο νόσο στους νεογέννητους μόσχους, οι οποίοι έχουν εκτεθεί στον ιό είτε φυσικά είτε πειραματικά. Η σπουδαιότητα της κατανάλωσης πρωτογάλακτος από τα νεογέννητα για την προστασία τους από λοιμώδη νοσήματα είναι γνωστή. Έχει βρεθεί ότι τα αντισώματα του πρωτογάλακτος έναντι του BHV-1 μεταφέρονται στις εκκρίσεις της αναπνευστικής οδού των μόσχων από την πρώτη ακόμη μέρα της κατανάλωσης

πρωτογάλακτος και προστατεύουν τους μόσχους από την αναπνευστική μορφή της IBR.

Τα αντισώματα που προέρχονται από τη λήψη πρωτογάλακτος είναι σημαντικά για την ανθεκτικότητα των ζώων απέναντι στον ιό. Τα αντισώματα της παθητικής ανοσίας αποκτώνται κατά το θηλασμό από τους μόσχους άνοσων αγελάδων και η συγκέντρωσή τους μειώνεται ταχύτατα λόγω καταβολισμού τους. Οι τίτλοι των αντισωμάτων του πρωτογάλακτος ποικίλουν από μόσχο σε μόσχο, εξαρτώμενοι από τα επίπεδα των αντισωμάτων του πρωτογάλακτος, τη ληφθείσα ποσότητα και την επαρκή απορρόφησή τους από το έντερο. Μερικοί μόσχοι χάνουν τα μητρικά τους αντισώματα μέσα στον πρώτο μήνα της ζωής τους, ενώ άλλοι μπορεί να έχουν τίτλους μέχρι την ηλικία των 6 μηνών.

Ο προστατευτικός ρόλος του θηλασμού μπορεί να υπερκαλυφθεί από κάποια εμβόλια ή από σοβαρή μόλυνση με φυσικό ιό. Δεν υπάρχει βεβαιότητα ότι ο εμβολιασμός παρουσία μητρικών αντισωμάτων θα είναι επιτυχής. Οι μόσχοι που εμβολιάζονται σε ηλικία μικρότερη των 6 μηνών, πρέπει να επανεμβολιάζονται αν επιδιώκεται μακροπρόθεσμη προστασία απέναντι στον ιό. Ανάλογα με το μέγιστο επίπεδο των αντισωμάτων που επιτεύχθηκε, αυτά μπορεί να είναι ανιχνεύσιμα μέχρι 3 ως 4 μήνες και σε σπάνιες περιπτώσεις ακόμη περισσότερο. Μπορεί επίσης να ανευρεθούν στις ρινικές εκκρίσεις, αλλά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και σπάνια πέρα από την τρίτη εβδομάδα. Συνεπώς, οι μόσχοι θα πρέπει να εμβολιάζονται για τον BHV-1 σ' αυτήν την ηλικία εκτός κι αν είναι γνωστό το ιστορικό της μητέρας.

Έχει βρεθεί ότι αν δοθούν 1000 ml πρωτογάλακτος κατά τις πρώτες 12 ώρες της ζωής του νεογέννητου, τότε αυτή η ποσότητα είναι αρκετή για να διατηρηθεί η μητρική ανοσία. Εξάλλου, επίπεδα ανοσοσφαιρινών χαμηλότερα από 8 gr/l για τις IgG ανοσοσφαιρίνες, πιστεύεται ότι συνδέονται με ανεπαρκή παθητική μεταφορά των ανοσοσφαιρινών μέσω του πρωτογάλακτος (Straub, 1990).

Σε πειράματα που έχουν διεξαχθεί, έχει προσδιορισθεί η ποσότητα των ανοσοσφαιρινών (IgM, IgG, IgA) σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά τον τοκετό. Έτσι βρέθηκε ότι το μέγιστο στα επίπεδα των αντισωμάτων παρατηρείται μεταξύ των 6 και 9 ωρών μετά τον τοκετό. Αν ο μόσχος δε λάβει αρκετό πρωτόγαλα τότε η ποσότητα των αντισωμάτων του είναι χαμηλότερη απ' αυτή της μητέρας του και η παραγωγή αντισωμάτων απ' αυτόν ξεκινά νωρίτερα (μετά τις 6 εβδομάδες) απ' ότι σε μόσχους που έλαβαν περισσότερο πρωτόγαλα.

Σύμφωνα με άλλα πειράματα βρέθηκε ότι σε μόσχους με μητρική ανοσία έναντι της Α.Ρ.Β, ο εμβολιασμός με Ε.Α.Δ. εμβόλιο την 84^η μέρα της ζωής τους, δεν αύξησε τον τίτλο των αντισωμάτων τους. Αντίθετα, κατά τον επανεμβολιασμό των μόσχων την 196^η μέρα της ζωής τους παρατηρήθηκε έντονη αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων τους 2 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό, που πιθανότατα οφείλεται στη διέγερση κυττάρων μνήμης που παράχθηκαν κατά την πρώτη επαφή του ζώου με τον ιό (εμβολιακό στέλεχος) και ενεργοποιήθηκαν με την επαναληπτική δόση του

εμβολίου. Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και στην περίπτωση που η δεύτερη επαφή του ανοσοποιητικού συστήματος του ζώου γίνεται με τον φυσικό ιό.

Στην περίπτωση λοιπόν της Α.Ρ.Β, η παρουσία μητρικών αντισωμάτων στον ορό του αίματος των μόσχων αναστέλλει την ανάπτυξη της χυμικής ανοσίας, όταν ο εμβολιασμός γίνεται στις 84 ημέρες, ενώ όταν ο εμβολιασμός επαναλαμβάνεται κατά την 196^η μέρα που τα μητρικά αντισώματα δεν είναι πλέον ανιχνεύσιμα, τότε διεγείρεται η χυμική ανοσία με έντονη παραγωγή αντισωμάτων και αύξηση του τίτλου τους. Ωστόσο είναι δυνατόν στους μόσχους να υπάρχει έντονη αντίδραση της κυτταρικής ανοσίας χωρίς να είναι ανιχνεύσιμη η χυμική (Straub, 1990).

2.8.4 Μηχανισμοί ανοσολογικής διαφυγής

Τα βοοειδή είναι ικανά να αναπτύξουν αποτελεσματική ανοσοποιητική απάντηση μετά την πρωτογενή μόλυνση από BHV-1, οδηγώντας έτσι τις περισσότερες φορές σε ίαση και παύση της έκκρισης του ιού. Επειδή τα βοοειδή που μολύνονται από BHV-1 δεν μπορούν ποτέ να εξαλείψουν τη μόλυνση και επειδή κάθε μόλυνση από τον BHV-1 οδηγεί σε δια βίου λανθάνουσα μόλυνση, υπάρχει η θεωρία ότι υπάρχουν μηχανισμοί ανοσολογικής διαφυγής που διευκολύνουν την εγκατάσταση επίμονης μόλυνσης. Πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη BICP0 αναστέλλει τη μεταγραφή της IFN τύπου 1 (Henderson *et al.*, 2004). Ένας άλλος μηχανισμός διαφυγής του BHV-1, που είναι συντηρημένος και σε άλλους άλφα-ερπητοϊούς (ιός νόσου του Aujeszky, EHV-1 και HSV) είναι η αλληλεπίδραση της gC με τον παράγοντα 3 του συμπληρώματος (C3) που είναι ο κύριος μεσολαβητής της ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Ένας άλλος ανοσο-ρυθμιστικός μηχανισμός στους άλφα-ερπητοϊούς, είναι η αλληλεπίδραση της gG με διάφορες χημειοκίνες. Τόσο οι διαλυτές όσο και οι περικλειόμενες από μεμβράνη μορφές της gG λειτουργούν ως πρωτεΐνες σύνδεσης των χημειοκινών.

Με στόχο τη μείωση της ανίχνευσης και την εξάλειψη των μολυσμένων κυττάρων από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα, ο BHV-1 φάνηκε ότι μπορεί να μειώσει την παρουσίαση των αντιγόνων του από τα κύτταρα της τάξης 1 του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC-I) (Koppers-Lalic *et al.*, 2001). Υπάρχουν δύο ανεξάρτητοι μεταξύ τους μηχανισμοί που μειώνουν τον αριθμό των μορίων του MHC-I. Πρώτον, το γονίδιο του BHV-1 UL49.5 δεσμεύει το μεταφορέα που σχετίζεται με την επεξεργασία των αντιγόνων (TAP) και δεύτερον, η vhs πρωτεΐνη του ιού η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο UL41. Έτσι δρώντας συνεργικά μειώνουν τον αριθμό των μορίων του MHC-I, χωρίς όμως να μπορούν πλήρως να εμποδίσουν την ανίχνευση των μολυσμένων από BHV-1 κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Koppers-Lalic *et al.*, 2001).

2.9 ΛΑΝΘΑΝΟΥΣΑ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Οι λανθάνουσες λοιμώξεις μπορεί να συμβούν μετά από φυσική μόλυνση ή μετά από εμβολιασμό με Ελαττωμένης Λοιμογόνου Δύναμης (ΕΛΔ) εμβόλια. Αυτές οι λοιμώξεις που ουσιαστικά αντιστοιχούν στην ποσότητα του ιικού DNA που απομονώνεται από τα νευρικά γάγγλια που νευρώνουν τις πρωτογενείς εστίες της λοίμωξης, δεν ανιχνεύονται κλινικά αλλά μπορεί να επανενεργοποιηθούν υπό την επίδραση καταπόνησης ή κορτικοστεροειδών.

Το DNA του BHV-1 συνήθως ανιχνεύεται στα αισθητήρια γάγγλια του τριδύμου νεύρου στην περίπτωση της IBR και στα γάγγλια του ιερολαγόνιου πλέγματος στην περίπτωση της IVP και της IBP. Λανθάνουσα μόλυνση μπορεί ακόμη να εγκατασταθεί στα λεμφοκύτταρα των αμυγδαλών και στα περιφερικά λεμφοκύτταρα του αίματος. Μετά την κλινική ή την υποκλινική μόλυνση του αναπνευστικού συστήματος, ο BHV-1 εξαπλώνεται μέσω των νεύρων στα γάγγλια του τριδύμου όπου το γενετικό υλικό του ιού παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση. Ωστόσο, ο ιός μπορεί να εξαπλωθεί στο σώμα του ζώου μετά από ενδορινική μόλυνση και να εγκαταστήσει λανθάνουσα μόλυνση και σε πιο απομακρυσμένα γάγγλια (Winkler *et al.*, 2000).

Έχει βρεθεί ότι ο εμβολιασμός με αδρανοποιημένα εμβόλια, (τοπικά ή παρεντερικά χορηγούμενα), με ts (thermo sensitive –θερμοευαίσθητο) μεταλλάκτη εμβόλιο ή με ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης εμβόλια, όταν ακολουθηθεί από δοκιμή πρόκλησης με μόλυνση από φυσικό ιό, οδηγεί σε λανθάνουσα κατάσταση του τελευταίου. Οι Miller και Van der Maaten πρώτοι μελέτησαν τις αλλοιώσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα ύστερα από ενδομητρικό ενοφθαλμισμό του BHV-1. Έτσι, ενοφθάλμισαν ενδοφλέβια 6 μοσχίδες στη φάση του οίστρου και απομόνωσαν τον ιό από το ωχρό σωματίο, σε μία απ' αυτές, έπειτα από θεραπεία με δεξαμεθαζόνη. Οι ποσότητες του ιού που διασπείρονται μετά την επανεργοποίηση του δεν εξαρτώνται από τον τίτλο των αντισωμάτων (Straub, 1990).

Μετά από ενδοφλέβια μόλυνση μόσχων με τον BHV-1 ήταν δυνατό να απομονωθεί ο ιός από την ακροποσθία 3-4 μήνες μετά από τη χορήγηση δεξαμεθαζόνης. Έχει αναφερθεί αιφνίδια επανέκκριση του ιού από την ακροποσθία, τον κόλπο και το ρινικό βλεννογόνο μέχρι και 578 ημέρες μετά από τον ενοφθαλμισμό του BHV-1 στην ακροποσθία, στον κόλπο και ενδορινικά αντίστοιχα (Schyns *et al.*, 2003, Nandi *et al.*, 2009). Η μόλυνση μέσω του κόλπου οδήγησε επίσης σε λανθάνουσα μόλυνση στα γάγγλια του ιερολαγόνιου πλέγματος και απομόνωση του ιού από ρινικά και κοιλικά επιχρίσματα μετά από συνθήκες καταπόνησης ή χορήγησης κορτικοστεροειδών. Δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με τη διάρκεια της λανθάνουσας κατάστασης. Ωστόσο, έχει αναφερθεί υποτροπή της νόσου και 3 χρόνια μετά από την αρχική μόλυνση (Straub, 1990).

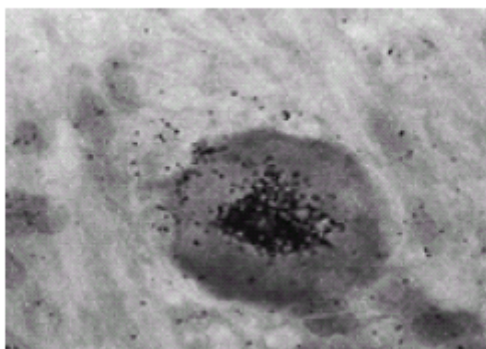
Η έκκριση του ιού κατά τη διάρκεια της επανενεργοποίησής του δε συνοδεύεται από κλινικά συμπτώματα. Ωστόσο, η προσεκτική κλινική εξέταση μπορεί να

αποκαλύπτει εστιακές αλλοιώσεις παρόμοιες με τις πληγές που προκαλεί ο ανθρώπινος ερπητοϊός. Το γεγονός ότι η επανενεργοποίηση του ιού BHV-1 μπορεί να συμβεί αρκετά χρόνια μετά την αρχική μόλυνση και μπορεί να αυξήσει τους τίτλους των αντισωμάτων, εξηγεί το φαινόμενο ότι κάποια ζώα μπορεί να είναι οροθετικά για πολλά χρόνια. Η επανενεργοποίηση των λανθανουσών λοιμώξεων από BHV-1 μπορεί να δικαιολογήσει την εμφάνιση κάποιων εξάρσεων της νόσου όταν δεν υπάρχουν έκδηλες εστίες μόλυνσης.

Επιπρόσθετα, η πιθανή επανενεργοποίηση των λανθανουσών λοιμώξεων από τον BHV-1, δικαιολογεί την υπόθεση ότι τα οροθετικά ζώα μπορεί να αποτελέσουν πιθανή εστία μόλυνσης για τα ευπαθή βοοειδή. Οι μέγιστοι τίτλοι των αντισωμάτων στις εκκρίσεις των ζώων - παρόλο που είναι αρκετά υψηλοί- δεν φτάνουν στα ίδια επίπεδα με αυτά που παρατηρούνται μετά την αρχική μόλυνση.

Επιπλέον, σε πείραμα όπου έγινε δοκιμή πρόκλησης με ενδοφλέβιο ενοφθαλμισμό δεξαμεθαζόνης σε δύο ομάδες μόσχων μολυσμένων με BHV-1 και BHV-5, παρατηρήθηκε ότι όλοι οι μόσχοι απέκκριναν τον αντίστοιχο ιό στις ρινικές τους εκκρίσεις και ότι η απέκκριση των ιών κατά τη φάση της επανενεργοποίησής τους ήταν περίπου 4 φορές πιο σύντομη σε διάρκεια και 10 περίπου φορές μικρότερη απ' αυτή που παρατηρήθηκε για τους δύο ιούς κατά τη φάση της πρωτογενούς μόλυνσης (Meyer *et al.*, 2000).

Η λανθάνουσα μόλυνση από BHV-1 μπορεί να περιπλέξει τις προσπάθειες ελέγχου της νόσου και δυσχεραίνει τη διαδικασία εισαγωγής ζώων και σπέρματος, ιδιαίτερα σε χώρες που παίρνουν μέτρα εξάλειψης της νόσου.



Εικ.2.9.1 Ανίχνευση του σχετιζόμενου με τη λανθάνουσα κατάσταση αντίγραφου RNA (LAT) του ιού HSV-1 σε νευρώνες του τριδύμου γαγγλίου ποντικού με *in situ* υβριδισμό (Roizman *et al.*, 2001).

Μετά την πρωτογενή μόλυνση από τον BHV-1 και τον πολλαπλασιασμό του στο επιθήλιο των βλεννογόνων, εγκαθίσταται λανθάνουσα μόλυνση στους αισθητήριους νευρώνες του περιφερικού νευρικού συστήματος, όπου ο ιός μπορεί να παραμείνει σε λανθάνουσα κατάσταση εφ' όρου ζωής ή να επανενεργοποιείται

περιοδικά και να προκαλεί εκτεταμένες αλλοιώσεις στον ξενιστή. Ο BHV-1 διεισδύει στην τελική απόληξη των αισθητήριων νευρών και κατανέμεται-διασπείρεται στο μολυσμένο επιθήλιο, φαινόμενο που παρατηρείται και σε άλλους άλφα-ερπητοϊούς (HSV, PrV). Στη συνέχεια μεταφέρεται κατά μήκος του νευράξονα, με τη βοήθεια μικροσωληνίσκων, για να φτάσει τελικά στο σώμα του νευρώνα στο νευρικό γάγγλιο. Παρόλο που η κύρια εστία των λανθανουσών μολύνσεων εντοπίζεται στους νευρώνες των γαγγλίων, υπάρχουν αποδείξεις ότι η λανθάνουσα μόλυνση και η επανενεργοποίηση του ιού μπορεί να γίνει και στα εμβρυικά κέντρα των φαρυγγικών αμυγδαλών (Winkler *et al.*, 2000).

Σε αντίθεση με τα 70-80 γονίδια που εκφράζονται κατά τη διάρκεια της λυτικής φάσης του κύκλου του ιού, κατά το στάδιο της λανθάνουσας μόλυνσης περιορίζεται σημαντικά η έκφραση των γονιδίων του. Μία μικρή μόνο περιοχή του γονιδιώματος του ιού είναι ενεργή μεταγραφικά στους νευρώνες που έχουν λανθάνουσα μόλυνση και αυτή η περιοχή καθορίζεται ως γονίδιο της λανθάνουσας φάσης (latency related gene, LR gene). Το μεταγραφικό RNA που προέρχεται από το LR γονίδιο (LRT, latency related transcript), είναι αυτό που εκφράζεται οδηγώντας στην αναστολή του λυτικού κύκλου του ιού και την έναρξη του σταδίου της μη απόπτωσης των κυττάρων. Συνεπώς, πιθανότατα οι αλληλουχίες του DNA του ιού στο LR τμήμα αυτού, ρυθμίζονται θετικά από παράγοντες των νευρικών κυττάρων. Η ύπαρξη αυτού ενισχύεται από το γεγονός ότι υπάρχει διαφορετική τοποθέτηση του σημείου έναρξης για το LR RNA στη φάση του λυτικού κύκλου, απ' ότι στη φάση της λανθάνουσας μόλυνσης στο τρίδυμο γάγγλιο. Στο τμήμα LRT του γονιδιώματος του ιού BHV-1 έχουν αποδοθεί διάφορες ιδιότητες:

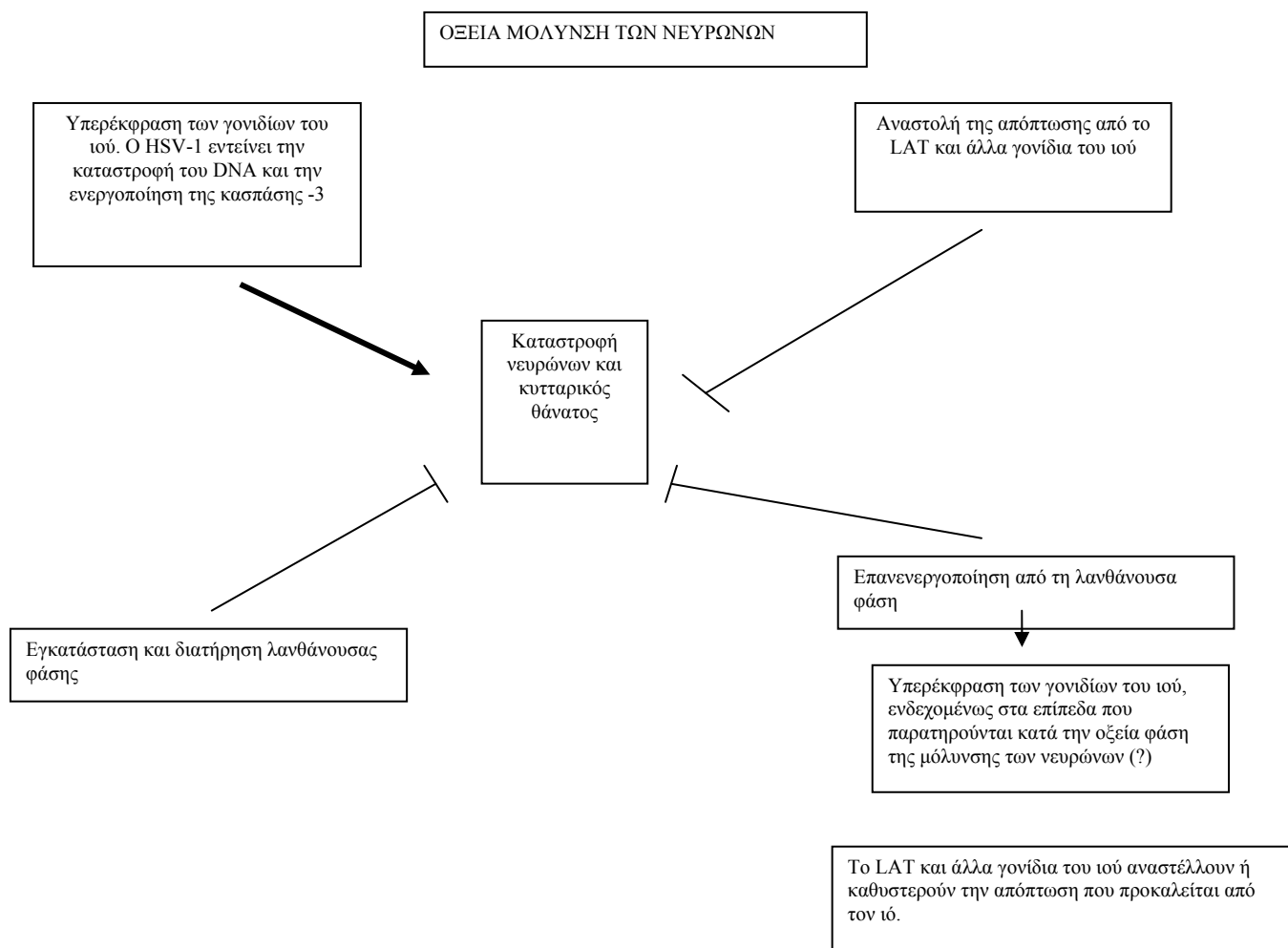
Αναστολή

1. της απόπτωσης των κυττάρων της εισόδου στη φάση S του κύκλου του ιού και
2. της έκφρασης της BICP0 πρωτεΐνης του ιού.

Συνεπώς το γονίδιο που σχετίζεται με τη λανθάνουσα κατάσταση του ιού (LR γονίδιο) είναι απαραίτητο για τον κύκλο λανθάνουσας φάσης-ενεργοποίησης του ιού καθώς και για την προστασία των νευρώνων από τον κυτταρικό θάνατο κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας μόλυνσης. Η αναστολή του κυτταρικού θανάτου είναι επίσης απαραίτητη για τη διατήρηση της λανθάνουσας κατάστασης καθώς διατηρεί ζωντανούς τους μολυσμένους -σε λανθάνουσα φάση- νευρώνες.

Μέχρι τώρα δεν έχει βρεθεί κανένας μηχανισμός που να εξηγεί το ρόλο του LR γονιδίου στην επανενεργοποίηση ή/και στην επανέκκριση του ιού BHV-1. Κατ' αναλογία με τις παρατηρήσεις στον κύκλο μόλυνσης του HSV, το ανοσολογικό σύστημα παίζει κάποιο ρόλο στον κύκλο επανενεργοποίησης και επανέκκρισης του ιού. Σε ένα πειραματικό πρότυπο μόλυνσης ποντικών με τον HSV-1, τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα που παράγουν ιντερφερόνη-γ, βρέθηκε ότι είναι ικανά να προλαμβάνουν την επανενεργοποίηση των αισθητήριων νευρώνων από τη λανθάνουσα κατάσταση (Liu *et al.*, 2000). Ωστόσο, δεν έχουν βρεθεί ακόμη

δεδομένα που να αποδεικνύουν τη συμμετοχή κάποιας πρωτεΐνης του ιού στη ρύθμιση της ανοσοποιητικής απάντησης κατά τη λανθάνουσα μόλυνση.



Εικόνα. 2.9.2 Πρότυπο σύνοψης του ρόλου του LAT γονιδίου του BHV-1 (που ακολουθεί το πρότυπο του HSV-1) στην επιβίωση των νευρώνων κατά τη διάρκεια του κύκλου λανθάνουσας περιόδου-επανενεργοποίησης του ιού (Jones, 2003).

Η επανενεργοποίηση του ιού μπορεί να συμβεί μετά από έκθεση σε φυσικό ερέθισμα (Thiry *et al.*, 1987) ή μετά από τη θεραπεία με κορτικοστεροειδή οδηγώντας σε επίμονη μετάδοση του ιού σε μη μολυσμένα ζώα χωρίς κλινικές εκδηλώσεις. Από τη στιγμή που ο BHV-1 επανενεργοποιηθεί στους νευρώνες του τριδύμου, εγκαθιστά έναν νέο κύκλο αντιγραφής του και μόλυνσης.

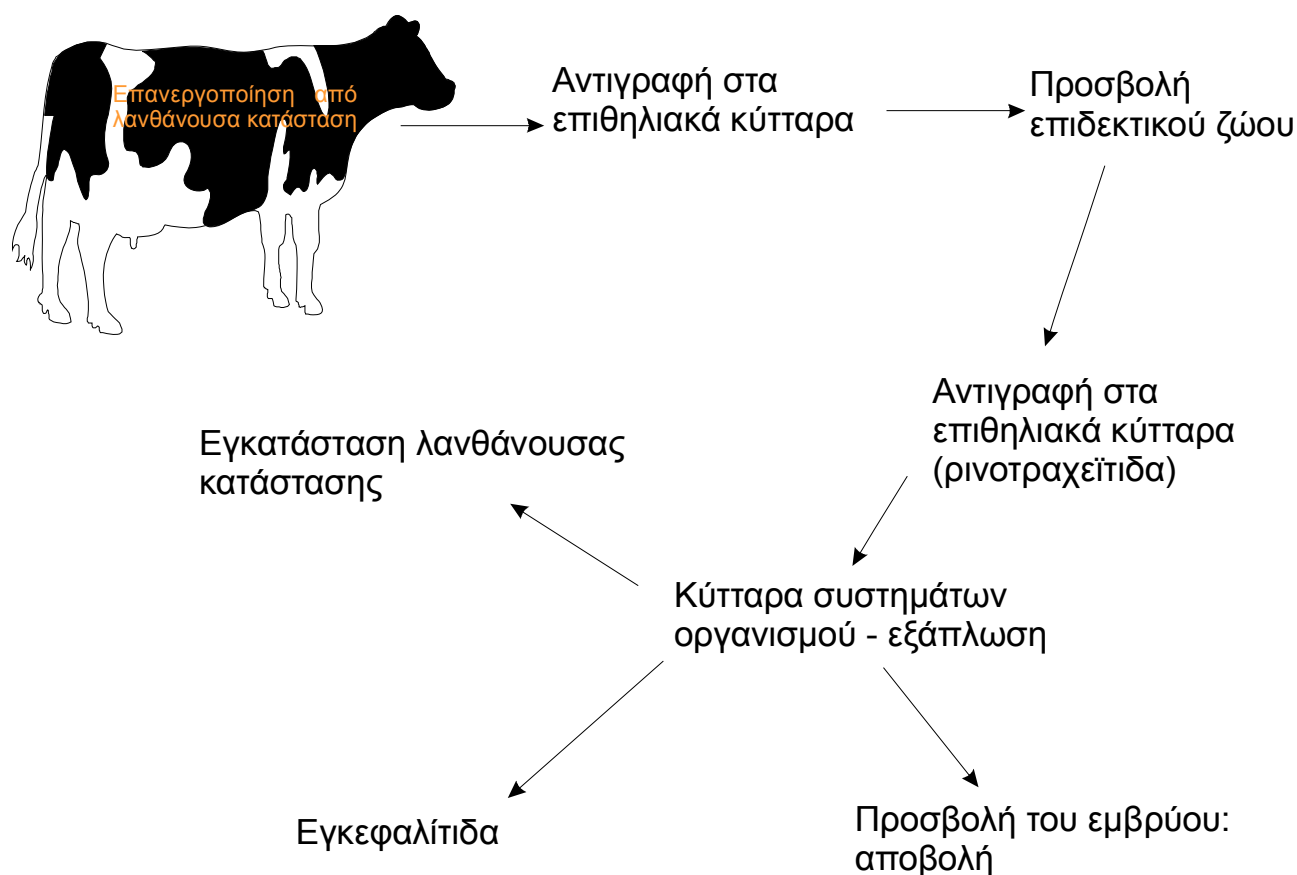
Σε πειράματα που έχουν γίνει σε κουνέλια με λανθάνουσα μόλυνση, όπου επιτεύχθηκε επανενεργοποίηση του ιού μετά από χορήγηση δεξαμεθαζόνης, αποδείχθηκε ότι ένα μικρό ποσοστό των νευρώνων υπέστησαν επιτυχή επανενεργοποίηση και ότι το DNA του ιού -το ειδικό της παραγωγικής μόλυνσης από τον BHV-1- ήταν ανιχνεύσιμο 18 ώρες μετά τη μόλυνση (Rock *et al.*, 1992). Τα απόγονα ιικά σωματίδια, πιστεύεται ότι φτάνουν στο σημείο της πρωτογενούς μόλυνσης κατά μήκος του νευράξονα.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την επανέκκριση του ιού είναι δύο: Η πρόιμη ανοσοποιητική απάντηση και ο φαινότυπος του απόγονου ιού.

Η ανοσοποιητική απάντηση που παρατηρείται πρώιμα μετά την έκθεση σε φυσικό στέλεχος του BHV-1 ή μετά από εμβολιασμό, είναι ικανή να ελέγξει επιτυχώς την επανέκκριση του ιού από οποιοδήποτε φορέα με λανθάνουσα μόλυνση. Η ανοσολογική αντίδραση που αναπτύσσεται δευτερογενώς όταν ενισχύεται από επιτυχές ερέθισμα είναι επίσης ικανή να εμποδίσει την επανέκκριση του ιού. Συνεπώς, το ερέθισμα της επανενεργοποίησης του ιού που συμβαίνει μέσα στους πρώτους 2 μήνες από την πρωτογενή μόλυνση, δεν αναμένεται να οδηγήσει σε επανέκκριση του ιού. Επιπλέον, ζώα τα οποία πριν την επανενεργοποίηση έχουν υψηλούς τίτλους εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του BHV-1, δε θα απεκκρίνουν ξανά οποιοδήποτε ιό μετά από επιτυχή δοκιμή επανενεργοποίησης-πρόκλησης.

Όσον αφορά τα απόγονα ιικά σωματίδια, ο φαινότυπος του ιού έχει επίδραση στην ικανότητα του ιού για επανέκκριση ή όχι. Πρόσφατα πειράματα έχουν δείξει ότι ιοί στους οποίους έχουν αφαιρεθεί οι γλυκοπρωτεΐνες gC και gE, ήταν ικανοί να εγκαταστήσουν λανθάνουσα μόλυνση, όχι όμως και επανέκκριση του ιού μετά από δοκιμή επανενεργοποίησης. Υπάρχουν ωστόσο και ανασυνδυασμένα προϊόντα του BHV-1, στα οποία έχει γίνει αφαίρεση της γλυκοπρωτεΐνης gE και τα οποία είναι ικανά να απεκκρίνουν τον ιό. Η σύγκριση όμως αυτών με μόσχους, οι οποίοι μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος του ιού, έδειξε ότι μικρότερο ποσοστό μόσχων μολυσμένων με τον ιό από τον οποίο έχει αφαιρεθεί η gE επανέκριναν τον ιό. Παρατηρήθηκε επίσης μία χρονική καθυστέρηση 3 ημερών στην περίοδο της επανέκκρισης του ιού. Τα γεγονότα αυτά αποδεικνύουν ότι ο φαινότυπος του ιού που παράγεται μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες της επανέκκρισης του ιού.

Εικόνα 2.9.3 Σχηματική απεικόνιση του κύκλου μόλυνσης από τον BHV-1.



2.10 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η ποικιλία καθώς και η ένταση των συμπτωμάτων που σχετίζονται με τη μόλυνση από τον BHV-1, εξαρτώνται από το στέλεχος του ιού, από τη δόση και την οδό έκθεσης ή ενοφθαλμισμού του ιού, από την ανοσολογική κατάσταση των ζώων και τέλος από περιβαλλοντικές επιδράσεις όπως η καταπόνηση και οι ταυτόχρονες μολύνσεις.

Συχνά παρατηρούνται υποκλινικές μολύνσεις από τον BHV-1, καθώς διάφορα στελέχη του ιού παρουσιάζουν μικρή ικανότητα να προκαλέσουν κλινικές εκδηλώσεις και ταξινομήθηκαν ως χαμηλής λοιμογόνου δύναμης στελέχη, σε μελέτες σύγκρισης της λοιμογόνου δύναμης διαφόρων στελεχών. Αλλιώς, η ασθενής εκδήλωση συμπτωμάτων θα μπορούσε να παρατηρηθεί και σε πρωτογενή μόλυνση μόσχων που έχουν επαρκή παθητική ανοσία σε χώρες όπου ο ιός BHV-1 ενζωοτεί.

2.10.1 Λοιμώδης Ρινοτραχεΐτιδα των Βοοειδών - Α.Ρ.Β.

Από τις κλινικές παθολογικές οντότητες που προκαλούνται από τον BHV-1, η Α.Ρ.Β είναι η πιο σημαντική από οικονομική άποψη. Η περίοδος επώασης της νόσου διαρκεί από 2 με 4 ημέρες, οπότε παρατηρούνται αναπνευστικά και οφθαλμικά συμπτώματα, που είναι συμβατά με την ανοσολογική αντίδραση στη φλεγμονή καθώς και με τις αλλοιώσεις στους επιθηλιακούς ιστούς, που προκαλεί ο BHV-1 στα σημεία που πρωτογενώς πολλαπλασιάζεται.

Σε μερικά βοοειδή το μόνο σύμπτωμα που παρατηρείται είναι ερυθρότητα του ρύγχους, εξαιτίας του οποίου χρησιμοποιείται συχνά και ο όρος “red nose” για την περιγραφή της νόσου. Επίσης, παρατηρούνται ρινική καταρροή, αρχικά ορώδους σύστασης, μείωση της πρόσληψης τροφής και καθώς η θερμοκρασία του ζώου αυξάνεται πάνω από τους 41 °C, τα ζώα εμφανίζουν έντονη αφρώδη σιελόρροια .

Η πτώση στην γαλακτοπαραγωγή κατά την περίοδο που τα ζώα παρουσιάζουν υψηλό πυρετό είναι αιφνίδια (Hage *et al.*, 1998; Van Schaik *et al.*, 1999). Τα ζώα διακόπτουν τη λήψη τροφής ενώ η σύσταση των ρινικών εκκρίσεων γίνεται βαθμιαία οροβλενώδης και τελικά βλεννοπυώδης. Η προσεκτική εξέταση του πρόσθιου τμήματος του ρινικού βλεννογόνου αποκαλύπτει την ύπαρξη προσκολλημένων λευκών νεκρωτικών αλλοιώσεων, που προέρχονται από τη συνένωση των αρχικά διακριτών φλυκταινών. Κατά την ίδια χρονική περίοδο παρατηρείται ερυθρότητα στους επιπεφυκότες, ενώ αυξάνεται η ποσότητα των οφθαλμικών εκκρίσεων, η σύσταση των οποίων είναι επίσης αρχικά οροβλενώδης και τελικά γίνεται βλεννοπυώδης. Μερικές φορές κατά την παρατήρηση των ζώων από απόσταση, το μόνο “σύμπτωμα” μπορεί να είναι “μία γραμμή από μύγες” πάνω στις παρειές τους.

Η κορύφωση στα συμπτώματα παρατηρείται 3-4 ημέρες μετά την εμφάνιση των πρώτων εκδηλώσεων. Αν οι δευτερογενείς βακτηριακές επιπλοκές αποφευχθούν με τη χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων, η θερμοκρασία μειώνεται βαθμιαία όπως και η συχνότητα των καρδιακών παλμών και της αναπνοής, τα οποία επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα. Σε ενδεχόμενο βακτηριακών επιπλοκών παρατηρείται μία δεύτερη άνοδος της θερμοκρασίας ή αυτή παραμένει συνεχώς υψηλή. Επίσης, παρατηρείται κοπιώδης αναπνοή με επακόλουθη υπέρπνοια, ενώ προθανάτια συχνή είναι η αναπνοή με ανοικτό το στόμα λόγω έντονης δύσπνοιας.

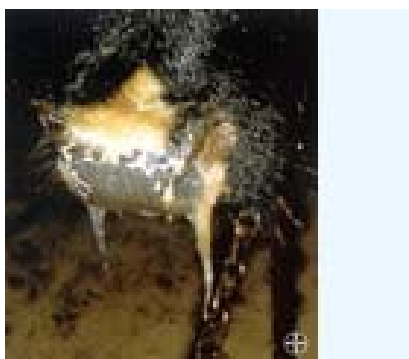
Στα ζώα που αναρρώνουν η όρεξη επανέρχεται μόλις η θερμοκρασία πέσει σε φυσιολογικά επίπεδα, ενώ η γαλακτοπαραγωγή αρχίζει να αυξάνεται και να φτάνει σχεδόν στα ίδια επίπεδα, εφόσον η διαχείριση της εκτροφής είναι η ενδεικνυόμενη.

Η απώλεια σωματικού βάρους λόγω της μειωμένης πρόσληψης τροφής και της αυξημένης κατανάλωσης ενέργειας, αντιστρέφεται σταδιακά και η πλήρης ανάρρωση του ζώου επιτυγχάνεται μετά από 4 με 5 εβδομάδες.

Η θνησιμότητα κατά την αναπνευστική μορφή της IBR είναι χαμηλή, εκτός κι αν υπάρξουν βακτηριακές επιπλοκές, γεγονός που παρατηρείται κυρίως στις εκτροφές εντατικής πάχυνσης μόσχων, όπου οι θάνατοι είναι πιο συχνοί σε σχέση με αυτούς που παρατηρούνται στις εκτροφές γαλακτοπαραγωγών αγελάδων.



Εικόνα 2.10.1.1. Ερυθρότητα με διαβρώσεις και έλκη στο βλεννογόνο του ρινικού κατόπτρου (red nose) (<http://www.arsvetclinic.blogfa.com/>) (Προσπελάστηκε στις 19/1/2010).



Εικόνα 2.10.1.2. Βλεννοπυώδες ρινικό έκκριμα σε αγελάδα με Λ.Ρ.Β. (<http://www.arsvetclinic.blogfa.com/>) (Προσπελάστηκε στις 19/1/2010).

2.10.2 Λοιμώδης Φλυκταινώδης Αιδοιοκολπίτιδα

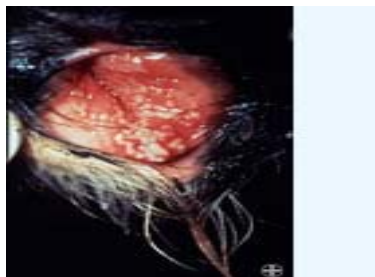
Η κλινική εικόνα της νόσου ήταν γνωστή πριν το 1958 ως αφροδίσιο εξάνθημα (coital exanthema) και στα δύο φύλα. Η εκδήλωση της νόσου ξεκινά 2 με 4 ημέρες μετά τη μόλυνση, η οποία μπορεί να γίνει με τους εξής τρόπους: Κατά τη φυσική οχεία ή την τεχνητή σπερματέγχυση ή ακόμη και μετά την μόλυνση από την ουρά παρακείμενων μολυσμένων ζώων ή κατά την όσφρηση των ζώων μεταξύ τους. Παρουσιάζεται με την αύξηση της θερμοκρασίας του ζώου, η οποία συχνά περνά απαρατήρητη στους ζωοκόμους.

Αρχικά παρατηρούνται μικρές φλύκταινες στο αιδοίο και στην οπίσθια περιοχή του κόλπου (εξωτερική μοίρα του κόλπου), οι οποίες στη συνέχεια μεγεθύνονται και

καταλαμβάνουν όλο το επιθήλιο παίρνοντας μορφή πλακών και προκαλώντας οίδημα και υπεραιμία. Παρατηρείται εξοίδηση του αιδοίου και αυξημένες άοσμες εκκρίσεις, οι οποίες ρυπαίνουν την ουρά που παρουσιάζεται επώδυνη, με αποτέλεσμα τα ζώα να μην την επαναφέρουν στην αρχική της θέση μετά την ούρηση ή την αφόδευση.

Τα ζώα είναι ανήσυχα και συχνά στρέφουν το κεφάλι τους προς τα πίσω. Η θερμοκρασία σε αυτό το στάδιο έχει ήδη φτάσει τους 40.5 -41.5 ° C, εξαρτώμενη από την ύπαρξη βακτηριακών επιπλοκών, οι οποίες ευνοούνται από την απώλεια του επιθηλίου.

Ο πυρετός και τα συμπτώματα συνεχίζουν για πάνω από 8 ημέρες. Ακολούθως η αποκατάσταση του επιθηλίου είναι ταχεία και το ζώο αναρρώνει μέσα σε 14 ημέρες. Κατά τη διάρκεια της νόσου τα ζώα δεν εμφανίζουν ανορεξία και η πτώση της γαλακτοπαραγωγής είναι λιγότερο έντονη από αυτή που παρατηρείται στην IBR, εκτός κι αν υπάρχει προσβολή του μαστού από τον ιό, οπότε παρατηρείται καταρροϊκή φλεγμονή παρόμοια σε εκδήλωση με οξεία βακτηριακή μαστίτιδα. (Straub, 1990). Το τελευταίο σύμπτωμα που παρατηρείται συνήθως 2 εβδομάδες μετά την λοίμωξη είναι υπερυψωμένα υπεραιμικά οζίδια διαμέτρου μερικών χιλιοστών, τα οποία μπορεί να παραμείνουν για μερικές εβδομάδες και να γίνουν πιο έντονα λόγω αντίδρασης υπερευαισθησίας καθυστερημένου τύπου, όταν τα ζώα επαναμολύνονται για δεύτερη ή τρίτη φορά .



Εικόνα 2.10.2.1. Ερυθρότητα και φλύκταινες στο βλεννογόνο του αιδοίου σε αγελάδα με IPV. (<http://www.arsvetclinic.blogfa.com/>) (Προσπελάστηκε στις 19/1/2010).

2.10.3 Λοιμώδης Βαλανοποσθίτιδα

Τα κλινικά συμπτώματα περιορίζονται στο βλεννογόνο της ακροποσθίας, του πέους και της τελευταίας μοίρας της ουρήθρας. Η πρόοδος της νόσου είναι παρόμοια με αυτήν που παρατηρείται στην IPV, αλλά η ίαση των αλλοιώσεων του επιθηλίου συχνά απαιτεί περισσότερο χρόνο. Οι ταύροι μπορεί να μεταδώσουν τη νόσο κατά τη φυσική οχεία, αλλά και κατά την τεχνητή σπερματέγχυση, καθώς ο ιός μπορεί να

ανιχνευτεί στο σπέρμα ταύρων με κλινικά εμφανή IBP αλλά και με λανθάνουσα υποκλινική μόλυνση.

Ειδικότερα στους ταύρους, ο BHV-1 συχνά πολλαπλασιάζεται αρχικά στο βλεννογόνο της ακροποσθίας, του πέους και της ουρήθρας και το σπέρμα πιθανότατα μολύνεται από τη διασπορά του ιού κατά την εκσπερμάτιση. Μετά την πρωτογενή μόλυνση ή τη χρήση ανεπαρκώς εξασθενημένων εμβολίων, ο ιός μεταναστεύει στα εγκεφαλικά ή στα νωτιαία γάγγλια και ειδικότερα, σε αυτή τη μορφή της νόσου, στα γάγγλια του ιερολαγόνιου πλέγματος, όπου παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση εφ' όρου ζωής. Σε περίπτωση επανενεργοποίησης του ιού μπορεί να ανιχνευτεί στο σπέρμα των ταύρων φορέων, χωρίς η έκκρισή του να συνοδεύεται από αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων στις ορολογικές εξετάσεις (Van Engeleburg *et al.*, 1993; Wrathall *et al.*, 2006).

Σε περίπτωση εισαγωγής σπέρματος σε χώρες που έχουν εξαλείψει τον ιό ή εφαρμόζουν προγράμματα εκρίζωσής του, θα πρέπει να ικανοποιούνται οι προϋποθέσεις όπως αυτές ορίζονται στο κεφάλαιο 2.3.5 του κώδικα υγείας των χερσαίων ζώων του Διεθνούς γραφείου επιζωοτιών (OIE) (OIE Terrestrial Animal Health Code). Έτσι, για το κατεψυγμένο σπέρμα απαιτείται βεβαίωση ότι **ο δότης προέρχεται από εκτροφή ή κέντρο τεχνητής σπερματέγχυσης, τα οποία είναι απαλλαγμένα από τον BHV-1 κατά τη στιγμή της συλλογής του σπέρματος ή ότι ο ταύρος βρισκόταν σε απομόνωση κατά τη στιγμή της σπερματοληψίας και 30 ημέρες μετά τη συλλογή. Τέλος οι ορολογικές εξετάσεις για αντισώματα κατά του BHV-1 θα πρέπει να είναι αρνητικές τουλάχιστον 21 ημέρες μετά την τελευταία συλλογή.** Σε περίπτωση οροθετικών ταύρων ή άγνωστης ορολογικής κατάστασης του ζώου πρέπει να εξετάζονται περισσότερα του ενός δείγματα από το ίδιο υλικό εκσπερμάτισης και να είναι αρνητικά. Η εγκατάσταση λοίμωξης από τον BHV-1 μετά την τεχνητή σπερματέγχυση αγελάδας με μολυσμένο σπέρμα, εξαρτάται από το στέλεχος και από την περιεκτικότητά του ιού στο σπέρμα.

Οι ίδιες αρχές ισχύουν και για την εμβρυομεταφορά. Όπως προαναφέρθηκε, πιστεύεται ότι η μόλυνση του σπέρματος γίνεται κατά την εκσπερμάτιση με τη διασπορά του ιού. Συνεπώς, υπάρχει η θεωρία ότι ο BHV-1 βρίσκεται στο πλάσμα του σπερματικού υγρού παρά στα σπερματοζωάρια. Σύμφωνα με άλλους ερευνητές ο ιός έχει ανιχνευτεί στη μεταπυρηνική καλύπτρα των σπερματοζωαρίων και θα μπορούσε θεωρητικά να μεταφερθεί στο ωάριο κατά τη γονιμοποίηση. Ωστόσο, υπάρχει διχογνωμία μεταξύ των ερευνητών για την ύπαρξη του ιού μέσα στο σπερματοζωάριο ή αν είναι προσκολλημένος στην επιφάνειά του (Wrathall *et al.*, 2006).

Διάφορες έρευνες έχουν γίνει σχετικά με την πιθανότητα μετάδοσης του BHV-1 κατά την εμβρυομεταφορά. Για το συγκεκριμένο σκοπό χρησιμοποιήθηκαν έμβρυα που δημιουργήθηκαν υπό συνθήκες *in vivo* με ακέραια τη διαφανή ζώνη, τα οποία συλλέχθηκαν 7 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Οι αγελάδες-δότριες ήταν μολυσμένες από τον BHV-1 είτε μετά από φυσική μόλυνση είτε μετά από ενδορινικό ή ενδοουρηθρικό πειραματικό ενοφθαλμισμό. Τα έμβρυα που συλλέχθηκαν

εξετάστηκαν για την παρουσία ιού ή μεταφέρθηκαν σε οροαρνητικές αγελάδες-λήπτριες. Σε άλλες πειραματικές μελέτες *in vivo* παραγόμενα έμβρυα εκτέθηκαν στον ιό σε κυτταροκαλλιέργειες. Ακολούθησε έκπλυσή τους με ή χωρίς θρυψίνη όπως ορίζεται από τα επιστημονικά πρωτόκολλα και τέλος εξετάστηκαν για την παρουσία του BHV-1. Σε όλες τις μελέτες, εφόσον χρησιμοποιήθηκε θρυψίνη για την έκπλυσή των εμβρύων, τα αποτελέσματα για την ύπαρξη του BHV-1 στα έμβρυα ή η μεταφορά του στις λήπτριες αγελάδες και στους απογόνους τους ήταν αρνητικά (Wrathall *et al.*, 2006).

Συμπερασματικά, ο BHV-1 έχει καταταγεί στην κατηγορία 1 της Διεθνούς Εταιρείας Εμβρυομεταφοράς (IETS, International Embryo Transfer Society) σύμφωνα με την οποία ο BHV-1 είναι ένας παθογόνος παράγοντας για τον οποίο υπάρχουν επαρκή δεδομένα, ότι ο κίνδυνος μετάδοσης είναι αμελητέος εφόσον τα έμβρυα υφίστανται τον κατάλληλο χειρισμό μεταξύ της συλλογής τους και της μεταφοράς τους. Ο κατάλληλος χειρισμός στην περίπτωση του BHV-1 προϋποθέτει την επεξεργασία των εμβρύων με θρυψίνη, καθώς με αυτό τον τρόπο απομακρύνονται τα υπολείμματα του ιού από τη διαφανή ζώνη μετά τη γονιμοποίηση.

Σε ότι αφορά τα *in vitro* παραγόμενα έμβρυα, τα πειράματα που έχουν γίνει έδειξαν ότι δεν επηρεάζεται η ωρίμανση των ωοκυττάρων αλλά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της συχνότητας της *in vitro* γονιμοποίησης (IVF, In Vitro Fertilization) ενώ παρατηρήθηκαν και ανωμαλίες στα σπερματοζωάρια. Συνεπώς, ο BHV-1 όχι μόνο ενσωματώνεται στους γαμέτες αλλά δυσχεραίνει και την ικανότητά τους για *in vitro* γονιμοποίηση, πιθανώς λόγω επίδρασης στη διεισδυτική ικανότητα των σπερματοζωαρίων ή και στους μηχανισμούς σύντηξης και ένωσης των γαμετών κατά τη γονιμοποίηση. Τέλος, τα *in vitro* παραγόμενα έμβρυα είναι πιο πιθανό να μεταφέρουν τον BHV-1 σε σχέση με τα *in vivo* παραγόμενα έμβρυα και είναι πιο δύσκολο να εξυγιανθούν με τη χρήση θρυψίνης κατά την επεξεργασία τους. (Wrathall *et al.*, 2006).

Το μολυσμένο σπέρμα και ο μολυσμένος εξοπλισμός μπορεί να αποβούν καταστροφικά σε κέντρα τεχνητής σπερματέγχυσης. Κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών μετά τη μόλυνση οι ταύροι μπορούν να γονιμοποιούν φυσιολογικά, μέχρις ότου σταματήσουν κατά την 3^η με 4^η ημέρα μετά τη μόλυνση, όταν η θερμοκρασία τους έχει αυξηθεί πολύ (40,5- 41,5° C) και το οίδημα της ακροποσθίας είναι πλέον έκδηλο.

Η ίαση των αλλοιώσεων μπορεί να επιβραδυνθεί αν οι ταύροι ερεθιστούν πολύ νωρίς. Τα νεοσχηματισμένα επιφανειακά αγγεία μπορεί να ριχθούν κατά τη στύση. Κατά την κορύφωση της εκδήλωσης των συμπτωμάτων, οι ταύροι είναι ανήσυχοι, συχνά σηκώνουν τα πίσω άκρα και κλίνουν το κεφάλι πλάγια. Μερικά ζώα εμφανίζουν ανορεξία για μερικές ημέρες με επακόλουθη απώλεια βάρους.

Τέσσερις εβδομάδες μετά τη φλεγμονή, μικρά υπεραίμικα οζίδια είναι ακόμη ορατά στο βλεννογόνο του πέους. Φτάνουν το μέγεθος μπιζελιού σε περίπτωση

δευτερογενών μολύνσεων. Ως επακόλουθο, μερικοί ταύροι μπορεί να παρουσιάζουν απροθυμία για σύζευξη ιδιαίτερα στα κέντρα τεχνητής σπερματέγχυσης. Τέλος, οι δευτερογενείς μολύνσεις πρέπει να αντιμετωπιστούν συστηματικά και όχι με τοπική θεραπεία η οποία επιδεινώνει τον ερεθισμό του πέους.

2.10.4 Πολυσυστηματική νόσος στα νεογέννητα

Οι νεογέννητοι μόσχοι μπορεί να εμφανίσουν πολυσυστηματική νόσο, η οποία οφείλεται σε συγγενή μόλυνση από τον BHV-1 ή σε μόλυνση αμέσως μετά τη γέννηση (Mechor *et al.*, 1987; Bryan *et al.*, 1994). Οι μόσχοι που έχουν στερηθεί το πρωτόγαλα είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι (Mechor *et al.*, 1987).

Τα συμπτώματα του πολλαπλασιασμού του BHV-1 στο επιθήλιο του πεπτικού συστήματος, τα όργανα του οποίου δεν αποτελούν συνήθως «στόχο» του BHV-1, είναι η σιελόρροια και η διάρροια. Διάφορες άλλες αλλοιώσεις που παρατηρούνται στο πεπτικό σύστημα είναι η γλωσσίτιδα, η οισοφαγίτιδα και η οξεία νεκρωτική φλεγμονή του ηνύστρου. Η κατάληξη αποβαίνει μοιραία οπότε οι μόσχοι πεθαίνουν συνήθως μετά από 4 με 5 ημέρες.

Για τη διερεύνηση αν η κατανάλωση πρωτογάλακτος πλούσιου σε μητρικά αντισώματα έναντι του BHV-1, θα προστάτευε τους νεογέννητους μόσχους από τη συχνή εμφάνιση της θανάσιμης πολυσυστηματικής μόλυνσης από τον BHV-1, διεξήχθη ένα πείραμα όπου σε Holstein μόσχους χορηγήθηκε για 48 ώρες μετά τη γέννησή τους πρωτόγαλα από οροθετικές εμβολιασμένες αγελάδες ή από οροαρνητικές μη εμβολιασμένες (Mechor *et al.*, 1987). Το πείραμα απέδειξε ότι τα μητρικά αντισώματα έναντι του BHV-1, μπορούν να προστατέψουν τα νεογέννητα από τη θανάσιμη πολυσυστηματική μορφή της IBR. Τα μητρικά αντισώματα, βελτίωσαν την κλινική εικόνα των μόσχων του πειράματος, στους οποίους έγινε πρόκληση της νόσου με ενδορινικό ενοφθαλμισμό του BHV-1, ενώ μείωσαν τη σοβαρότητα των παθολογικών αλλαγών που παρατηρούνται εξαιτίας της νόσου. Τα αντισώματα του πρωτογάλακτος εμπόδισαν την πολυσυστηματική εντόπιση του ιού και πιθανότατα την αιμία. Επιπλέον, οι οροθετικοί μόσχοι παρουσίασαν καταρροϊκή ρινίτιδα όμοια με αυτή των οροαρνητικών με την απουσία των εξελκώσεων που παρατηρήθηκαν στους μόσχους χωρίς μητρικά αντισώματα. Σε περίπτωση ελλιπούς κλινικής εξέτασης είναι δυνατό να διαφύγει η νόσος σε μία αντίστοιχη ομάδα οροθετικών μόσχων.

Εξάλλου η όρεξη και η διάθεση στους οροθετικούς μόσχους παρέμεινε αμείωτη κατά τη διάρκεια του πειράματος, ενώ παρατηρήθηκε και φαρυγγίτιδα, η οποία όμως ήταν πολύ πιο ήπια σε σύγκριση με τους μόσχους χωρίς μητρική ανοσία. Η φαρυγγίτιδα, η γλωσσίτιδα, η λαρυγγίτιδα και η οισοφαγίτιδα ήταν ίδιας μορφής με αυτές που είχαν περιγραφεί σε παλιότερες ερευνητικές μελέτες. Επιπλέον, στους οροαρνητικούς μόσχους παρατηρήθηκε πολύ έντονη προσβολή του αναπνευστικού

συστήματος με αύξηση της αναπνευστικής συχνότητας και παρουσία παθολογικών αναπνευστικών ήχων κατά την ακρόαση του θώρακα. Επίσης, παρατηρήθηκε τραχειίτιδα με τραχείς ήχους της τραχείας, κατά την ακρόαση, καθώς και αναπαραγωγή βήχα κατά την ψηλάφηση της τραχείας.

Σε άλλες μελέτες, κάποια στελέχη του BHV-1 προκαλούν νέκρωση στις πλάκες του Peyer και καταστροφή των λαχνών του λεπτού εντέρου σε μόσχους καθώς και σε μεγαλύτερα βοοειδή με επακόλουθη διάρροια. Είναι πιθανό ο ιός να έχει κάποια επίδραση στο πεπτικό σύστημα, η οποία να μην είναι μορφολογικά εμφανής και να επικαλύπτεται από την παρατηρούμενη αυτόλυση ή κάποιο τεχνούργημα. Τέλος, η επανάκτηση του ιού από τα ρινικά επιχρίσματα καθόλη τη διάρκεια του επτάημερου πειράματος, είναι σύμφωνη με μελέτες που αποδεικνύουν ότι ο ιός μπορεί να ανακτηθεί για 11 με 13 ημέρες μετά τη μόλυνση (Mechor *et al.*, 1987).

Η απουσία απομόνωσης του ιού BHV-1 από διάφορους ιστούς στους οροθετικούς μόσχους, αποδεικνύει ότι η μητρική ανοσία εμποδίζει, όπως προαναφέρθηκε, την πολυσυστηματική εντόπιση του ιού και την ιαιμία. Αντίθετα, στους μόσχους που έλαβαν πρωτόγαλα από οροαρνητικές αγελάδες, ο ιός απομονώθηκε από τους περισσότερους ιστούς τους, με εξαίρεση τον εγκέφαλο και το ήπαρ, όπου υπήρχε μόνο ένδειξη των αλλοιώσεων που προκαλεί ο ιός. Έτσι, δε βρέθηκαν λευκές εστίες ηκτικής νέκρωσης στο ήπαρ των προσβλημένων από την πολυσυστηματική μορφή της IBR μόσχων. Μόνο λίγα στελέχη του BHV-1 έχει βρεθεί ότι μπορούν να προκαλέσουν εγκεφαλίτιδα (Straub, 1990).

2.10.5 Α.Ρ.Β και αποβολές

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω κατά την πορεία της IBR όπου η απομόνωση του ιού από το αναπνευστικό σύστημα είναι εύκολη, συχνά παρατηρούνται αποβολές, οι οποίες πρέπει να διαχωριστούν από αυτές που συμβαίνουν σε περίπτωση αφανούς λοίμωξης από IBR. Επίσης, μόνο τα στελέχη του ιού BHV-1.1 και BHV 1.2 α έχουν συσχετιστεί με την πρόκληση αποβολής. Για πρώτη φορά αναφέρθηκαν αποβολές μετά τη χορήγηση εμβολίου έναντι της IBR, στο οποίο ο ιός δεν είχε αδρανοποιηθεί σωστά (Miller *et al.*, 1991).

Η αποβολή είναι επακόλουθο μόλυνσης μιας οροαρνητικής αγελάδας από την αναπνευστική μορφή της IBR. Οι παρατηρούμενες αποβολές κατά τη φυσική μόλυνση από τον BHV-1 συμβαίνουν κατά τον 4^ο με 8^ο μήνα της κυοφορίας ενώ ο πειραματικός ενοφθαλμισμός του ιού παρεντερικά σε μοσχίδες πριν τον 3^ο μήνα της κυοφορίας οδηγεί σε πρώιμο εμβρυϊκό θάνατο (Straub, 1990).

Η έκθεση ανεμβολίαστων ζώων για πρώτη φορά στον ιό μπορεί να οδηγήσει σε εξάρσεις αποβολών σε ποσοστό 25-60% των αγελάδων. Η πειραματική μόλυνση μπορεί να οδηγήσει σε αποβολή σε οποιοδήποτε στάδιο της κυοφορίας, αλλά σε συνθήκες φυσικής μόλυνσης οι αποβολές παρατηρούνται πιο συχνά κατά το δεύτερο

μισό της κυοφορίας και ιδιαίτερα κατά το τελευταίο τρίτο. Η περίοδος επώασης μεταξύ του ενοφθαλμισμού με τον BHV-1 και της προκαλούμενης αποβολής είναι 15 με 64 ημέρες (Muyikens *et al.*, 2007), ενώ οι παρατηρούμενες αποβολές είναι δυνατό να συνεχίζουν για διάστημα 90-100 ημερών. Εξαιτίας του χρόνου που μεσολαβεί από την μόλυνση των ζώων μέχρι την αποβολή, αυτά μπορεί να παρουσιάζουν οποιαδήποτε άλλα συμπτώματα της νόσου εκτός από την αποβολή (Kelling, 1973).

Ο BHV-1 μέσω της συστηματικής του εξάπλωσης διαπερνά το φραγμό μητέρας-εμβρύου για να προκαλέσει θανάσιμη μόλυνση στο έμβρυο. Η πορεία του BHV-1 από τον πλακούντα προς το έμβρυο δεν είναι γνωστή, αλλά καθώς οι αλλοιώσεις που προκαλεί ο ιός είναι πάντα παρούσες στο ήπαρ των εμβρύων, θα πρέπει να συμβαίνει αιματογενής μετάδοση πιθανότατα μέσω της ομφαλικής φλέβας.

Παρόλο που οι αλλοιώσεις παρατηρούνται τόσο στον πλακούντα όσο και σε διάφορα όργανα του εμβρύου, υπάρχει η άποψη ότι οι αλλοιώσεις του πλακούντα οφείλονται σε δευτερογενή εκφύλιση του, που ακολουθεί τον εμβρυϊκό θάνατο εξαιτίας της μόλυνσης από τον BHV-1.

Τα αποβληθέντα έμβρυα είναι συνήθως ηλικίας από 5 μηνών μέχρι το τέλος της κυοφορίας. Παρουσιάζουν αυτόλυση με ύπαρξη υγρού ερυθρής χροιάς τόσο στις σωματικές κοιλότητες όσο και στις περιτονίες. Συνήθως δεν υπάρχουν εμφανείς αλλοιώσεις εκτός από το οίδημα του πλακούντα, παρόλο που σπάνια παρατηρούνται μη διακριτές λευκές εστίες μεγέθους καρφίτσας στο ήπαρ του εμβρύου. Μία πιθανή διάγνωση μπορεί να γίνει με βάση τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στο ήπαρ, το οποίο παρά την παρατηρούμενη αυτόλυση, συνήθως παρουσιάζει έντονη πολυεστιακή νέκρωση. Εστιακές νεκρωτικές αλλοιώσεις παρατηρούνται και σε άλλους εμβρυϊκούς ιστούς, ιδιαίτερα στους πνεύμονες, στα επινεφρίδια, στο σπλήνα και στα λεμφογάγγλια. Εωσινοφιλικά ενδοπυρηνικά έγκλειστα είναι συνήθως δύσκολο να ταυτοποιηθούν, αλλά μερικές φορές αυτό είναι εφικτό στις αλλοιώσεις του φλοιού των επινεφριδίων. Πλακουντίτιδα και αγγειίτιδα στις λάχνες του πλακούντα απαντώνται συχνά, ιδιαίτερα σε περίπτωση που διαπιστώνεται με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας αφθονία ιϊκού αντιγόνου. Η διάγνωση επιβεβαιώνεται με απομόνωση του ιού, με ανίχνευση του ιϊκού αντιγόνου στους εμβρυϊκούς ιστούς με ανοσοφθορισμό (ιδιαίτερα σε νεφρούς) καθώς και με ανοσοϊστοχημεία σε ιστούς μονιμοποιημένους με φορμαλίνη (ιδιαίτερα από ήπαρ, πνεύμονες, νεφρούς, επινεφρίδια και πλακούντα) με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων.

2.10.6 Αλλοιώσεις στο αναπτυσσόμενο έμβρυο

Η αποβολή που οφείλεται στον BHV-1 προϋποθέτει τα ζώα να είναι έγκυα και ταυτόχρονα ευαίσθητα κατά την έκθεσή τους στον ιό. Τα ζώα μπορεί να αποβάλλουν είτε κατά τη διάρκεια υποκλινικής λοίμωξης από Λ.Ρ.Β, είτε στις εξάρσεις της

αναπνευστικής μορφής Λ.Ρ.Β ή της επιπεφυκίτιδας. Τα έμβρυα που εκτίθενται στον ιό μπορεί να αποβληθούν σε οποιοδήποτε στάδιο της κυοφορίας κυρίως όμως στο τελευταίο τρίτο. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την έκθεση στον ιό μέχρι την αποβολή μπορεί να ποικίλλει από 8 ημέρες μέχρι αρκετούς μήνες και οι αποβολές μπορεί να συμβούν κατά τη διάρκεια της κλινικής νόσου ή ακόμη και μερικούς μήνες αργότερα. Τα έμβρυα που αποβάλλονται κατά το τέλος της κυοφορίας μπορεί να γεννηθούν νεκρά ή να πεθάνουν λίγες ημέρες μετά τη γέννησή τους, με συμπτώματα της πολυσυστηματικής μορφής της Λ.Ρ.Β.

Τα έμβρυα που αποβάλλονται μπορεί να είναι νεκρά μέσα στη μήτρα για αρκετές ημέρες πριν την απόρριψή τους. Τα χαρακτηριστικά ευρήματα είναι αυτόλυση, εύθρυπτοι ιστοί καφέ-κόκκινης χροιάς, συγκέντρωση υγρού μέσα στις σωματικές κοιλότητες και απουσία ευδιάκριτων αλλοιώσεων, οι οποίες είναι δύσκολο να ανευρεθούν στα αυτολυμένα έμβρυα αλλά μπορεί να παρατηρηθούν μικροσκοπικά εστιακές αλλοιώσεις στο ήπαρ, στους νεφρούς και κάποιες φορές και στα επινεφρίδια.

Διάρροια και επιθηλιακές εξελκώσεις συνοδεύουν συνήθως τη θανατηφόρο μορφή της IBR που εμφανίζεται στα νεογέννητα ή την αναπνευστική μορφή της νόσου. Ωστόσο, είναι δύσκολο να διακριθεί αν αυτά τα συμπτώματα οφείλονται αποκλειστικά στην IBR ή και σε πολλά άλλα αίτια που προκαλούν διάρροια τόσο σε νεογέννητα όσο και σε ενήλικα βοοειδή.

2.10.7 Λ.Ρ.Β - Εγκεφαλίτιδα

Η εγκεφαλομυελίτιδα παρατηρείται σποραδικά στα νεαρά βοοειδή που μολύνονται από έναν ιό παρόμοιο με αυτόν της IBR. Πρόκειται για εγκεφαλίτιδα και μη πυώδη λεπτομηνιγγίτιδα, που οφείλεται σε ερπητοϊό και χαρακτηρίζεται από έλλειψη συντονισμού των κινήσεων, κυκλικές κινήσεις ή λείξη της πλευράς του ζώου, κατάκλιση και θάνατο.

Αρχικά θεωρήθηκε ότι η παθολογική αυτή οντότητα οφείλεται σε άλλο στέλεχος του ιού της IBR, αν και δεν είναι γνωστό σίγουρα ότι δεν οφείλεται σε ερπητοϊό BHV-5, καθώς ο ιός αυτός διακρίνεται μεν γενετικά αλλά όχι και στις ορολογικές τεχνικές και στον ανοσοφθορισμό από τον BHV-1. Ωστόσο, η κατάσταση αυτή φαίνεται να ελέγχεται από τα εμβόλια κατά της IBR (Cascio *et al.*, 1999).

Μεταγενέστερη εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση του γενετικού υλικού (DNA) του BHV-1 και BHV-5 σε παρασκευάσματα από εγκεφάλους μώσχων με μη διαγνωσμένη μη πυώδη θανατηφόρο εγκεφαλίτιδα, δείχνει ότι η κατάσταση αυτή παρόλο που εμφανίζεται σποραδικά είναι πιο συχνή απ' ό τι θεωρείτο (Ely *et al.*, 1996).

Η εγκεφαλίτιδα από BHV-5 πρέπει να διαφοροποιηθεί από την πολιοεγκεφαλομαλάκυνση, τη δηλητηρίαση από μόλυβδο, τη λύσσα, την ψευδόλυσσα και άλλες ασθένειες του Κ.Ν.Σ.

2.11 ΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

Αν τα ποσοστά νοσηρότητας σε περιστατικά IBR είναι χαμηλότερα από 100% τότε κάποια ζώα έχουν προστασία με την παρουσία αντισωμάτων έναντι στον ιό. Το ίδιο ισχύει και στις περιπτώσεις της IPV και της IBP, υπό την προϋπόθεση ότι τα ζώα έρχονται σε άμεση επαφή. Συχνά τα βοοειδή αναπτύσσουν αντισώματα έπειτα από τη μόλυνσή τους με ήπιας λοιμογόνου δύναμης στελέχη του ιού, κυρίως από στελέχη IPV, τα οποία πολλαπλασιάζονται στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα χωρίς όμως να προκαλούν συμπτώματα. Αυτά τα ζώα δεν νοσούν ακόμη κι αν η εκτροφή εκτεθεί σε πολύ λοιμογόνα στελέχη. Παρόμοια φαινόμενα παρατηρούνται όταν το στέλεχος της IPV παραμείνει σε μία εκτροφή όπου οι απόγονοι εκτρέφονται χωριστά. Όταν εισέλθει στην εκτροφή το στέλεχος που προκαλεί IBR, οι απόγονοι που δεν έχουν μητρικά αντισώματα νοσούν σοβαρά, ενώ οι μόσχοι που έχουν παθητική ανοσία δεν νοσούν. Οι μόσχοι, στους οποίους το επίπεδο της μητρικής-παθητικής ανοσίας έχει μειωθεί, εμφανίζουν ήπια κλινικά συμπτώματα. Συνεπώς όπως προκύπτει και από τη διεθνή βιβλιογραφία, το ποσοστό νοσηρότητας ποικίλλει από 20 έως 100 % (Yates, 1982; Straub, 1990).

Υπάρχει γενική ομοφωνία ότι τα επίπεδα θνησιμότητας εμφανίζουν σημαντική παραλλακτικότητα και εξαρτώνται από εξωτερικούς παράγοντες, όπως ο συνωστισμός, η τροφή, το κλίμα και οι συνθήκες υγιεινής. Τα διαθέσιμα στοιχεία αναφέρονται σε 2-10 %, 7-8%, 8-12% και 1-10 % (Yates., 1982; Straub, 1990), τα οποία σχετίζονται μόνο με την IBR. Οι θάνατοι είναι σπάνιοι σε περιπτώσεις IPV και IBP αλλά είναι συχνόι σε περιπτώσεις εγκεφαλίτιδας σε μόσχους. Η πλειονότητα των περιπτώσεων πεθαίνει την πέμπτη ημέρα μετά την πρώτη εκδήλωση συμπτωμάτων.

2.12 ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ

2.12.1 Λοιμώδης Ρινοτραχειίτιδα των Βοοειδών

Κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της νόσου, οι βλεννογόνοι του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος είναι εξοιδημένοι και συμφορημένοι. Κατά την

ενδοσκοπική εξέταση του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, παρατηρήθηκε ερυθρότητα των βλεννογόνων του φάρυγγα και της τραχείας και η παρουσία πολυάριθμων νεκρωτικών εστιών με νεκρά επιθηλιακά κύτταρα ενσωματωμένα σε ινώδεις εκκρίσεις.

Σε περίπτωση δευτερογενών βακτηριακών επιπλοκών, μεγάλες επιφάνειες καλύπτονται από βλεννοπυώδες πρασινωπό εξίδρωμα. Παράλληλα με τη ρινίτιδα, παρουσιάζονται λαρυγγίτιδα και τραχεΐτιδα. Οι κόλποι μπορεί επίσης να είναι συμφορημένοι και πλήρεις από εξίδρωμα. Στο λάρυγγα και στην τραχεία παρατηρούνται επίσης αιμορραγίες ενώ σε σπάνιες περιπτώσεις ο διάμεσος ιστός των λοβών του πνεύμονα είναι οιδηματώδης αλλά γενικά δεν παρατηρείται πνευμονία.

Ιστολογικά οι αλλαγές στο βλεννογόνο χαρακτηρίζονται από αξιοσημείωτο οίδημα στο χόριο και από λεμφοκυτταρικές διηθήσεις, οι οποίες σχηματίζουν στιβάδες σε μορφή ζώνης, ιδιαίτερα κατά μήκος των αδενικών πόρων οδηγώντας σε βαθύτερες στιβάδες. Στην περιφέρεια των κυττάρων που καταστρέφονται από τον ιό που αντιτυπείται, παρατηρείται αφθονία ουδετερόφιλων κυττάρων. Τα αιμοφόρα αγγεία στις προσβλημένες περιοχές διαγράφονται έντονα.

Οι Narita και συνεργάτες το 1982, βρήκαν αλλοιώσεις με εικόνα φλεγμονής στο κεντρικό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα, πιο συχνά στα γάγγλια του τριδύμου και στο ρομβεγκεφαλο (Straub, 1990).

Ζώα τα οποία παρουσιάζουν προσβολή του πεπτικού τους συστήματος εμφανίζουν μαζικές διαβρώσεις και εξελκώσεις στο στοματικό βλεννογόνο, στα χείλη, στα ούλα και στη σκληρή υπερώα, παρόμοιες μ' αυτές που παρατηρούνται στη νόσο των βλεννογόνων. Ίδιες αλλοιώσεις παρατηρούνται και στον οισοφάγο, στους προστόμαχους και στο ήνυστρο των βοοειδών. Το έντερο παρουσιάζει αλλοιώσεις καταρροϊκής εντερίτιδας με εμπλοκή και των επιχώριων λεμφαδένων. Ιστολογικά η διαδικασία ξεκινά με κενотоπιώδη εκφύλιση των επιθηλιακών κυττάρων που οδηγεί σε νέκρωση έκδηλη ακόμη και στις πλάκες του Peyer.

Βακτηριακές αποικίες παρατηρούνται στους αεραγωγούς, στις αμυγδαλές και στους πνεύμονες. Επίσης, νέκρωση παρατηρείται στο επιθήλιο των ρινικών κοιλοτήτων, της τραχείας και στους πνεύμονες και βλεννοπυώδεις αλλοιώσεις ήταν ιδιαίτερα έκδηλες στις φαρυγγικές αμυγδαλές και στις κυψελίδες. Οι ιστολογικές διαφορές που παρατηρούνται στους πνεύμονες μετά από επιπλοκή από *Pasteurella haemolytica*, 4 με 5 ημέρες μετά τη μόλυνση με BHV-1, περιγράφηκαν από τον Jericho το 1983 (Straub, 1990).

2.12.2 Λοιμώδης Φλυκταινώδης Αιδοιοκολπίτιδα και Λοιμώδης Βαλανοποσθίτιδα

Τυπικές αντιδράσεις φλεγμονής παρατηρούνται στο βλεννογόνο του αιδοίου, του κόλπου και του τραχήλου της μήτρας στα θηλυκά, καθώς και στο βλεννογόνο του πέους και της ακροποσθίας στα αρσενικά. Επίσης, είναι δυνατό να παρατηρηθεί και ενδομητρίτιδα ενώ στα αρσενικά φίμωση και παραφίμωση μπορεί να αναπτυχθούν στα τελευταία στάδια της νόσου. Το οίδημα είναι έκδηλο και στα δύο φύλα ενώ οι αλλοιώσεις στο επιθήλιο ορίστηκαν αρχικά ως φυσαλίδες, εξ' ου και το αρχικό όνομα της νόσου, αφροδίσιο εξάνθημα (coital exanthema ή «Bläschenausschlag»). Αργότερα εμφανίζονται και φλύκταινες οδηγώντας στην καθιέρωση του σύγχρονου όρου ως Λοιμώδης Φλυκταινώδης Αιδοιοκολπίτιδα, (Infectious Pustular Vulvovaginitis, IPV). Σε γενικές γραμμές πρόκειται για μια διαδικασία κατά την οποία σχηματίζονται πλάκες ενώ τα κύτταρα υφίστανται κενотоπιάδη εκφύλιση πριν νεκρωθούν, ως αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού του ιού. Ο ιός που απελευθερώνεται έτσι προσβάλλει τα γειτονικά κύτταρα και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

Όταν πλέον έχουν καταστραφεί αρκετά κύτταρα, τότε οι αλλοιώσεις είναι εμφανείς, αρχικά μικρές και στη συνέχεια μεγεθύνονται και τελικά γίνεται συνένωση των πρωτογενών εστιών. Σε αυτό το σημείο η νόσος φτάνει στην κορύφωσή της ενώ η ρήξη των τριχοειδών στα σημεία του πολλαπλασιασμού του ιού οδηγεί στην εμφάνιση μικρών εστιακών αιμορραγιών. Η βακτηριακή ανάπτυξη παρατηρείται στα σημεία όπου υπάρχει καταστροφή του επιθηλίου. Ένα τείχος από λεμφοκύτταρα περιχαρακώνει την εστία της αλλοίωσης και τα κοκκώδη κύτταρα φαγοκυτταρώνουν τα νεκρά επιθηλιακά κύτταρα. Ο γρήγορος σχηματισμός του λεμφοκυτταρικού φραγμού συμβαίνει εξαιτίας της παρουσίας πολυάριθμων μικροσκοπικών λεμφοαγγλίων στο γεννητικό σύστημα. Όταν η διαδικασία της εξάπλωσης του ιού παύει λόγω ανοσολογικών μηχανισμών, τότε η αναγέννηση του επιθηλίου εξελίσσεται ταχύτατα.

2.12.3 Α.Ρ.Β - Αποβολή

Παρατηρούνται χαρακτηριστικές αλλαγές στα όργανα του εμβρύου. Το τοίχωμα της μήτρας και ο πλακούντας δεν φέρουν ειδικές αλλοιώσεις. Ακόμη και έμβρυα αυτολυμένα μέσα στη μήτρα μπορεί να παρουσιάζουν αλλοιώσεις ενδεικτικές της αιτίας θανάτου. Οι πιο ευδιάκριτες αλλοιώσεις παρατηρούνται στο ήπαρ και στους νεφρούς. Μακροσκοπικά το ήπαρ παρουσιάζεται κιτρινωπό και με επιφάνεια ανώμαλη οφειλόμενη στην παρουσία εστιών νέκρωσης. Οι νεφροί, στις περισσότερες περιπτώσεις, περιβάλλονται από αξιοσημείωτο αιμορραγικό οίδημα. Η φλοιώδης μοίρα καταστρέφεται τελείως από σοβαρές αιμορραγικές διαδικασίες που συχνά

καταλείπουν μία λεπτή στιβάδα που προσαρτάται στην κάψα των νεφρών. Τα υπολείμματα, που περιλαμβάνουν τη μυελώδη μοίρα του νεφρού, επιπλέουν σε υγρό σκούρου ερυθρού χρώματος από κυτταρικά ράκη. Ιστολογικά, εστιακή νέκρωση και αιμορραγίες είναι τα μόνα ευρήματα.

2.12.4 Α.Ρ.Β - Εγκεφαλίτιδα

Μακροσκοπικά παρατηρούνται υπεραϊμία και πετέχειες στον εγκέφαλο. Η σπονδυλική στήλη εμφανίζεται φυσιολογική ενώ το εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι θολερό εξαιτίας του κυτταρικού του περιεχομένου. Ιστολογικά στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρείται περιαγγειακό οίδημα και περιαγγειακές διηθήσεις στον εγκέφαλο με ενδοπυρηνικά έγκλειστα στα αστροκύτταρα και στους νευρώνες.

Εκφυλιστικές διαδικασίες με σχηματισμό κενοτοπίων περιφερικά των νευρώνων παρατηρούνται στον εγκεφαλικό φλοιό, ενώ μερικές φορές παρατηρείται νέκρωση με αραίωση στην υπερκείμενη στιβάδα του εγκεφαλικού φλοιού.

2.12.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

2.12.5.1 Εργαστηριακή

Η εργαστηριακή επιβεβαίωση των ύποπτων για IBR περιστατικών, μπορεί να γίνει με ορολογικές τεχνικές, απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες, χρώση των ιστών με τη χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων (Fluorescent antibodies, FA) και ταυτοποίηση του DNA του ιού με μοριακές τεχνικές, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, ο υβριδισμός και η αλληλούχηση του γενετικού υλικού του ιού. Από τις παραπάνω τεχνικές, η απομόνωση του ιού είναι ασφαλής μέθοδος διάγνωσης ενώ θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην ταυτοποίηση των απομονωμένων στελεχών του ιού, καθώς έχουν βρεθεί και άλλοι ερπητοϊοί στα βοοειδή.

Συνεπώς, η εξειδικευμένη αιτιολογική διάγνωση των μολύνσεων από BHV-1, θα πρέπει να συνοδεύεται από τη λήψη εκτενούς, πλήρους ιστορικού, την αντίστοιχη συμπτωματολογία και την παρατήρηση αύξησης του ποσοστού των οροθετικών στον BHV-1 ζώων. Όλα τα δείγματα που αποστέλλονται στο εργαστήριο θα πρέπει να συνοδεύονται από ορούς αίματος, ενώ ιδιαίτερα σημαντική για τη διάγνωση είναι η δυνατότητα εξέτασης και δεύτερου δείγματος ορών από τα ζώα μετά από 2-3 εβδομάδες (ζεύγη ορών).

Μελέτες βασισμένες στη μέθοδο ELISA που ανιχνεύει ανοσοσφαιρίνες M (IgM) που είναι οι πρώτες που ενεργοποιούνται σε περίπτωση λοίμωξης, θα

μπορούσαν να είναι πολύ χρήσιμες για τις διαγνωστικές εξετάσεις που βασίζονται μόνο σε ένα δείγμα ορού αίματος (Graham *et al.*,1999).

Τα υλικά για την εργαστηριακή διάγνωση θα πρέπει να σχετίζονται με την αντίστοιχη μορφή της νόσου και να συλλέγονται προσεκτικά για να αποφευχθεί το ενδεχόμενο μικροβιακής επιμόλυνσης. Τα υλικά που προορίζονται για απομόνωση του ιού (ρινικό, οφθαλμικό έκκριμα , υλικό από εκκρίσεις του γεννητικού συστήματος) ενοφθαλμίζονται σε κυτταροκαλλιέργειες, οι οποίες ελέγχονται για τη διαπίστωση κυτταροπαθογόνου αποτελέσματος. Οι απομονώσεις του ιού ελέγχονται με ορολογικές, μοριακές ή και με τεχνικές ανοσοφθορισμού.

Στα ζωντανά ζώα με την αναπνευστική μορφή της IBR, θα πρέπει να συλλέγονται ρινικά επιχρίσματα κατά τα πρώιμα στάδια της νόσου, όταν ακόμη το ρινικό έκκριμα είναι ορώδες και όχι βλεννοπυώδες. Τα υλικά μετά τη συλλογή τους θα πρέπει να μεταφέρονται στο εργαστήριο, κατεψυγμένα ή μέσα σε ειδικό υπόστρωμα μεταφοράς. Η διάγνωση της επιπεφυκίτιδας που οφείλεται στον BHV-1, γίνεται με τις παραπάνω μεθόδους αλλά η συλλογή του επιχρίσματος γίνεται από τον επιπεφυκτικό σάκο.

Η λοιμώδης φλυκταινώδης αιδοιοκολπίτιδα (IPV) και η βαλανοποσθίτιδα (IBP) διαγιγνώσκονται με επιχρίσματα από το βλεννογόνο του αιδοίου, του κόλπου και του πέους και απομόνωση του ιού. Ο BHV-1 μπορεί να ανιχνευθεί και στο σπέρμα με απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες, καθώς και με αντιδράσεις ένθετης (φωλεακής) αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Masri *et al.*,1996).

Για την ταυτοποίηση του BHV-5 ως του αιτιολογικού παράγοντα σε περιστατικά εγκεφαλίτιδας, θα πρέπει να ληφθεί δείγμα εγκεφαλικού ιστού για τη απομόνωση του ιού ή και για την εξέταση με ανοσοφθορισμό.

Η εργαστηριακή διάγνωση της πολυσυστημικής μορφής της νόσου, μπορεί να γίνει με απομόνωση από επιχρίσματα από το ρινικό βλεννογόνο ή τον επιπεφυκότα πριν το ζώο πεθάνει, ενώ η απομόνωση του ιού από επιχρίσματα αίματος και ιδιαίτερα από επίχρισμα στιβάδας λευκοκυττάρων (buffy coat) μπορεί να επιβεβαιώσει την ύπαρξη ιαιμίας.

Σε περίπτωση ύπαρξης έντονων αλλοιώσεων κατά τη νεκροτομή λαμβάνονται δείγματα από σπλήνα, λεμφογάγγλια, ήπαρ, εγκέφαλο ή και από τους προστόμαχους τα οποία ενοφθαλμίζονται σε κυτταροκαλλιέργειες. Επιπλέον, η ιστολογική εξέταση δειγμάτων από τους παραπάνω ιστούς, μπορεί να αποκαλύψει την ύπαρξη ενδοπυρηνικών εγκλείστων, των οποίων η παρουσία υποστηρίζει τη διάγνωση όταν συνυπάρχουν συμπτώματα και αλλοιώσεις συμβατές με της IBR.

Η επιβεβαίωση του BHV-1 ως αιτιολογικού παράγοντα σε περιστατικά αποβολών απαιτεί την ταυτοποίηση του ιού στο ήπαρ, στον εγκέφαλο ή στο σπλήνα του εμβρύου. Περιστασιακά, τα αποβληθέντα έμβρυα φέρουν εστιακές νεκρώσεις στο βλεννογόνο των προστομάχων. Η εστιακή ηπατική νέκρωση δεν είναι πάντα εμφανής

οπότε συνιστάται η εξέταση ήπατος ή επινεφριδίων του εμβρύου για την ανεύρεση ενδοπυρηνικών εγκλειστών και εστιακής νέκρωσης.

Τέλος θα πρέπει να εξετάζονται οροί αίματος από αγελάδες που απέβαλαν ή από μοσχίδες. Τα έμβρυα από αποβολή οφειλόμενη σε BHV-1 σπάνια έχουν θετικό τίτλο αντισωμάτων επειδή ο θάνατος συνήθως επέρχεται πριν την ανάπτυξη ανοσοποιητικής απάντησης από το έμβρυο.

Είναι δυνατό να ανιχνευθεί ο BHV-1 και σε δείγματα γάλακτος από αγελάδες με μαστίτιδα-θηλίτιδα παρατηρούμενη κατά την IBR.

Η κλινική εικόνα συνήθως δεν επιβεβαιώνει τη διάγνωση της μόλυνσης από BHV-1 ενώ τα ζώα δεν είναι συνήθως αναιμικά. Η γενική εξέταση αίματος μπορεί να δείχνει εικόνα που ποικίλλει από λευκοπενία έως λευκοκυττάρωση.

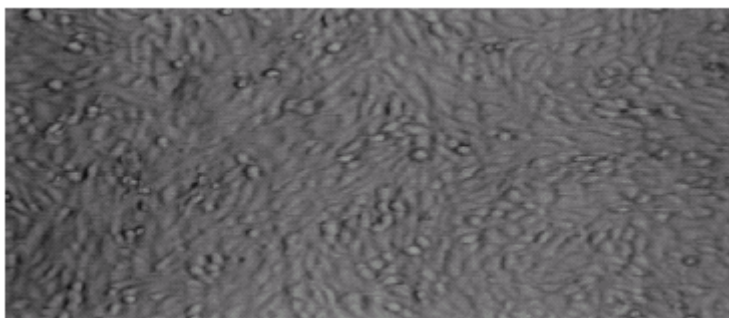
2.12.5.1.1 Απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες

Ο BHV-1 μπορεί να απομονωθεί εύκολα σε πρωτογενείς κυτταρικές σειρές από κύτταρα νεφρών, πνεύμονα, όρχεων, ρινικών κογχών ή τραχείας βοοειδών ή σε συνεχείς κυτταρικές σειρές όπως τα κύτταρα Madin–Darby Bovine Kidney (MDBK). Ωστόσο οι ομόλογες πρωτογενείς κυτταρικές σειρές (από νεφρούς μόσχου) είναι πιο ευαίσθητες.

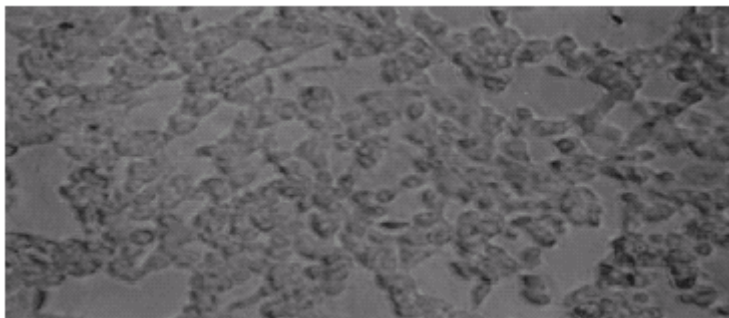
Ο ιός μπορεί να απομονωθεί από ρινικά, κολπικά και επιχρίσματα επιπεφυκότα καθώς επίσης και από υγρό έκπλυσης της πόσθης. Επίσης, μπορεί να απομονωθεί από τις κοτυληδόνες του πλακούντα αποβληθέντων εμβρύων, από διάφορα όργανα του εμβρύου όπως από το ήπαρ, τους πνεύμονες, το σπλήνα, το νεφρό, τα λεμφογάγγλια, τους βλεννογόνους της αναπνευστικής οδού, τις αμυγδαλές και τους πνεύμονες που πρέπει να συλλέγονται σε ειδικό υπόστρωμα μεταφοράς (Straub, 1990; Nandi *et al.*, 2009).

Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί νωπό ή κατεψυγμένο σπέρμα με συντηρητικά. Τα επιχρίσματα και τα άλλα ληφθέντα υλικά υφίστανται ειδική επεξεργασία και γίνεται ο ενοφθαλμισμός τους σε κυτταροκαλλιέργειες.

Εικόνα 2.12.5.1.1.1 Φυσιολογικά MDBK κύτταρα. (Nandi *et al.*, 2009).



Εικόνα 2.12.5.1.1.2. Κύτταρα MDBK μολυσμένα από τον BHV-1. (Nandi *et al.*, 2009).



Η παρουσία του ιού στα δείγματα ανιχνεύεται από το κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα του στα κύτταρα. Το κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα του BHV-1 είναι χαρακτηριστικό και συνήθως εμφανίζεται 3 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό του ιού στα κύτταρα (Εικόνα 2.12.5.1.1.2). Παρατηρούνται ομάδες -που μοιάζουν με τσαμπί από σταφύλι- από στρόγγυλα κύτταρα γύρω από μία μικροπλάκα στις κυτταροκαλλιέργειες. Επίσης, παρατηρούνται γιγαντοκύτταρα ή συγκύτια κυττάρων. Ο ιός προκαλεί λύση των κυττάρων, εφόσον τα κύτταρα επωαστούν για μεγάλο χρονικό διάστημα και παρατηρείται ολική αποκόλληση των κυττάρων από τις πλαστικές ή γυάλινες επιφάνειες της φιάλης. Οι κυτταροκαλλιέργειες που ενοφθαλμίστηκαν με παθολογικό υλικό, παρατηρούνται επί 7 ημέρες, ενώ τα κύτταρα πρέπει να υποστούν δίοδο και επανενοφθαλμισμό από τον προηγούμενο τουλάχιστον 3 φορές πριν θεωρηθούν αρνητικά (Straub, 1990; Turin & Russo, 2003). Ακόμη και ένα μόνο σωματίδιο του BHV-1 είναι ικανό για την παραγωγή μιας πλάκας με κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα.

2.12.5.1.2 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις.

Τα ενδοπυρηνικά έγκλειστα τύπου Α (χαρακτηριστικά της μόλυνσης από ερπητοϊούς) μπορεί περιστασιακά να ανιχνευθούν στα επιθηλιακά κύτταρα από τεμάχια βιοψίας του κόλπου, που συλλέχτηκαν κατά το αρχικό στάδιο της IPV, αλλά όχι και από κύτταρα του ρινικού εκκρίματος βοοειδών με Λ.Ρ.Β (IBR). Τα έγκλειστα έχουν βρεθεί επίσης στον εγκέφαλο ζώων με εγκεφαλίτιδα και σε ιστούς αποβληθέντων εμβρύων. Καθώς αυτά τα έγκλειστα δεν ανευρίσκονται σταθερά στα

κύτταρα, η διαγνωστική αξία της ιστοπαθολογικής εξέτασης είναι περιορισμένη (Turin & Russo, 2003).

2.12.5.1.3 Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Η ηλεκτρονική μικροσκόπηση με χρήση αρνητικής χρώσης, στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διερχόμενης δέσμης ηλεκτρονίων, για την ανεύρεση ιϊκών σωματιδίων αποτελεί ταχεία μέθοδο για τη διάγνωση του BHV-1. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του ιού στα αρχικά στάδια της νόσου, αλλά δεν θεωρείται ως η μέθοδος εκλογής. Εξάλλου δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνθήκες ρουτίνας καθώς το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δεν είναι προσιτό σε μικρά εργαστήρια λόγω υψηλού κόστους και απαίτησης εξειδικευμένου προσωπικού (Nandi *et al.*, 2009).

2.12.5.1.4 Μοριακές τεχνικές

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, είναι πολύ ευαίσθητη μέθοδος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη γρήγορη διάγνωση του ιού. Τα αποτελέσματα της PCR είναι διαθέσιμα μέσα σε λίγες ώρες, σε αντίθεση με την απομόνωση του ιού για την οποία, όπως προαναφέρθηκε, απαιτούνται τουλάχιστον 7 ημέρες.

Ο ιός μπορεί να ανιχνευτεί σε ρινικά επιχρίσματα μέχρι και 14 ημέρες μετά την πειραματική μόλυνση. Η PCR μπορεί επίσης να ανιχνεύσει τον ιό σε ορό εμβρύου μόσχου καθώς και σε δείγματα σπέρματος και έχει ισοδύναμη ευαισθησία με τον υβριδισμό dot-blot (Fuchs *et al.*, 1999). Η PCR μπορεί να ανιχνεύσει τον ιό σε δείγματα σπέρματος σε συχνότητα 5 φορές μεγαλύτερη απ' ό τι μπορεί η απομόνωση σε κυτταροκαλλιέργειες (Xia *et al.*, 1995). Ωστόσο, θα πρέπει να λαμβάνονται αυστηρά μέτρα ώστε να αποφεύγονται τα ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα καθώς η PCR να μην υπερτερεί σε σχέση με την απομόνωση σε κυτταροκαλλιέργειες από άποψη οικονομίας χρόνου αλλά μειονεκτεί από την άποψη των ψευδών αντιδράσεων (Schyns *et al.*, 2001; Nandi *et al.*, 2009).

Η real time PCR παρέχει ικανοποιητική παραγωγή προϊόντος, ποσοτικοποίηση, καθώς και υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία σε συνδυασμό με την εξοικονόμηση χρόνου για την παραγωγή καθαρού προϊόντος. Έτσι, αποτελεί ικανοποιητική εναλλακτική μέθοδο σε σχέση με την χρονοβόρα απομόνωση του ιού ειδικά σε πολλά δείγματα σπέρματος.

2.12.5.1.5 Ορολογικές τεχνικές.

Μία σειρά ορολογικών εξετάσεων είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του BHV-1 αλλά και για τη διαπίστωση της αύξησης του τίτλου των αντισωμάτων κατά την οξεία φάση της νόσου και κατά την ανάρρωση.

Όπως προαναφέρθηκε, η ανοσολογική αντίδραση κατά την πρωτογενή πειραματική μόλυνση από τον BHV-1 περιλαμβάνει την ανάπτυξη ειδικών IgM και IgG ανοσοσφαιρινών, 7 ημέρες μετά τον πειραματικό ενοφθαλμισμό. Οι δευτερογενείς ανοσολογικές αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από την ανάπτυξη IgG₂ αντισωμάτων (Turin *et al.*, 1999).

Η εξέταση σε ζεύγη ορών μπορεί να αποκαλύψει την πρόσφατη μόλυνση καθώς απαιτούνται συνήθως 2-3 εβδομάδες για να αναπτυχθούν αντισώματα. Έχει αναπτυχθεί μία ποικιλία εξετάσεων ELISA, όπως η έμμεση ELISA, η ανταγωνιστική (c-ELISA), και η αβιδίνη-βιοτίνη ELISA, που χρησιμοποιούνται για τον ορολογικό έλεγχο των βοοειδών σε σχέση με τον BHV-1.

Η έμμεση ELISA χρησιμοποιεί κεκαθαμένο ιό κλιμακούμενης πυκνότητας και ανιχνεύει αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών του φακέλου και του καψιδίου, ενώ η c-ELISA που ανιχνεύει αντισώματα βασίζεται στην ανίχνευση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της γλυκοπρωτεΐνης B ή της E του ιού BHV-1. Ένας συνδυασμός διαφορετικών ανοσογόνων γλυκοπρωτεϊνών του ιού είναι ο στόχος στην έμμεση ELISA ενώ στην c-ELISA ο στόχος είναι μία μοναδική πρωτεΐνη.

Εκτός από την ELISA έχει χρησιμοποιηθεί και η οροεξουδετέρωση για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του BHV-1. Η μέθοδος ELISA είναι μία ειδική, ευαίσθητη και πρακτική εξέταση σε σχέση με την οροεξουδετέρωση υπέρ της οποίας πλεονεκτεί (Kaashoek *et al.*, 1995; Van Oirschot *et al.*, 1997; Nandi *et al.*, 2009). Η IgM ELISA είναι χρήσιμη για τη διάγνωση των πρόσφατα μολυσμένων ζώων

Επιπλέον, εξαιτίας της λανθάνουσας μόλυνσης που προκαλεί ο BHV-1 και της σημαντικότητας του ρόλου των φορέων του ιού για τον έλεγχο του νοσήματος και τις διεθνείς συναλλαγές, θα πρέπει η μέθοδος ELISA να είναι πολύ ευαίσθητη (100% ευαισθησία) για την ανίχνευση του πολύ χαμηλού επιπέδου των αντισωμάτων στον ορό του αίματος των ζώων-φορέων.

Η έμμεση και η c-ELISA, δίνουν ποιοτικά και όχι ποσοτικά αποτελέσματα. Όπως προαναφέρθηκε, η πρωτογενής μόλυνση από τον BHV-1 διεγείρει ισχυρή χυμική αλλά και κυτταρική ανοσία στον ξενιστή. Η πρώτη ένδειξη ανάπτυξης κυτταρικής ανοσίας γίνεται αντιληπτή κατά την 5^η ημέρα μετά τη μόλυνση με μέγιστη αντίδραση την 8^η με 10^η ημέρα. Τα εξουδετερωτικά αντισώματα, σε πρώτη φάση οι IgM και ακολούθως οι IgG, ανιχνεύονται περίπου 7 ημέρες μετά τη μόλυνση (Turin & Russo, 2003).

Τέλος έχει αναπτυχθεί μία εμπορικά διαθέσιμη δεσμευτική (Turin & Russo., 2003) ELISA, η οποία έχει τη δυνατότητα να διαφοροποιεί τα εμβολιασμένα από τα φυσικώς μολυσμένα ζώα υπό την προϋπόθεση ότι τα ζώα είναι εμβολιασμένα με τα νεότερης τεχνολογίας ιχνηθετημένα εμβόλια (marker vaccines). Υπάρχει η

δυνατότητα χρησιμοποίησης του γάλακτος ως υλικού για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του BHV-1, γεγονός με ιδιαίτερη σημασία στα προγράμματα ελέγχου και εκρίζωσης της νόσου (Nandi *et al.*, 2009). Σε περίπτωση που ανευρεθούν αντισώματα κατά του BHV-1 στις δεξαμενές του αρμεγόμενου γάλακτος, γίνεται κατανοητό ότι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα περισσότερα από ένα ζώα της εκτροφής να έχουν μολυνθεί και να έχει εξαπλωθεί η νόσος.

2.13 ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ BHV-1.

Οι επιπτώσεις της μόλυνσης των αγελαδοτροφικών εκμεταλλεύσεων από τον BHV-1 είναι κυρίως οικονομικές και οφείλονται στην υπογονιμότητα, στις αποβολές, στην πτώση της γαλακτοπαραγωγής και στη θνησιμότητα στα νεογέννητα που η μόλυνση από τον ιό συνεπάγεται. Το κόστος της Λ.Ρ.Β (IBR) μπορεί να είναι πολύ μεγάλο. Σύμφωνα με μελέτες, η μόλυνση από τον BHV-1 μπορεί να μειώσει στις εκτροφές γαλακτοπαραγωγών αγελάδων την παραγωγή γάλακτος περίπου 173 λίτρα ανά ζώο. Άλλες μελέτες αναφέρουν την απώλεια κατά μέσο όρο 0,92 κιλών γάλακτος ανά αγελάδα την ημέρα. Μία τέτοια μείωση στη γαλακτοπαραγωγή έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια κατά μέσο όρο 169 € ανά έξαρση BHV-1 σε μία εκτροφή (Van Shaik *et al.*, 1999).

Ακόμη, σημαντικότερες είναι οι οικονομικές απώλειες που προκύπτουν από τους περιορισμούς στις συναλλαγές του ζωικού κεφαλαίου λόγω της μόλυνσης από τον BHV-1 και της απαγόρευσης εισαγωγής ζώων, σπέρματος και εμβρύων από εκτροφές ή χώρες στις οποίες ο BHV-1 δεν έχει εξαλειφθεί (Vonk Noordegraaf *et al.*, 2000). Γι' αυτό το λόγο η ΕΕ έχει θεσπίσει τις **οδηγίες 64/432, 88/407 και 93/60** σχετικά με τους παραπάνω περιορισμούς.

Σε διάφορες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης οι οποίες έχουν εξαλείψει τον BHV-1 (Δανία, Φινλανδία, Σουηδία) ή βρίσκονται στη διαδικασία εφαρμογής υποχρεωτικών προγραμμάτων για την εκρίζωσή του (Αυστρία), λαμβάνονται μέτρα με στόχο την αποτροπή εισόδου του ιού στις εκτροφές (στις χώρες όπου έχει εξαλειφθεί ο BHV-1) ή τη μείωση του επιπέδου μόλυνσης και την τελική απαλλαγή από τον ιό. Ο εμβολιασμός εξακολουθεί να είναι μία από τις πιο αποδοτικές, σε σύγκριση με το κόστος του, μεθόδους πρόληψης και διαχείρισης των λοιμωδών νοσημάτων. Με την εφαρμογή εμβολίων μπορεί να επιτευχθεί μείωση της μετάδοσης του αιτίου μέχρι πρόληψη και εξάλειψη αυτού. Για την εξάλειψη όμως είναι απαραίτητη η εφαρμογή των εμβολιασμών κάτω από αυστηρό και μεθοδικό πρόγραμμα και αυστηρές συνθήκες διαχείρισης της εκτροφής και όχι απλά με στόχο την προστασία των ζώων από τα κλινικά συμπτώματα.

Τα περισσότερα εμβόλια είναι συμβατικής τεχνολογίας και αποτελούνται από εξασθενημένους ή από ολόκληρους παθογόνους οργανισμούς. Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί εμβόλια νεότερης τεχνολογίας όπως τα εμβόλια υπομονάδων και τα εμβόλια στα οποία έχει γίνει απάλειψη γονιδίων (εφαρμογή στρατηγικής εμβολίων DIVA) και τα οποία άρχισαν να χρησιμοποιούνται σε επίπεδο ρουτίνας.

Τα εμβόλια κατά του BHV-1 κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες: Σε ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης (τροποποιημένα ζωντανά), σε αδρανοποιημένα (εμβόλια υπομονάδων και νεκρά), σε DNA εμβόλια και σε εμβόλια φορέων.

Τα Ελαττωμένης Λοιμογόνου Δύναμης (ΕΛΔ) εμβόλια παράγονται με την επιλογή φυσικών, εξασθενημένων στελεχών του ιού και διαδοχική δίοδό τους σε κυτταροκαλλιέργειες ή με την επιλογή ψυχρόφιλων προϊόντων τροποποίησης του ιού.

Τα νεκρά εμβόλια παρασκευάζονται με θερμική επεξεργασία και αδρανοποίηση του ιού, με την κατεργασία του με απολυμαντικές ουσίες ή την αδρανοποίησή του από χημικές ουσίες όπως η είναι η φορμαλδεΐδη και η β-προπιολακτόνη.

Ο BHV-1, περιέχει 11 γλυκοπρωτεΐνες στο περίβλημά του που αποτελούν πιθανούς στόχους για την ανάπτυξη χημικής ανοσίας (Turin *et al.*, 1999). Πολλές απ' αυτές τις γλυκοπρωτεΐνες προτάθηκαν να χρησιμοποιηθούν είτε ως ιχνηθέτες στα εμβόλια απάλειψης γονιδίου είτε στα εμβόλια υπομονάδων. Οι γλυκοπρωτεΐνες C, E, G και M δεν είναι απαραίτητες και συνεπώς μπορούν να αφαιρεθούν με μικρή ή καθόλου επίδραση στην ικανότητα του ιού για πολλαπλασιασμό *in vitro* και *in vivo*.

Ερευνητές απέδειξαν με πειράματά τους ότι η λοιμογόνος ικανότητα των ιών από τους οποίους έγινε απάλειψη των γλυκοπρωτεϊνών G, E, I και διπλή απάλειψη E/I, ήταν σημαντικά μειωμένη στα βοοειδή. Η αφαίρεση της γλυκοπρωτεΐνης C είχε ως αποτέλεσμα μικρή ή και καθόλου μείωση της λοιμογόνου δύναμης σε σχέση με το άγριο στέλεχος του ιού (Kaashoek *et al.*, 1995; Kaashoek *et al.*, 1998). Επιπλέον, τα στελέχη του ιού με απάλειψη στις gC, gE και gG προκαλούσαν την ανάπτυξη σημαντικής ανοσίας σε αντίθεση με τους ιούς με απάλειψη στις gI και gE/ gI. Τέλος, μετά τη χορήγηση δεξαμεθαζόνης οι ιοί με απάλειψη στις gC και gG μπορούσαν να απομονωθούν, υποδεικνύοντας μ' αυτόν τον τρόπο την ικανότητά τους για πρόκληση λανθάνουσας μόλυνσης, ενώ για τους ιούς απ' όπου αφαιρέθηκαν οι gE, gI και gE/ gI δεν κατέστη δυνατή η απομόνωσή τους. Δύο μεταγενέστερες μελέτες των Mars και συνεργατών τους, υπέδειξαν ότι το ζωντανό εμβόλιο με στέλεχος του BHV-1 που φέρει απάλειψη στη γλυκοπρωτεΐνη E, είναι σχεδόν απίθανο να μπορεί να επανεκκριθεί μετά από πιθανή επανενεργοποίηση του ιού (Mars *et al.*, 2000, 2001).

Τα παραπάνω δεδομένα σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η γλυκοπρωτεΐνη E είναι ικανή να προκαλέσει ισχυρή αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω της έντονης παραγωγής αντισωμάτων, οδήγησε στην επιλογή του τροποποιημένου BHV-1 ιού, που φέρει απάλειψη της γλυκοπρωτεΐνης E, ως το προτιμότερο για την εφαρμογή της στρατηγικής DIVA (Differentiated Infected from Vaccinated Animals) για την πρόληψη έναντι του BHV-1. Εξάλλου, η πλειοψηφία των άγριων στελεχών του BHV-1 φέρουν το γονίδιο που ελέγχει τη σύνθεση της γλυκοπρωτεΐνης E, ενώ η

αντιγονική ποικιλομορφία της τελευταίας είναι χαμηλή (Rijsewijk *et al.*, 1999), γεγονός που επιβεβαιώνει την καταλληλότητά της gE ως πρωτεΐνης ιχνηθέτησης στα εμβόλια.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες διαγνωστικές μέθοδοι βασισμένες στη γλυκοπρωτεΐνη E, του BHV-1. Αυτές οι τεχνικές βασίζονται στην ανταγωνιστική ή στη δεσμευτική ELISA, που διαφοροποιούνται ως προς το ότι βασίζονται στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της gE (Van Oirschot *et al.*, 1995, 1997).

Όσον αφορά τα εμβόλια υπομονάδων, τρεις από τις κύριες γλυκοπρωτεΐνες του BHV-1, οι gB, gC και gD, εξετάστηκαν ως προς την καταλληλότητά τους για την παρασκευή εμβολίων. Οι τρεις γλυκοπρωτεΐνες μπορούν να προκαλέσουν την ανάπτυξη ισχυρής ανοσολογικής αντίδρασης, συνεπώς και προστασίας από τον ιό όταν αναμειχθούν με ένα αποτελεσματικό ανοσοενισχυτικό. Η gD όμως ήταν αυτή που προκάλεσε την παραγωγή των υψηλότερων τίτλων εξουδετερωτικών αντισωμάτων και μείωσε την κλινική εκδήλωση της νόσου καθώς και την αντιγραφή του ιού (Van Drunen Littel- van den Hurk *et al.*, 1990).

Οποιαδήποτε ανοσοποιητική πρωτεΐνη προκαλεί την παραγωγή μακρόχρονης ανοσοποιητικής απάντησης, συμπεριλαμβανομένης και της gE, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρωτεΐνη ιχνηθέτησης για τη διαφοροποίηση των εμβολιασμένων με gD εμβόλια ζώων, από αυτά που είναι φυσικώς μολυσμένα. Συμπερασματικά, έτσι αναπτύχθηκαν δύο DIVA εμβόλια για τον BHV-1. Το ένα προέκυψε από την αφαίρεση του γονιδίου που κωδικοποιεί την γλυκοπρωτεΐνη E του ιού ενώ το άλλο από την τροποποίηση της γλυκοπρωτεΐνης D του ιού.

2.13.1 Η στρατηγική DIVA (Differentiation of Infected from Vaccinated Animals).

Η στρατηγική DIVA στοχεύει στη διαφοροποίηση των μολυσμένων από τα εμβολιασμένα ζώα με τη χρήση ιχνηθετημένων εμβολίων. Ιχνηθετημένο εμβόλιο θεωρείται το εμβόλιο, το οποίο όταν εισαχθεί στον οργανισμό, παράγονται αντισώματα που μπορούν να διαφοροποιηθούν από εκείνα που παράγονται με φυσική μόλυνση. Για τη δημιουργία του «ιχνηθετημένου» εμβολίου υπάρχουν δύο δυνατότητες «ιχνηθέτησης» η θετική και η αρνητική. Θετική θα ήταν αν είχε προστεθεί στο γονιδίωμα γενετικό υλικό, τεχνική που μέχρι σήμερα δεν έχει εφαρμοστεί. Ενώ αρνητική σήμανση έχει ήδη εφαρμοστεί με την αφαίρεση γενετικού υλικού, τα λεγόμενα “deleted” εμβολιακά στελέχη. Σε αυτά είχε διαπιστωθεί ότι υπήρχαν φυσικά στελέχη ιού BHV-1, τα οποία εμφάνιζαν απαλοιφή γονιδίων λόγω φυσικών μεταλλάξεων. Με βάση αυτήν την παρατήρηση, δημιουργήθηκαν βιοτεχνολογικά και χρησιμοποιήθηκαν ως εμβολιακά “deleted” στελέχη.

Η εφαρμογή της στρατηγικής DIVA είναι πολύ σημαντική στην προστασία των εκτροφών σε εθνικό επίπεδο. Είναι σημαντική επίσης ως μέσο ελέγχου των συναλλαγών ζωϊκού κεφαλαίου σε χώρες απαλλαγμένες από τον BHV-1. Εξάλλου στην περίπτωση που η απαλλαγή από τον ιό είναι ο στόχος, επιβάλλεται η χρήση των εμβολίων με “deleted” στελέχη, ως μέσο ελέγχου του επιπέδου μόλυνσης των εκτροφών.

Τα ιχνηθετημένα εμβόλια παρασκευάζονται με τις μεθόδους της γενετικής μηχανικής και διακρίνονται σε εμβόλια υπομονάδων, σε εμβόλια - φορείς και σε εμβόλια που περιέχουν αντιγόνο απ’ το οποίο έχει αφαιρεθεί κάποιο συγκεκριμένο γονίδιο (deleted gene). Για να είναι δυνατή η παρασκευή ενός ιχνηθετημένου εμβολίου, θα πρέπει η πρωτεΐνη που ιχνηθετείται να είναι δομική και μη απαραίτητη για την αντιτυπία του ιού, τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* συνθήκες. Επιπλέον, η πρωτεΐνη αυτή θα πρέπει να είναι παρούσα σε όλα τα στελέχη του άγριου ιού και να προκαλεί την παραγωγή έντονης και μακράς διάρκειας χυμικής ανοσίας, σε εμβολιασμένα και μη ζώα (Van Drunen Littel- van den Hurk *et al.*, 1990, 1993; Van Oirschot *et al.*, 1995, 1997; Muylkens *et al.*, 2007; Nandi *et al.*, 2009).

Πλεονεκτήματα:

1. Δυνατότητα αυξημένης ασφάλειας έναντι των συμβατικών ΕΛΔ εμβολίων
2. Είναι γνωστή η γενετική βάση για τη μείωση της λοιμογόνου δύναμης
3. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλια ιχνηθέτησης
4. Τα δομικά συστατικά τα οποία εντείνουν την ανοσοκαταστολή ή την ανοσοπαθολογία μπορούν να απαλειφθούν

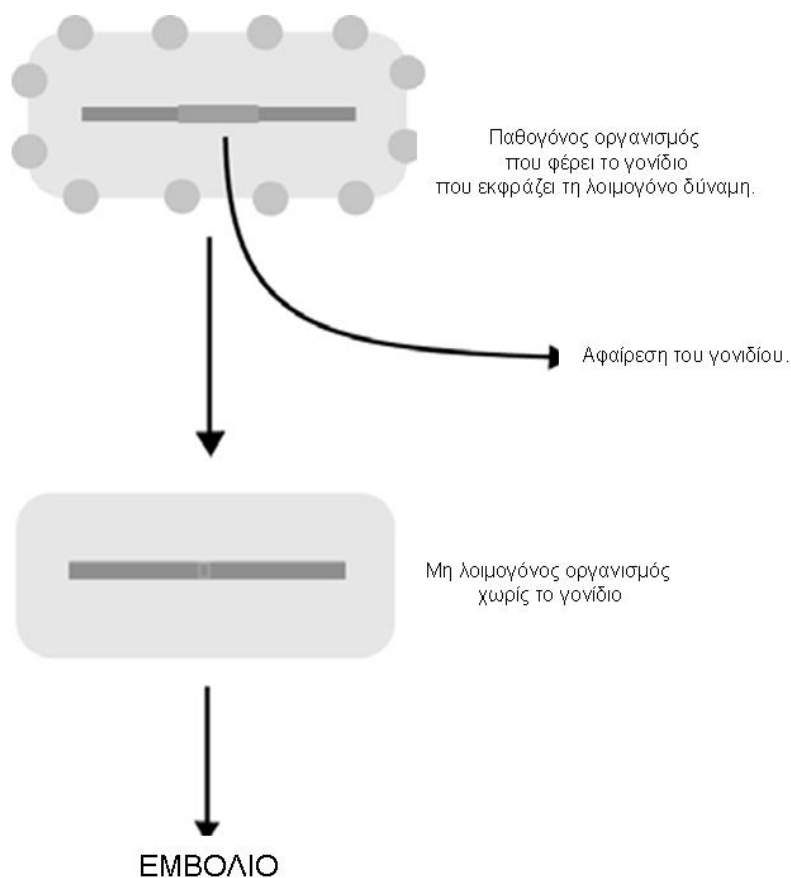
Μειονεκτήματα :

1. Θα πρέπει να ταυτοποιηθούν τα γονίδια που πρόκειται να απαλειφθούν
2. Δυνατότητα ανασυνδυασμού *in vivo* και ανάκτηση της λοιμογόνου ικανότητας
3. Όλα τα ιχνηθετημένα εμβόλια για το ίδιο νόσημα θα πρέπει να χρησιμοποιούν τον ίδιο ιχνηθέτη (marker).

Εικόνα 2.13.1.1 Εμβόλια με απάλειψη γονιδίου (Tizard, Ian R., 2004).

1. Ανίχνευση γονιδίου το οποίο δεν είναι απαραίτητο στην αντιγραφή του ιού και στην ανάπτυξη ανοσίας έναντι αυτού και αφαίρεσή του.

2. Χρήση του προκύπτοντος μη λοιμογόνου μικροοργανισμού ως ΕΛΔ ή αδρανοποιημένο εμβόλιο.



Copyright © 2004, Elsevier (USA). All rights reserved.

Ο BHV-1 έχει ορισμένα χαρακτηριστικά που έχουν συνεισφέρει στην επιτυχία των εμβολιασμών και στη δυνατότητα για απαλλαγή από τη νόσο.

Έτσι, ο BHV-1 είναι σταθερός ιός, ο οποίος προκαλεί οξεία μόλυνση που συνοδεύεται από αιμία. Επιπλέον διάφορα αντιγόνα προστασίας του ιού καθώς και αντιγόνα που είναι κατάλληλα για ιχνηθέτηση, υπάρχουν στα κύρια στελέχη του BHV-1 και προκαλούν αξιοσημείωτη και μακράς διάρκειας ανοσοποιητική απάντηση τόσο σε ανεμβολίαστα όσο και σε ζώα που έχουν εμβολιαστεί στο παρελθόν.

Όπως προαναφέρθηκε, τα εμβόλια που χρησιμοποιούνται για τον BHV-1 προκαλούν γενικά την ανάπτυξη ισχυρής χυμικής αλλά ασθενούς κυτταρικής

ανοσίας. Συνεπώς, κριτήριο για την επιτυχία του εμβολιασμού είναι η ικανότητα των εξουδετερωτικών αντισωμάτων να παρέχουν προστασία έναντι του ιού. Πράγματι, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της αντίδρασης των εξουδετερωτικών αντισωμάτων και του επιπέδου της προστασίας για τον BHV-1 (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.*, 1993). Τέλος, ο BHV-1, αναπτύσσεται σε υψηλούς τίτλους σε κυτταροκαλλιέργειες, γεγονός που είναι πολύ σημαντικό από άποψη δυνατότητας παραγωγής του εμβολίου.

Η αποτελεσματικότητα των εμβολίων DIVA αποδείχθηκε με δύο πειράματα κάτω από συνθήκες φυσικές.

Στο πρώτο πείραμα, παρατηρήθηκε μία σημαντική μείωση του αριθμού των ζώων με αντισώματα έναντι της γλυκοπρωτεΐνης E του ιού σε εκτροφές όπου χρησιμοποιήθηκαν αρνητικά gE εμβόλια (Mars *et al.*, 2001). Το συγκεκριμένο πείραμα εμπειρείχε τέσσερις πειραματικές ομάδες ζώων, εκ των οποίων στις τρεις κάποια ζώα εμβολιάστηκαν ενδορινικά με gE αρνητικό BHV-1 ιό και ήταν ικανά να απεκκρίνουν τον ιό στο ρινικό τους έκκριμα για 5-9 ημέρες περίπου, ενώ το σύνολο των εμβολιασμένων ζώων ανέπτυσαν αντισώματα έναντι του εμβολιακού ιού μετά από 14 ημέρες. Αντίθετα δεν απομονώθηκε ιός από το ρινικό έκκριμα των ανεμβολίαστων ζώων που ήρθαν σε στενή επαφή με τα εμβολιασμένα ζώα. Επιπλέον, σε αυτά τα ζώα οι ορολογικές εξετάσεις που έγιναν (gB blocking ELISA, οροεξουδετέρωση και gE blocking ELISA) ήταν αρνητικές και κανένα από τα ζώα δε νόσησε. Στην τέταρτη πειραματική ομάδα ένα μέρος των ζώων εμβολιάστηκε ενδομυϊκά με gE αρνητικό BHV-1 ιό και κανένα από τα εμβολιασθέντα ζώα δεν απέκκρινε τον ιό στο ρινικό του έκκριμα ενώ όλα ανέπτυξαν αντισώματα κατά του εμβολιακού BHV-1. Τέλος, κανένα από το σύνολο των ζώων του πειράματος δεν ανέπτυξε αντισώματα έναντι του άγριου στελέχους του BHV-1, όπως φάνηκε από τα αρνητικά αποτελέσματα στην gE blocking ELISA.

Η απουσία μετάδοσης του εμβολιακού στελέχους του ιού από τα εμβολιασμένα στα ανεμβολίαστα ζώα, τα οποία βρίσκονταν σε στενή επαφή μαζί τους, πιθανότατα οφείλεται στην απουσία από το εμβολιακό στέλεχος του γονιδίου που κωδικοποιεί την γλυκοπρωτεΐνη E του ιού. Εξάλλου, πολλές έρευνες έχουν γίνει σχετικά με το ρόλο της gE στους ερπητοϊούς και αποδείχτηκε ότι αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στην μετάδοση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο *in vitro*. Σε *in vivo* συνθήκες, σε gE αρνητικούς ερπητοϊούς όπως στον PrV (ιό της Aujeszky) και στον HSV, παρατηρήθηκε περιορισμένη εξάπλωση του ιού μέσω του νευρικού συστήματος ενώ στην περίπτωση του μεταλλαγμένου gE αρνητικού BHV-1 ιού, παρατηρήθηκαν διαφορές με τον άγριο ιό σχετικά με την ποσότητα του ιού στους διάφορους ιστούς. Επιπλέον, ο ενδορινικός ενοφθαλμισμός του gE αρνητικού BHV-1 ιού, προκάλεσε λίγες και επιφανειακές αλλοιώσεις του ρινικού βλεννογόνου, σε αντίθεση με τον άγριο ιό, ο οποίος προκαλεί σοβαρές νεκρωτικές εξελκώσεις που φτάνουν μέχρι τα βαθύτερα στρώματα του ρινικού βλεννογόνου. Τέλος, οι οδοί μόλυνσης από τον BHV-1, μπορεί να εξηγούν την απουσία μετάδοσης του εμβολιακού ιού από ζώο σε ζώο, καθώς για να συμβεί μετάδοση θα πρέπει να υπάρχει στενή επαφή μεταξύ του

ευαίσθητου και του μολύνοντος ζώου, ενώ το τελευταίο θα πρέπει να απεκκρίνει μεγάλες ποσότητες ρινικού εκκρίματος, που να περιέχει τον ιό σε υψηλούς τίτλους.

Το δεύτερο πείραμα έδειξε ότι οι επαναληπτικοί εμβολιασμοί χρησιμοποιώντας είτε νεκρά είτε ΕΛΔ αρνητικά ιχνηθετημένα gE εμβόλια, είναι αποτελεσματικοί στη μείωση της παρουσίας οροθετικών gE ζώων, σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής και κατά συνέπεια στη μείωση του ποσοστού των οροθετικών gE ζώων, σε μία εκτροφή. Αυτή η έρευνα, απέδειξε την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα των επαναληπτικών ανά 6μηνο εμβολιασμών (Muylkens *et al.*, 2007).

Παρά την αποτελεσματικότητα των DIVA εμβολίων, υπάρχουν και ορισμένα μειονεκτήματα αυτών. Έτσι η ισχύς αυτών των εμβολίων εξαρτάται απόλυτα από την αξιοπιστία των διαγνωστικών εξετάσεων ανίχνευσης των ειδικών αντισωμάτων κατά του BHV-1. Εξάλλου η ευαισθησία της μοναδικής διαθέσιμης ELISA για την ανίχνευση των ειδικών αντί-gE αντισωμάτων, είναι περίπου 70%, γεγονός που ευθύνεται για το 30% των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων σε μεμονωμένους ελέγχους. Ωστόσο η ELISA παραμένει μία αξιόπιστη και πρακτική μέθοδος για τη ανίχνευση της οροθετικότητας σε επίπεδο μολυσμένης εκτροφής (Kramps *et al.*, 2004). Το δεύτερο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι το γεγονός ότι αναπτύσσεται χαμηλή αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι της γλυκοπρωτεΐνης E του ιού. Συνεπώς το χρονικό “παράθυρο” κατά το οποίο μπορεί η μέθοδος αυτή να ανιχνεύσει αντί-gE αντισώματα μπορεί να καθυστερήσει μέχρι και 42 ημέρες.

2.13.2 Ο ΑΠΩΤΕΡΟΣ ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗΣ DIVA.

Ο απώτερος στόχος της στρατηγικής DIVA είναι η προστασία από τον ιό. Τα περισσότερα εμβόλια είναι ικανά να εμποδίζουν την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων μετά τη δοκιμή πρόκλησης με πολύ λοιμογόνα στελέχη. Ωστόσο, κανένα απ’ αυτά τα εμβόλια δεν ήταν ικανό να εμποδίσει πλήρως τη μόλυνση από το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική μόλυνση και το οποίο μπορεί να εγκαταστήσει λανθάνουσα μόλυνση και να επανενεργοποιηθεί κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες. Γι αυτό το λόγο αναπτύχθηκαν νέοι τύποι εμβολίων και πρωτόκολλα για τη βελτίωση της προβληματικής έκκρισης και επανέκκρισης του ιού.

Αμφιλεγόμενα είναι και τα αποτελέσματα που λήφθηκαν όταν εξετάστηκαν οι δύο τύποι του ίδιου ιχνηθετημένου εμβολίου (νεκρό και εξασθενημένο ζωντανό). Όταν χορηγήθηκαν δύο φορές σε οροαρνητικά βοοειδή, το εξασθενημένο εμβόλιο παρείχε καλύτερη προστασία από τον ιό σε σχέση με το νεκρό εμβόλιο, κατά την πειραματική μόλυνση. Αντίθετα, το νεκρό εμβόλιο ήταν πιο αποτελεσματικό στη μείωση της έκκρισης του ιού μετά την επανενεργοποίηση μόσχων με λανθάνουσα μόλυνση (Bosch *et al.*, 1997).

Μία ενδιαφέρουσα προσέγγιση αφορά στη συνδυαστική χρήση του εξασθενημένου εμβολίου για την αρχική χορήγηση και του νεκρού εμβολίου για την ενίσχυση και την ολοκλήρωση του αρχικού εμβολιασμού. Αυτό το πρωτόκολλο βρέθηκε να είναι το πιο αποτελεσματικό για τη μείωση έκκρισης του ιού μετά από πειραματική μόλυνση (Muylkens *et al.*, 2007). Όπως προαναφέρθηκε η ανοσολογική κατάσταση ενός λανθάνοντα φορέα είναι ο κύριος ρυθμιστικός παράγοντας για την επανέκκριση του ιού κάτω από συνθήκες πειραματικής μόλυνσης. Γι' αυτό το λόγο το πρωτόκολλο που ακολουθείται στους φορείς θα πρέπει να περιλαμβάνει επαναληπτικές δόσεις κάθε 6 μήνες, έτσι ώστε να μειωθεί -κατά το δυνατό- ο κίνδυνος επανέκκρισης του ιού.

2.13.3 ΤΥΠΟΙ ΕΜΒΟΛΙΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥΣ

ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΑ ΕΜΒΟΛΙΑ

Πίνακας 2.13.3.1 Εμβολιακό πρόγραμμα για ζώα μικρότερα των 3 μηνών.

Επιλογές	Ηλικία εβδομάδων ²	Ηλικία: 3-4 μηνών	Κάθε 6 μήνες
1 ^η	Ζωντανό ιχνηθετημένο εμβόλιο ενδορινικά (in)	Ζωντανό ιχνηθετημένο εμβόλιο ενδορινικά (in) ή ενδομυϊκά (im).	Ζωντανό ιχνηθετημένο εμβόλιο ενδορινικά (in) ή ενδομυϊκά (im).
2 ^η	Ζωντανό ιχνηθετημένο εμβόλιο ενδορινικά (in)	Ζωντανό ιχνηθετημένο εμβόλιο ενδορινικά (in) ή ενδομυϊκά (im).	Ζωντανό ιχνηθετημένο εμβόλιο ενδορινικά (in) ή ενδομυϊκά (im).

Πίνακας 2.13.3.2 Εμβολιακό πρόγραμμα για ζώα μεγαλύτερα των 3 μηνών.

Επιλογές	Ηλικία 3 μηνών	Ηλικία: 4 μηνών	Κάθε 6 μήνες
1 ^η	Ζωντανό ιχνηθετημένο εμβόλιο ενδορινικά (in) ή ενδομυϊκά (im).	-	Ζωντανό ιχνηθετημένο εμβόλιο ενδορινικά (in) ή ενδομυϊκά (im).
2 ^η	Ζωντανό ιχνηθετημένο εμβόλιο ενδορινικά (in) ή ενδομυϊκά (im).	-	Αδρανοποιημένο ιχνηθετημένο εμβόλιο ενδομυϊκά (im).
3 ^η	Αδρανοποιημένο ιχνηθετημένο εμβόλιο ενδομυϊκά (im).	Αδρανοποιημένο ιχνηθετημένο εμβόλιο ενδομυϊκά (im).	Αδρανοποιημένο ιχνηθετημένο εμβόλιο ενδομυϊκά (im).

Εικόνα 2.13.3.1. Ενδορινική χορήγηση ζωντανού εμβολίου.
<http://www.cattlebreeders.org.uk/newsletter/issues/2009spring/index.php5>
(Προσπελάστηκε στις 19/1/2010).



ΣΥΜΒΑΤΙΚΑ ΕΜΒΟΛΙΑ

Αδρανοποιημένα-Ζωντανά:

Τα εμβόλια αυτά συνήθως είναι πολυδύναμα και χρησιμοποιούνται για την προφύλαξη των ζώων από περισσότερους του ενός λοιμογόνους παράγοντες. Έτσι, τα εμβόλια για την IBR προστατεύουν ταυτόχρονα από τον ιό που προκαλεί την ιογενή διάρροια των βοοειδών (Bovine Viral Diarrhea ,BVD), την παραγρίπη -3 των μόσχων (ParaInfluenza-3, PI3) και την πνευμονία που οφείλεται στον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό των βοοειδών (Bovine Respiratory Syncytial Virus, BRSV) που αποτελούν τα κύρια αίτια του αναπνευστικού συνδρόμου των μόσχων (shipping fever). Τα αδρανοποιημένα εμβόλια διατίθενται σε υγρή μορφή, ενώ τα ζωντανά σε λυόφιλο μορφή και απαιτείται η ανασύστασή τους με τον ειδικό διαλύτη. Η καλύτερη θερμοκρασία χορήγησης τόσο των αδρανοποιημένων όσο και των ζωντανών εμβολίων είναι μεταξύ +15 και +25 °C.

Η οδός χορήγησης είναι είτε ενδομυϊκά (IM) στους μυς του τραχήλου είτε υποδόρια (SC) στη λαμυρίδα και η δόση είναι 3 ml ανά ζώο ανεξάρτητα από την ηλικία και το σωματικό βάρος. Μπορεί να χορηγηθεί οποιαδήποτε στιγμή κατά την κυοφορία ή την περίοδο γαλακτοπαραγωγής.

Παρενέργειες: Μπορεί να παρατηρηθεί σποραδικά αναφυλακτική αντίδραση σε μερικά ευαίσθητα ζώα. Σε αυτές τις περιπτώσεις συνιστάται η χορήγηση αντιϊσταμινικού.

Μόσχοι: Χορήγηση μίας δόσης εμβολίου και επανάληψη σε 21 με 30 ημέρες, ιδιαίτερα όταν εμβολιάζονται μόσχοι πολύ μικρής ηλικίας. Ετήσιος αναμνηστικός εμβολιασμός.

Μοσχίδες: Χορήγηση μίας δόσης εμβολίου και επανάληψη σε 21 με 30 ημέρες, ένα μήνα πριν την οχεία ή τη γονιμοποίηση του ζώου. Ετήσιος αναμνηστικός εμβολιασμός.

Αγελάδες: Χορήγηση μίας δόσης εμβολίου και επανάληψη σε 21 με 30 ημέρες. Ετήσιος αναμνηστικός εμβολιασμός.

Περίοδος αναμονής: 0 ημέρες.

2.14.ΕΚΡΙΖΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Ο σκοπός ενός επιτυχούς ελέγχου θα πρέπει να είναι η εκρίζωση του ιού και της λανθάνουσας μόλυνσης και όχι μόνο η καταπολέμηση της λοίμωξης και η εμφάνιση

των κλινικών εκδηλώσεών της. Συνεπώς, θα πρέπει να επιτευχθεί «απαλλαγή» από τον ιό. Ένα απαραίτητο στοιχείο για τον έλεγχο της νόσου είναι η εφαρμογή μέτρων, τα οποία εμποδίζουν τη μετάδοση του ιού, δηλαδή τη διακοπή του κύκλου προσβολής. Τα λαμβανόμενα μέτρα αποσκοπούν στη μείωση των παραγόντων που συντελούν στην αύξηση του επιπέδου της μόλυνσης σε μία εκτροφή και συνίστανται στα εξής:

1. Βελτίωση των συνθηκών εκτροφής. Ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας κινδύνου είναι η μεγάλη πυκνότητα ζώων σε μία εκτροφή καθώς έτσι διευκολύνεται η μετάδοση του ιού μεταξύ των ζώων, ενώ αυξάνονται οι πιθανότητες για επαναμόλυνση (Van Shaik *et al.*, 2002).
2. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στις περιπτώσεις όπου υπάρχει άμεση επαφή μεταξύ των ζώων, όπως στις αγοραπωλησίες, στις εκθέσεις ζώων καθώς και σε ζώα που δραπετεύουν και αναμειγνύονται με άλλα από άλλες ομάδες ή εκτροφές.
3. Ένα κλειστό σύστημα εκτροφής ζώων ενισχύει την αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων εκρίζωσης καθώς οι πιθανότητες για την είσοδο ή την επανείσοδο ενός λοιμώδους νοσήματος σε μία τέτοια εκτροφή μειώνονται σημαντικά. Η αποδοτικότητα ενός τέτοιου μέτρου είναι μεγαλύτερη σε εκτροφές στις οποίες είναι πιο πιθανό να εισέλθουν περισσότεροι του ενός λοιμογόνι παράγοντες αλλά μειώνεται στις εκτροφές όπου δεν υπάρχει δυνατότητα για την εκτροφή μοσχίδων αντικατάστασης ή στην περίπτωση όπου οι βοσκότοποι της εκτροφής γειτνιάζουν με βοσκοτόπους άλλων εκτροφών (Van Shaik *et al.*, 1999).
4. Επιπλέον, η χρήση κατάλληλης προστατευτικής ένδυσης μέσα στην εκτροφή είναι ένα σημαντικό προληπτικό μέτρο.
5. Στις περισσότερες χώρες όπου εφαρμόζονται στρατηγικές εκρίζωσης της Α.Ρ.Β γίνεται μηνιαίος έλεγχος των εκτροφών με ορολογική εξέταση σε μεγάλες ποσότητες γάλατος (δεξαμενές γάλακτος) από όλα τα ζώα μιας εκτροφής. Επιπλέον, γίνεται εξαμηνιαίος ορολογικός έλεγχος σε δείγματα αίματος (Van Shaik *et al.*, 1999, 2002; Hage *et al.*, 1999; Vonk Noordegraaf *et al.*, 2000; Ackermann *et al.*, 2006). Όσον αφορά τον έλεγχο του γάλακτος είναι πιθανόν ένα μικρό μέρος των οροθετικών ζώων να μην ανιχνευτεί. Μόνο οι πολύ μαζικές εξάρσεις της νόσου ανιχνεύονται με την εξέταση σε μαζικά δείγματα γάλακτος. Ο μηνιαίος έλεγχος του γάλακτος μειώνει την πιθανότητα μετάδοσης του ιού σε μία εκτροφή από 42 έως 76 % (Vonk Noordegraaf *et al.*, 2000).
6. Μετά την ανίχνευση οροθετικών ζώων σε μία εκτροφή υπάρχουν τρεις επιλογές. Κατά την πρώτη επιλογή όλα τα ζώα ελέγχονται ορολογικά, απαγορεύονται οι μετακινήσεις από και προς την εκτροφή και λαμβάνονται πρόσθετα μέτρα υγιεινής για να μειωθεί η μετάδοση του ιού. Σε περίπτωση που το ξέσπασμα είναι μικρής έκτασης,

απομακρύνονται οι λανθάνοντες φορείς του ιού. Η θανάτωση των ζώων (stamping out) δε συνιστάται σε αυτές τις περιπτώσεις. Εξάλλου όταν η παρουσία αντισωμάτων είναι μικρή, η οροθετικότητα σε μία εκτροφή θα φθίνει φυσιολογικά με την εισαγωγή των ζώων αντικατάστασης. Απαγορεύεται η μετακίνηση ζώων ενώ τίθενται υπό επιτήρηση και οι εκτροφές σε ακτίνα 1 km για 4 εβδομάδες. Η δεύτερη επιλογή περιλαμβάνει την απομάκρυνση των οροθετικών ζώων, αφού περάσουν 4 εβδομάδες από την περίοδο εξάπλωσης του ιού μέσα στην εκτροφή. Τέλος, η στρατηγική του εξαμηνιαίου εμβολιασμού των οροθετικών ζώων μειώνει τα ποσοστά αποβολών και υπογονιμότητας, το διάστημα απέκκρισης του ιού από τα μολυσμένα ζώα και τέλος μειώνει την πιθανότητα ένας λανθάνων φορέας να μεταδίδει τον ιό μετά την επανεργοποίησή του.

Πίνακας 2.14.1 Κατάσταση ορισμένων χωρών της Ε.Ε σε σχέση με την IBR (Ackermann *et al.*, 2006).

Χώρα	Κατάσταση Λ.Ρ.Β πριν την εκστρατεία	Απαλλαγμέ-νες από Λ.Ρ.Β	Παρατηρείται	Εμβολιασμός	Stamping out	Επιτήρηση
Αυστρία	0,58 % (1990)	NAI	NAI	Απαγορεύεται	NAI	NAI
Δανία	Χαμηλό (1984)	NAI	NAI	Απαγορεύεται	Τροποποιημένο	NAI
Φινλανδία	14 περιστατικά	NAI	NAI	Απαγορεύεται	Τροποποιημένο	NAI
Νορβηγία	Χαμηλό	NAI	NAI			NAI
Σουηδία	Χαμηλό	NAI	NAI	Απαγορεύεται	Τροποποιημένο	NAI
Ελβετία	0,5-10 % (1983)	NAI	NAI	Απαγορεύεται	NAI	NAI
Βέλγιο	62-65 %	OXI	OXI	Ιχνηθετημένα εμβόλια	OXI	OXI
Γαλλία	Ποικίλλει	OXI	OXI	NAI	OXI	OXI
Γερμανία	Ποικίλλει	OXI	NAI	NAI	Τροποποιημένο	NAI
Ουγγαρία	13-79 %	OXI		NAI		NAI

Ιρλανδία	Δεν υπάρχουν στοιχεία	OXI	OXI		NAI
Ιταλία	62-85 %	OXI	NAI	Προγραμματίζεται	NAI
Λιθουανία	17 %	OXI	NAI		NAI
Λουξεμβούργο	Δεν υπάρχουν στοιχεία	OXI	NAI	NAI	NAI
Πολωνία	20-38 %	OXI	NAI	Απαγορεύεται	Τροποποιημένο
Πορτογαλία	Δεν υπάρχουν στοιχεία	OXI		NAI	
Σκωτία	12 %	OXI			
Ισπανία	Υψηλό	OXI		NAI	NAI
Ολλανδία	40% στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής	OXI		Ιχνηθετημένα εμβόλια	Τροποποιημένο
Ηνωμένο Βασίλειο	2.1 % (1964), 10.2 % (1986)			NAI	NAI

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ Λ.Ρ.Β ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ.

Στη χώρα μας το σύνολο των εκτρεφόμενων αγελάδων για γαλακτοπαραγωγή είναι περίπου 220.000 σε συστηματικές εκτροφές (στοιχεία Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2009). Βασικό στοιχείο της παραγωγικής διαδικασίας εκτός από το γάλα είναι η παραγωγή μόσχων. Αναφέρεται από πρόσφατες μελέτες ότι ο αριθμός των μόσχων που απογαλακτίζονται από μία αγελάδα κατά τη διάρκεια της ζωής της στις ελληνικές εκτροφές είναι κατά μέσο όρο 2.7 (Γεωργούδης, 2010), ενώ στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες ο αριθμός αυτός είναι μεγαλύτερος του (5).

Από πλευράς υγείας αγελάδων - ταύρων, τα σημαντικότερα λοιμώδη αίτια που προκαλούν υπογονιμότητα και μείωση των αποδόσεων είναι τα δύο κυριότερα ιογενή νοσήματα η Λ.Ρ.Β και η ιογενής διάρροια - νόσος των βλεννογόνων των βοοειδών (Bovine Viral Diarrhea-BVD, mucosal disease - MD). Τα νοσήματα αυτά υπάρχουν και δεν λαμβάνεται μέριμνα για συστηματική αντιμετώπισή τους στη χώρα μας (Ξυλούρη και συν., 2000, 2001).

Έτσι, σε αντίθεση με τις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες, οι οποίες έχουν εφαρμόσει οργανωμένη στρατηγική για την απαλλαγή των εκτροφών τους από τον

BHV-1 και από τις οποίες η Ελλάδα προμηθεύεται μοσχίδες, η χώρα μας δεν έχει κάνει καμία προσπάθεια για απαλλαγή από το νόσημα. Ο μικρός αριθμός των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής της χώρας μας θα μπορούσε πολύ εύκολα να ελεγχθεί.

Αυτό που συνήθως παρατηρείται στις ελληνικές εκτροφές είναι ότι κατά την αγορά και εισαγωγή έγκυων συνήθως μοσχίδων απαλλαγμένων ενδεχομένως από το νόσημα, σε μια εκτροφή που ο ιός BHV-1 ήδη κυκλοφορεί, τα ζώα αυτά μολύνονται. Εξάλλου η εισαγωγή νέων ζώων σε μία εκτροφή αποτελεί από μόνη της έναν παράγοντα καταπόνησης (stress) τόσο των νεοεισερχόμενων ζώων όσο και των ζώων της εκτροφής και έχει ως επακόλουθο τα ζώα - φορείς του ιού BHV-1, να απεκκρίνουν τον ιό και να μολύνουν τα νεοεισερχόμενα ζώα.

Ανάλογα με την κατάσταση υγείας του (καταπόνηση, συνύπαρξη άλλων παθογόνων παραγόντων) το νεοεισερχόμενο ζώο θα εκδηλώσει ή όχι συμπτώματα της νόσου. Υπάρχουν λοιπόν οι παρακάτω πιθανότητες (εν αγνοία του παραγωγού, αφού δεν κάνει συστηματικό έλεγχο νοσημάτων στην εκτροφή του):

ΤΑ ΝΕΟΕΙΣΕΡΧΟΜΕΝΑ ΖΩΑ ΝΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΛΛΑΓΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΟΝ ΙΟ ΚΑΙ Η ΕΚΤΡΟΦΗ ΥΠΟΔΟΧΗΣ ΝΑ ΕΙΝΑΙ ΘΕΤΙΚΗ

- Να εμφανίσουν τα νεοεισερχόμενα ζώα άμεσα συμπτώματα, όταν τα ήδη υπάρχοντα ζώα δεν εμφάνιζαν κανένα σύμπτωμα. Στη περίπτωση αυτή ο παραγωγός θεωρεί ότι τα νεοεισερχόμενα ήταν μολυσμένα.

- Να μην εμφανίσουν τα νεοεισερχόμενα ζώα καθόλου συμπτώματα αλλά να μολυνθούν οι νεογέννητοι μόσχοι και να εκδηλώσουν συμπτώματα οφειλόμενα στην πολυσυστηματική μορφή της νόσου. Σε αυτή την περίπτωση η συμπτωματολογία προέρχεται και από συστήματα εκτός του αναπνευστικού, όπως από το πεπτικό και το νευρικό σύστημα, προκαλώντας σύγχυση στον παραγωγό για την υγιεινή κατάσταση των ζώων που εισήγαγε.

Έτσι, εκείνο που αντιλαμβάνεται ο Έλληνας παραγωγός είναι να αναζωπυρώνεται το νόσημα (που αγνοούσε ότι υπήρχε στην εκτροφή του) λίγους μήνες μετά από την εισαγωγή νέων ζώων. Ενδεχομένως όμως να μην συμβαίνει αυτό και ο παραγωγός μη ζητώντας τη βοήθεια ειδικών για τη διερεύνηση της ύπαρξης της νόσου από πιο παλιά στην εκτροφή του με τη διενέργεια εργαστηριακών εξετάσεων, δεν λαμβάνει μέτρα μείωσης της μόλυνσης από τον BHV-1, ούτε μέτρα πρόληψης για την αποτροπή εισόδου του ιού στην εκτροφή του και μακροπρόθεσμα απαλλαγής της από τον BHV-1.

ΤΑ ΝΕΟΕΙΣΕΡΧΟΜΕΝΑ ΖΩΑ ΝΑ ΜΗΝ ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΛΛΑΓΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΟΝ ΙΟ

Στην περίπτωση αυτή δεν θα υπάρξει μεγάλη αλλαγή στη συμπτωματολογία και στην παραγωγικότητα των αγελάδων της εκτροφής, οπότε δεν θα υπάρχει εμφανές πρόβλημα υγείας και άρα ανησυχίας του παραγωγού. Το μόνο που θα συνεχίσει να υφίσταται είναι το νόσημα στην εκτροφή το οποίο θα δημιουργεί σταθερά και επίμονα χρόνια προβλήματα σε ενήλικα και ανήλικα ζώα.

Όλα τα παραπάνω σε συνδυασμό με την απουσία κρατικού προγραμματισμού συστηματικού ελέγχου των νοσημάτων των βοοειδών ελληνικών εκτροφών ενδεχομένως ευθύνονται για τη σημαντική μείωση των αποδόσεων των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων σε γάλα και μόσχους.

Κατά την παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η ορολογική κατάσταση (της IBR) των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής στο μεγαλύτερο τμήμα της ελληνικής περιφέρειας. Η προσπάθεια όμως αυτή πρέπει να συνεχιστεί για τη διερεύνηση τόσο της ύπαρξης ιογενούς διάρροιας όσο και για τον έλεγχο άλλων λοιμωδών παραγόντων, με στόχο την εκτίμηση του επιπέδου της υγιεινής κατάστασης των εκτροφών. Κάτι τέτοιο αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο του σχεδιασμού και της εφαρμογής των ενδεικνυόμενων - για τη χώρα μας - μέτρων πρόληψης νοσημάτων και αύξησης των αποδόσεων των ζώων. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί βελτίωση ενός σημαντικού παραγωγικού κλάδου για την οικονομία της Ελλάδας όπως είναι η αγελαδοτροφία.

3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η ανίχνευση αντισωμάτων κατά του Βόειου Ερπητοϊού-1 (BHV-1) σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Ο ιός προκαλεί διάφορες νόσους με πιο σοβαρή τη Λοιμώδη Ρινοτραχειίτιδα των Βοοειδών. Με τη μελέτη αυτή διερευνήθηκε σε αντιπροσωπευτικό δείγμα του ζωικού πληθυσμού των βοοειδών και της κατανομής του στην Ελλάδα, το επίπεδο μόλυνσης των εκτροφών αγελάδων γαλακτοπαραγωγής σε σχέση με τον BHV-1 και η επιζωοτιολογική έκταση της μόλυνσης από τον ιό. Από παλαιότερη προκαταρκτική διερεύνηση είχε προκύψει το πρόβλημα του BHV-1 και η παρούσα έρευνα αποσκοπεί στο να το αναδείξει και να προτείνει λύσεις για τον έλεγχο του στην Ελληνική αγελαδοτροφία (Ξυλούρη και συν., 2000, 2001).

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

3.1.2 ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

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

Ο καθορισμός του μεγέθους του δείγματος έγινε με βάση μελέτες που αφορούσαν την οροθετικότητα σε σχέση με τον BHV-1 σε γειτονικές χώρες της Ελλάδας (Yeşilbaş *et al.*, 2008; Gungor *et al.*, 2007; Biuk-Rudan *et al.*, 1999), οπότε λαμβάνοντας ως βάση ένα υποθετικό-αναμενόμενο ποσοστό και στην Ελλάδα υπολογίστηκε με μικρό περιθώριο σφάλματος, το μέγεθος του δείγματος. Έτσι, με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου Statgraphics Plus 4.0 λήφθηκε ως αρχική υποθετική οροθετικότητα στην Ελλάδα ένα ποσοστό της τάξης του 40 %. Για να είναι ασφαλής και αντιπροσωπευτικός ο δειγματοληπτικός έλεγχος σε επίπεδο σημαντικότητας 5 %, με περιθώριο απόλυτου σφάλματος ± 5 ποσοστιαίες μονάδες, θα έπρεπε να εξεταστούν 369 δείγματα. Στην παρούσα έρευνα για να μειωθεί το περιθώριο σφάλματος περισσότερο (± 4 ποσοστιαίες μονάδες) εξετάστηκαν 550 δείγματα. Ο πληθυσμός των ζώων που εξετάστηκαν θεωρήθηκε ενιαίος ανά

γεωγραφικό διαμέρισμα και από κάθε εκτροφή εξετάστηκε τουλάχιστον το 10 % των ζώων. Η επιλογή των εκτροφών κρίθηκε σε μεγάλο βαθμό από τη συναίνεση των παραγωγών.

Κατά τον σχεδιασμό του πρωτοκόλλου της δειγματοληψίας για τη συγκεκριμένη έρευνα, αποφασίστηκε η λήψη δειγμάτων τόσο από μη εμβολιασμένα όσο και από εμβολιασμένα, κατά του BHV-1, ζώα με στόχο πιο ολοκληρωμένα συμπεράσματα.

Εικόνα 3.1.2.1 Δίκτυο δειγματοληψίας.



3.1.3 Συλλογή δειγμάτων

Η συλλογή δειγμάτων αίματος έγινε από εκτροφές αγελάδων γαλακτοπαραγωγής το καλοκαίρι του 2009. Συνολικά συλλέχθηκαν 550 δείγματα αίματος, εκ των οποίων τα 97 προέρχονταν από εμβολιασμένα έναντι της IBR ζώα. Για τα 66 από αυτά είχαν χρησιμοποιηθεί συμβατικά εμβόλια ενώ για τα υπόλοιπα (31) ιχνηθετημένα εμβόλια (απουσία της γλυκοπρωτεΐνης E).

Η λήψη αίματος έγινε από την κοκκυγική φλέβα και χρησιμοποιήθηκαν φιαλίδια τύπου Vacutainer, χωρίς αντιπηκτικό και βελόνες μίας χρήσης διαμέτρου 18 G. Τα φιαλίδια τοποθετούνταν μέσα σε ισοθερμικά κιβώτια με κατεψυγμένες παγοκύστεις, ώστε να βρίσκονται σε άμεση επαφή με αυτές και να διατηρείται χαμηλή η θερμοκρασία των αιμοδειγμάτων. Στη συνέχεια τα δείγματα παρέμειναν μέσα σε αυτά τα κιβώτια, το πολύ 18 ώρες, μέχρι να προσκομιστούν στο εργαστήριο. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές/ λεπτό (rpm) για 20 λεπτά για το διαχωρισμό του ορού (Fonss & Munksgaard, 2008). Ο ορός κάθε αιμοδείγματος μοιράζονταν σε 3 φιαλίδια τύπου Eppendorf και καταψύχονταν στους -20°C μέχρι την εξέτασή του για προσδιορισμό αντισωμάτων με ELISA.

Για την εξέταση των ορών χρησιμοποιήθηκε η ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA, η οποία έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, του Τμήματος Επιστήμης Ζωϊκής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Στην παρούσα εργασία, η ELISA εφαρμόστηκε για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων κατά της gE του βόειου ερπητοϊού1 (BHV-1) στους ορούς αίματος των ζώων που εξετάστηκαν.

3.1.4. Συλλογή επιζωοτιολογικών στοιχείων – δεδομένων υγιεινής εκτροφής

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

3.2 ANIXNEYΣΗ ANTIΣΩΜΑΤΩΝ

Η διαγνωστική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ELISA (εμπορικό kit IDEXX: HerdChek Anti-IBR gE). Πρόκειται για μία ενζυμική μέθοδο για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της gE, του ιού - αντιγόνου BHV-1, στον ορό ή το πλάσμα του αίματος ή σε δείγματα γάλακτος. Η παρουσία αντισωμάτων φανερώνει φυσική μόλυνση ή/και εμβολιασμό με συμβατικό εμβόλιο που περιέχει (gE+) αντιγόνο.

Η διαγνωστική αυτή μέθοδος χρησιμοποιείται σε προγράμματα ελέγχου και εκκρίωσης του BHV-1. Όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την εφαρμογή gE-«ιχνηθετημένων» εμβολίων μπορεί να αποτελέσει μία αποτελεσματική μέθοδο διαφοροποίησης των φυσικώς μολυσμένων από τα εμβολιασμένα ζώα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην απουσία από τα παραπάνω εμβόλια της γλυκοπρωτεΐνης E του ιού. Η γλυκοπρωτεΐνη αυτή είναι μικρής σημασίας για την προστασία έναντι της προσβολής, από τον ιό αλλά βρίσκεται σε όλα τα στελέχη του ιού.

Καθώς η μέθοδος αυτή ανιχνεύει συγκεκριμένα τα αντισώματα έναντι αυτής της γλυκοπρωτεΐνης, δεν αντιδρά με αντισώματα δειγμάτων που προέρχονται από ζώα εμβολιασμένα με gE αρνητικά εμβόλια, αλλά ανιχνεύει τη φυσική μόλυνση ή τον εμβολιασμό με συμβατικά εμβόλια.

3.2.1 Περιγραφή της διαγνωστικής τεχνικής

Το εμπορικό kit περιλαμβάνει:

- Μία πλάκα πολυστυρενίου με 96 βοθρία, τα οποία είναι επιστρωμένα με τη γλυκοπρωτεΐνη E του ιού BHV-1 Αυτή λειτουργεί ως το αντιγόνο κατά του οποίου θα ανιχνευτούν αντισώματα.
- Αντισώματα κατά της gE του ιού σε HRPO (Horseradish Peroxidase) σύμπλεγμα. Πρόκειται για διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα με σταθεροποιητές πρωτεϊνών.
- Αρνητικό μάρτυρα: Βόειος ορός αίματος συντηρημένος σε θειούχο αζίδιο.
- BHV-1 θετικό μάρτυρα: Αντί-BHV-1gE ορός αίματος συντηρημένος σε θειούχο αζίδιο.
- Αραιωτικό δείγματος: Ρυθμιστικό διάλυμα με σταθεροποιητές πρωτεϊνών συντηρημένο με γενταμυκίνη.

- Διάλυμα έκπλυσης. Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα συντηρημένο με γενταμυκίνη.
- TMB χρωμογόνο υπόστρωμα, το οποίο καταλύει την αντίδραση της ένωσης αντιγόνου της πλάκας - αντισώματος (του δείγματος ή του συμπλέγματος που προστίθεται).
- Διάλυμα διακοπής της αντίδρασης μεταξύ του TMB υποστρώματος και του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος (stop solution).

3.2.2 Διαδικασία

Προετοιμασία των δειγμάτων :

Αραίωση ½ των προς εξέταση ορών και των ορών- μαρτύρων με το ειδικό αραιωτικό διάλυμα.

1ο Στάδιο:

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

Ακολουθεί παραμονή των δειγμάτων στην πλάκα για 18-24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (20-25° C) ώστε να πραγματοποιηθεί σύζευξη των αντισωμάτων των μαρτύρων και των εξεταζόμενων δειγμάτων με το αντιγόνο των βοθρίων της πλάκας.

Κατά τη φάση της πρώτης επώασης τα αντισώματα κατά του BHV-1 που υπάρχουν στα εξεταζόμενα δείγματα, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που παράγονται έναντι της gE του ιού, αντιδρούν με το αντιγόνο της πλάκας.

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

2ο Στάδιο:

Ακολουθεί η προσθήκη του συμπλέγματος του ειδικού αντί-BHV-1 gE μονοκλωνικού αντισώματος, το οποίο θα ανταγωνιστεί με αυτά των εξεταζόμενων ορών αίματος, για τη δέσμευση κάποιων επιτόπων της gE του ιού κατά τη διάρκεια μιας δεύτερης επώασης.

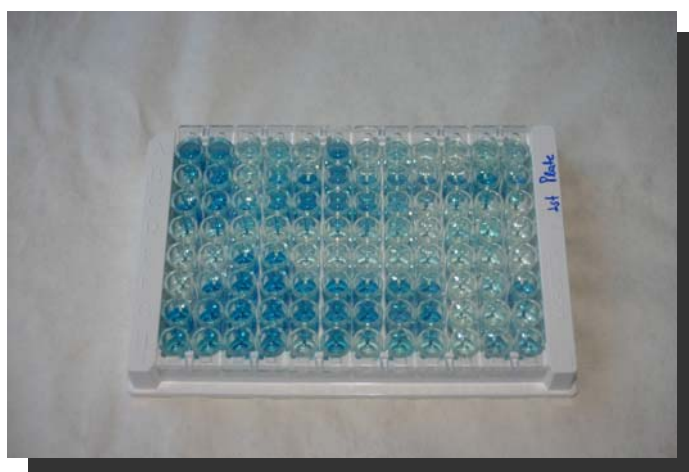
Αν δεν υπάρχουν αντισώματα gE στα εξεταζόμενα δείγματα, τότε τα gE αντισώματα του συμπλέγματος που προστίθεται, είναι ελεύθερα να αντιδράσουν με

το gE αντιγόνο. Αν αντιθέτως υπάρχουν gE αντισώματα στα δείγματα, τότε τα αντισώματα του συμπλέγματος εξουδετερώνονται και δεν αντιδρούν με το αντιγόνο της πλάκας.

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

3ο Στάδιο:

Προστίθεται στα βοθρία της πλάκας ένα διάλυμα χρωμογόνου υποστρώματος. Αυτό συνδέεται με τα σύμπλοκα gE-αντί-gE αντισωμάτων του συμπλέγματος που προστέθηκε και ειδικότερα με το ένζυμο με το οποίο είναι συνδεδεμένα τα αντισώματα του συμπλέγματος και αναπτύσσεται κυανός χρωματισμός. Τα αντισώματα των εξεταζόμενων δειγμάτων δεν αντιδρούν με το χρωμογόνο υπόστρωμα TMB. Συνεπώς, ο χρωματισμός είναι αντιστρόφως ανάλογος της ποσότητας των αντισωμάτων του δείγματος που δεσμεύτηκαν. Όσο πιο πολλά αντισώματα περιέχονται στο εξεταζόμενο δείγμα τόσο πιο ασθενής χρωματισμός αναπτύσσεται στα αντίστοιχα βοθρία της πλάκας.



Εικόνα 3.2.2.1 Μέθοδος ELISA. Χαρακτηριστικός κυανός χρωματισμός από την αντίδραση TMB υποστρώματος και αντί-gE αντισωμάτων του συμπλέγματος.

4ο Στάδιο:

Προστίθεται ειδικό διάλυμα, το οποίο σταματά την αντίδραση μεταξύ του TMB υποστρώματος και του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος (stop solution).

Τέλος, με τη χρήση φωτόμετρου προσδιορίζεται η απορρόφηση φωτός των μαρτύρων και των δειγμάτων στα 650nm, A(650).

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

$$S/N = A(650)/NC^{-x}$$

Όπου $NC^{-x} = A1(650) + A2(650)/2$, ο μέσος όρος της απορρόφησης του αρνητικού μάρτυρα.

Έτσι όταν $S/N \leq 0.6$ τότε το δείγμα θεωρείται θετικό για την παρουσία ειδικών, έναντι της γλυκοπρωτεΐνης E του BHV-1, αντισωμάτων.

Όταν $0.6 < S/N \leq 0.7$ τότε το δείγμα θεωρείται ύποπτο και συστήνεται η επανάληψη της εξέτασης. Σε περίπτωση που το αποτέλεσμα είναι και πάλι αμφίβολο, τότε συστήνεται η επανάληψη της εξέτασης μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα (6 μήνες).

Τέλος όταν ο λόγος $S/N > 0.7$ τότε το δείγμα θεωρείται αρνητικό για αντισώματα κατά της gE του BHV-1.

Η ποσότητα των αντισωμάτων είναι αντιστρόφως ανάλογη της τιμής A(650) και συνεπώς αντιστρόφως ανάλογη του λόγου S/N.

Η παρουσία αντισωμάτων έναντι της gE του BHV-1 φανερώνει φυσική μόλυνση ή εφαρμογή συμβατικών εμβολίων Ε.Λ.Δ ή αδρανοποιημένων, τα οποία περιέχουν τη γλυκοπρωτεΐνη E του ιού. Η απουσία αντισωμάτων έναντι της gE φανερώνει την εφαρμογή «ιχνηθετημένου» εμβολίου, όταν αυτό έχει εφαρμοσθεί, ή ότι το ζώο δεν έχει υποστεί φυσική μόλυνση.

Τέλος, η παρουσία αντισωμάτων έναντι του BHV-1 αλλά η απουσία αντισωμάτων έναντι της gE του ιού δηλώνει την επιτυχία της εφαρμογής του εμβολιασμού με ιχνηθετημένα εμβόλια.

3.2.3 Στατιστική ανάλυση

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

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τα 550 δείγματα ορού αίματος που εξετάστηκαν συνολικά για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων κατά της γλυκοπρωτεΐνης Ε του ΒΗV-1, τα 366 (66.5%) βρέθηκαν θετικά, τα 167 (30.4 %) αρνητικά και τα 17 (3.1 %) ύποπτα. Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται στο διάγραμμα 3.3.1.

Διάγραμμα 3.3.1. Ποσοστό θετικών, αρνητικών και ύποπτων αποτελεσμάτων από το σύνολο των ζώων που εξετάστηκαν (n=550).

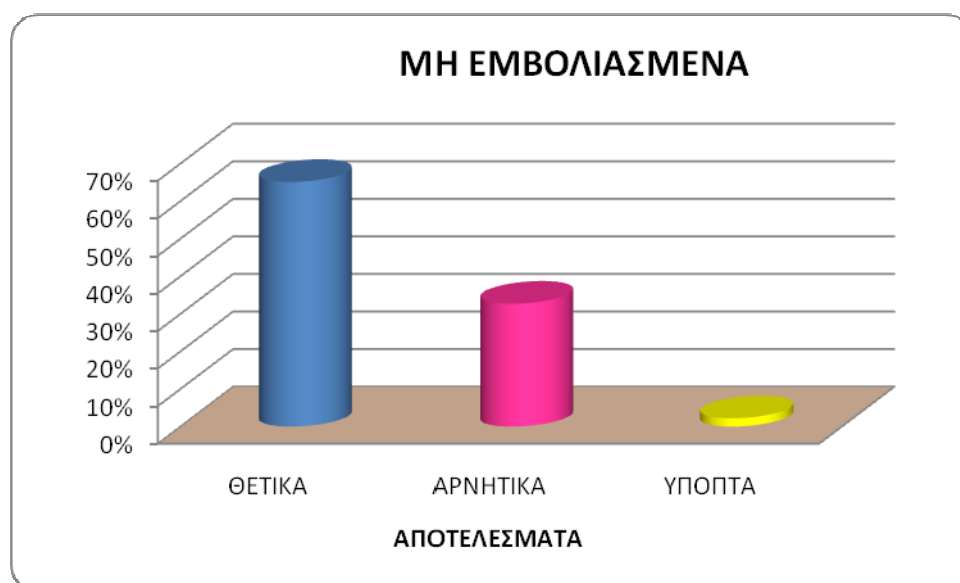


3.3.1. Παρουσία αντισωμάτων στις δύο κύριες κατηγορίες ζώων.

3.3.1.1 Μη εμβολιασμένα ζώα

Από τα 453 ζώα που δεν είχαν εμβολιαστεί κατά του BHV-1 τα 295 (65.1 %) ήταν θετικά, τα 148 (32,7 %) αρνητικά και τα 10 (2.2 %) ύποπτα. Θετικά δείγματα βρέθηκαν σε όλα τα γεωγραφικά διαμερίσματα από τα οποία έγινε δειγματοληψία.

Διάγραμμα 3.3.1.1.1. Ποσοστό % των θετικών των αρνητικών και των ύποπτων στον BHV-1 μη εμβολιασμένων ζώων (n=453)



3.3.1.2 Εμβολιασμένα ζώα.

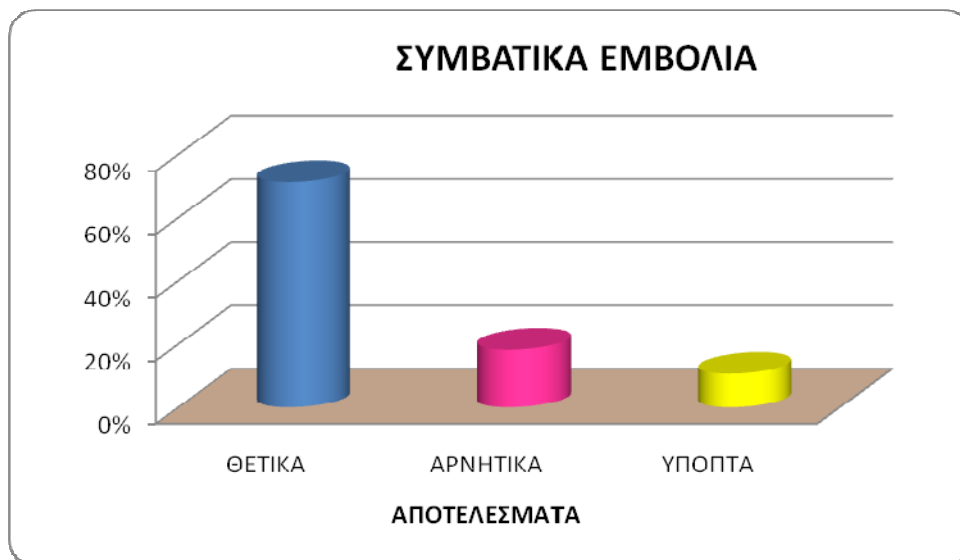
Από τα 97 εμβολιασμένα ζώα τα 71 (73,2 %) είχαν αντισώματα κατά του BHV-1, τα 19 (19,6%) ήταν αρνητικά ενώ τα 7 (7.2 %) ήταν αμφίβολα για την ύπαρξη αντισωμάτων κατά του BHV-1.

Πιο συγκεκριμένα, από τα 97 εμβολιασμένα ζώα τα 66 προέρχονταν από εκτροφές όπου γινόταν χρήση συμβατικών εμβολίων ενώ τα υπόλοιπα 31 από μία εκτροφή στην οποία γινόταν χρήση νεότερης γενιάς ιχνηθετημένου (marker) εμβολίου.

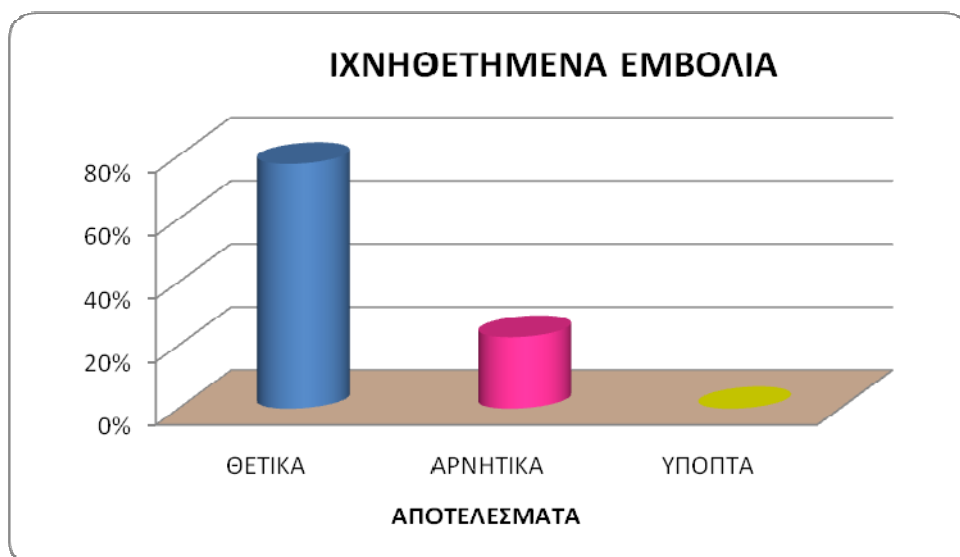
Τα αποτελέσματα στις εκτροφές με τα συμβατικά εμβόλια είναι για τα θετικά 71.2 %, για τα αρνητικά 18.2 % και για τα ύποπτα δείγματα 10.6 %. Τα ποσοστά για τα εμβολιασμένα- με ιχνηθετημένο εμβόλιο- ζώα, διαμορφώνονται ως εξής: 77.4 %

για τα θετικά ζώα, όπου στην προκειμένη περίπτωση το θετικό αποτέλεσμα υποδεικνύει φυσική μόλυνση και 22.6 % το ποσοστό για τα αρνητικά δείγματα.

Διάγραμμα 3.3.1.2.1. Ποσοστά % των θετικών, των αρνητικών και των ύποπτων στον BHV-1 εμβολιασμένων με συμβατικά εμβόλια ζώων.



Διάγραμμα 3.3.1.2.2. Ποσοστά % των θετικών και αρνητικών στον BHV-1 ζώων εμβολιασμένων με ιχνηθετημένα (marker) εμβόλια.



Πίνακας 3.3.1.2.1. Ποσοστά θετικών και αρνητικών δειγμάτων, για αντισώματα κατά της γλυκοπρωτεΐνης E του BHV-1, στις δύο κατηγορίες ζώων που εξετάστηκαν με ELISA.

Κατηγορία	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός θετικών δειγμάτων	Ποσοστό θετικών ζώων* (%)
ΜΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ ΖΩΑ	453	295	65,1 ^a
ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ ΖΩΑ (ΣΥΜΒΑΤΙΚΑ ΕΜΒΟΛΙΑ)	66	47	71.2 ^b
ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ ΖΩΑ (ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΑ ΕΜΒΟΛΙΑ)	31	24	77,4 ^b

*Τα ποσοστά με στατιστικώς σημαντική διαφορά σημειώνονται με διαφορετικούς εκθέτες.

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 3.3.1.2.1 το ποσοστό των θετικών ζώων είναι πιο υψηλό στα εμβολιασμένα ζώα σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα. Βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ εμβολιασμένων και μη ζώων, σε επίπεδο σημαντικότητας 5 % καθώς και συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων εμβολιασμός ή μη των ζώων και παρουσία ή όχι αντισωμάτων κατά του BHV-1.

3.3.2 Μέθοδος γονιμοποίησης και BHV-1.

Στον πίνακα 3.3.2.1 φαίνεται ο αριθμός των θετικών δειγμάτων που προέρχονται από αγελάδες που γονιμοποιήθηκαν με φυσική οχεία και αυτός από αγελάδες στις οποίες εφαρμόστηκε τεχνητή σπερματέγχυση, καθώς και τα αντίστοιχα ποσοστά. Μελετήθηκαν μόνο μη εμβολιασμένα ζώα ενώ από 2 εκτροφές δεν υπήρχαν δεδομένα σχετικά με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο γονιμοποίησης.

Πίνακας 3.3.2.1. Συσχέτιση μεταξύ θετικών και αρνητικών δειγμάτων και χρησιμοποιούμενης μεθόδου γονιμοποίησης.

Κατηγορία	Αριθμός θετικών	Αριθμός αρνητικών	Ποσοστό θετικών * (%)
ΦΥΣΙΚΗ ΟΧΕΙΑ (n=241)	154	87	63,9 ^a
ΤΕΧΝΗΤΗ ΣΠΕΡΜΑΤΕΓΧΥΣΗ (n=139)	118	21	84,9 ^b

p=0.0000123

*Τα ποσοστά με στατιστικώς σημαντική διαφορά σημειώνονται με διαφορετικούς εκθέτες.

Κατά τη στατιστική επεξεργασία των παραπάνω αποτελεσμάτων βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην οροθετικότητα για τον BHV-1 μεταξύ ζώων που γονιμοποιήθηκαν με φυσική οχεία και εκείνων με τεχνητή σπερματέγχυση, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Επίσης, παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων ύπαρξη ή όχι αντισωμάτων κατά του BHV-1 και τρόπου γονιμοποίησης (p=0).

Από τη σύγκριση των ποσοστών βρέθηκε ότι το ποσοστό των οροθετικών ζώων τα οποία γονιμοποιήθηκαν με τεχνητή σπερματέγχυση είναι μεγαλύτερο από εκείνο με φυσική οχεία και μάλιστα η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική σε επίπεδο σημαντικότητας 5% (p=0.0000123).

3.3.3 Παρουσία του BHV-1 σε διάφορες ηλικιακές κατηγορίες.

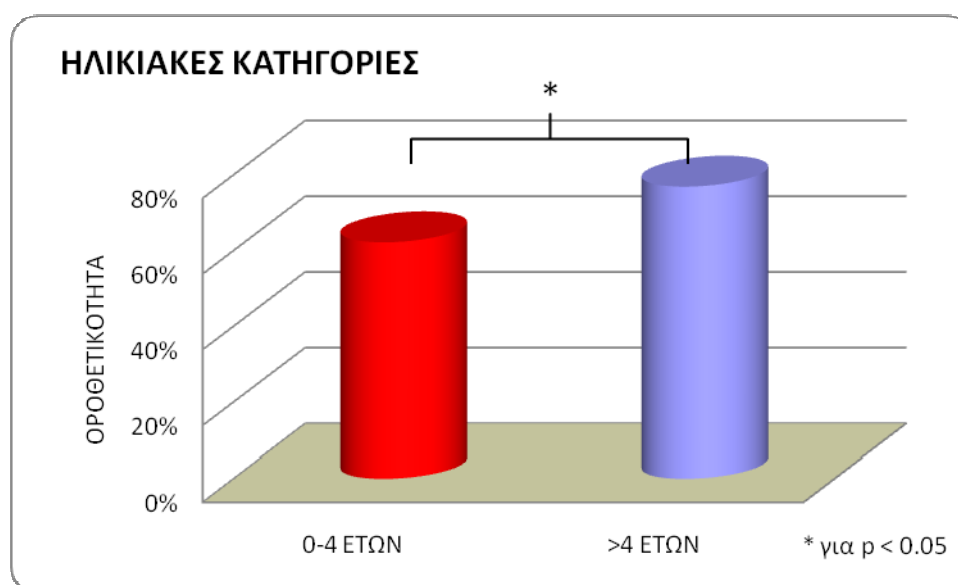
Το ποσοστό των οροθετικών ζώων στις ηλικιακές κατηγορίες έως και 4 ετών και από 4 ετών και άνω είναι 62,2 % και 76,9% αντίστοιχα. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 3.3.3.1.το ποσοστό των ζώων που φέρουν αντισώματα κατά του BHV-1 αυξάνεται με την ηλικία και μάλιστα η αύξηση αυτή είναι στατιστικά σημαντική σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Πίνακας 3.3.3.1. Αποτελέσματα από τη σύγκριση της οροθετικότητας στις δύο ηλικιακές ομάδες.

Ηλικιακή κατηγορία	Αριθμός θετικών	Αριθμός αρνητικών	Ποσοστό θετικών * (%)
0 έως και 4 ετών	69	42	62,2 ^a
> 4 ετών	90	27	76,9 ^b

*Τα ποσοστά με στατιστικώς σημαντική διαφορά σημειώνονται με διαφορετικούς εκθέτες.
P=0.0157

Διάγραμμα 3.3.3.1. Ποσοστά των ζώων που εμφάνισαν θετικό τίτλο αντισωμάτων κατά του BHV-1 στις δύο ηλικιακές κατηγορίες.



3.3.4. Ύπαρξη του BHV-1 στις εκτροφές και εμφάνιση αποβολών.

Από το σύνολο των εκτροφών που χρησιμοποιήθηκαν στη δειγματοληψία μόνο στις 4 αναφέρεται ιστορικό αποβολών. Ωστόσο το γεγονός αυτό είναι υπό αμφισβήτηση καθώς υπάρχει η πιθανότητα σχετικά δεδομένα να μην έγιναν γνωστά, κατά τη συλλογή των πληροφοριών, ενδεχομένως λόγω ενδιασμού των παραγωγών. Εξάλλου είναι πιθανό να έχουν διαφύγει της προσοχής των παραγωγών ή των ζωοκόμων κάποια περιστατικά αποβολών. Επομένως τα παρακάτω αποτελέσματα παρατίθενται υπό τη μορφή παρατήρησης. Τα στοιχεία που συγκεντρώθηκαν για τις αποβολές συνοψίζονται στον πίνακα 3.3.4.1.

Πίνακας 3.3.4.1. Περιστατικά αποβολών σε εμβολιασμένα και μη ζώα

Κατηγορία	Αριθμός ζώων που εκδήλωσαν αποβολές	Συνολικός αριθμός ζώων εκτροφών όπου εκδηλώθηκαν αποβολές	Ποσοστό ζώων που εκδήλωσαν αποβολές. (%)
ΜΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ	60	300	20
ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ	13	270	0,048

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

3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι επιπτώσεις της μόλυνσης των αγελαδοτροφικών εκμεταλλεύσεων από τον BHV-1 είναι κυρίως οικονομικές και οφείλονται στην υπογονιμότητα, στις αποβολές, στην πτώση της γαλακτοπαραγωγής και στη θνησιμότητα στα νεογέννητα, που η μόλυνση από τον ιό συνεπάγεται (Straub, 1990; Van Shaik *et al.*, 1999; Muyllkens *et*

al., 2007). Η Λ.Ρ.Β (IBR) μπορεί να προκαλέσει μεγάλες οικονομικές απώλειες. Σύμφωνα με μελέτη των Van Shaik *et al* (1999), η μόλυνση από τον BHV-1 μπορεί να μειώσει στις εκτροφές γαλακτοπαραγωγών αγελάδων την παραγωγή γάλακτος περίπου 173 λίτρα ανά ζώο ανά γαλακτική περίοδο. Επίσης, αναφέρεται η απώλεια κατά μέσο όρο 0,92 κιλών γάλακτος ανά αγελάδα την ημέρα, για μία περίοδο μελέτης διάρκειας 9 εβδομάδων. Μία τέτοια μείωση στη γαλακτοπαραγωγή έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια κατά μέσο όρο 169 € ανά έξαρση BHV-1 σε μία εκτροφή (Van Shaik *et al.*, 1999).

Η επανείσοδος του ιού σε ευαίσθητους πληθυσμούς βοοειδών μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές εξάρσεις με πολύ δυσμενή οικονομικά αποτελέσματα (Straub, 1990). Έχει βρεθεί ότι η επίδραση μιας επιζωοτίας BHV-1 σε μία εκτροφή μπορεί να διαρκέσει έως 5 εβδομάδες, διάστημα κατά το οποίο όλες οι αγελάδες γίνονται οροθετικές. Η γαλακτοπαραγωγή μειώνεται σημαντικά στα ζώα, τα οποία ήταν στην αρχή οροαρνητικά. Επιπλέον, οι ρυθμοί ανάπτυξης των μοσχίδων αντικατάστασης και των ζώων πάχυνσης μπορεί να μειωθούν σημαντικά (Hage *et al.*, 1998). Τέλος κάποια ζώα πεθαίνουν από τη νόσο με αποτέλεσμα οι οικονομικές απώλειες από μία έξαρση της νόσου σε μία εκτροφή να είναι μεγάλης έκτασης. Ακόμη, σημαντικότερες είναι οι οικονομικές απώλειες που προκύπτουν από τους περιορισμούς στη διακίνηση του ζωικού κεφαλαίου, λόγω της μόλυνσης από τον BHV-1 και της απαγόρευσης εισαγωγής ζώων, σπέρματος και εμβρύων από εκτροφές ή χώρες στις οποίες ο BHV-1 δεν έχει εξαλειφθεί (Vonk Noordegraaf *et al.*, 2000).

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν για πρώτη φορά στον ελληνικό χώρο ότι ένα σημαντικό ποσοστό αγελάδων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης έχει μολυνθεί από τον BHV-1 και φέρει ειδικά αντί-gE αντισώματα. Το ποσοστό αυτό (65,1%) είναι υψηλό σε σχέση με πολλές Ευρωπαϊκές χώρες (Ackermann *et al.*, 2006). Κάτι τέτοιο δικαιολογείται από το γεγονός ότι στην Ελλάδα δεν εφαρμόζονται προγράμματα ελέγχου έναντι της συγκεκριμένης νόσου. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων δεν γίνεται κανένας έλεγχος κατά την εισαγωγή ζώων αλλά και σπέρματος από χώρες του εξωτερικού και ιδιαίτερα από χώρες στις οποίες δε λαμβάνεται κανένα μέτρο ελέγχου του BHV-1.

Σύμφωνα με τα στοιχεία των ερωτηματολογίων που συμπληρώθηκαν, στην πλειοψηφία των εκτροφών που εξετάστηκαν, τα εισαγόμενα ζώα προέρχονται από χώρες της ΕΕ, οι οποίες δεν είναι απαλλαγμένες από τον BHV-1, όπως η Ιταλία, η Ουγγαρία και η Γαλλία (βλ. πίνακα 2.14.1, Ackermann *et al.*, 2006). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι δεν απαιτείται από τη χώρα μας (ως χώρα της ΕΕ) ή έστω μεμονωμένα από τους παραγωγούς, πιστοποίηση ότι τα εισαγόμενα ζώα είναι απαλλαγμένα από τον BHV-1, ευνοεί την εισαγωγή του ιού στις ελληνικές εκτροφές.

Επιπλέον, άξιο προσοχής είναι το γεγονός ότι ανιχνεύτηκαν αντισώματα κατά του BHV-1 σε όλα τα γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδας, από τα οποία έγινε δειγματοληψία. **Τα θετικά δείγματα δεν εντοπίστηκαν σε μεμονωμένες περιοχές, γεγονός που επιβεβαιώνει την ύπαρξη του φυσικού ιού και την κυκλοφορία του στο σύνολο σχεδόν της ελληνικής επικράτειας απ' το οποίο έγινε δειγματοληψία.**

Το γεγονός αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τον επιζωοτιολογικό χαρακτήρα του BHV-1, καθώς ο ιός μπορεί να μεταφερθεί σε τεράστιες αποστάσεις με τις εμπορικές συναλλαγές μολυσμένων αγελάδων, κυοφορουσών μοσχίδων, μολυσμένου σπέρματος, ακόμη και κατά την εμβρυομεταφορά από μολυσμένες αγελάδες - δότριες (Straub, 1990; Vonk Noordegraaf *et al.*, 2000).

Επίσης, για πρώτη φορά γίνεται έλεγχος της ύπαρξης αντισωμάτων σε εμβολιασμένα ζώα με τα ανάλογα συμπεράσματα. Έτσι, το ποσοστό των οροθετικών ζώων στις εκτροφές όπου διενεργούνται εμβολιασμοί κατά του BHV-1 με συμβατικά εμβόλια είναι 71,2 %. Τα αντισώματα που ανιχνεύονται σε αυτή την περίπτωση είναι πιθανότατα εμβολιακής προέλευσης, καθώς τα συγκεκριμένα εμβόλια δεν παρέχουν τη δυνατότητα διαφοροποίησης εμβολιακού στελέχους του ιού από το φυσικό ιό. Ωστόσο, από το ποσοστό των οροθετικών ζώων φαίνεται ότι ο εμβολιασμός είναι επιτυχής σε περίπου 7 από τα 10 ζώα, γεγονός που δημιουργεί αμφιβολίες για τη σωστή εφαρμογή των εμβολιασμών, λαμβάνοντας υπόψη ότι στην πλειονότητα των περιπτώσεων ο εμβολιασμός εκτελείται από τον ίδιο τον κτηνοτρόφο ενώ δεν ακολουθείται πιστά το εμβολιακό πρόγραμμα όπως αυτό συστήνεται από την εταιρεία παρασκευής του εμβολίου. Στην εκτροφή όπου χρησιμοποιήθηκαν τα νεότερης τεχνολογίας ιχνηθετημένα εμβόλια, το ποσοστό των οροθετικών ζώων (77.4 %) αντιστοιχεί στο ποσοστό των ζώων που έχουν μολυνθεί από τον φυσικό ιό, καθώς τα gE αρνητικά εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εκτροφή, σε συνδυασμό με την ειδική μέθοδο ELISA που εφαρμόστηκε για την ανίχνευση των αντισωμάτων, καθιστούν δυνατό το διαχωρισμό εμβολιασμένων - με ιχνηθετημένο εμβόλιο - από τα φυσικώς μολυσμένα ζώα. Ένα σημείο, το οποίο αξίζει περαιτέρω προσοχής είναι το γεγονός ότι στη συγκεκριμένη εκτροφή, όπου γινόταν χρήση ιχνηθετημένου εμβολίου, δεν αναφέρονται αποβολές. Στην περίπτωση, που οι πληροφορίες του ιστορικού της εκτροφής είναι αξιόπιστες, φαίνεται ότι παρόλο που ανιχνεύτηκαν αντισώματα σε ποσοστό 77.4 %.-δηλαδή τα ζώα έχουν μολυνθεί από τον φυσικό ιό, σε αυτό το ποσοστό -αναπτύσσεται ικανοποιητική ανοσία από τη χρήση του εμβολίου, ώστε να μην εκδηλώνονται αποβολές ή άλλα συμπτώματα μόλυνσης από τον BHV-1. Συνεπώς θα μπορούσε να λεχθεί ότι η προστασία που παρέχεται από τα νεότερης τεχνολογίας εμβόλια φαίνεται να είναι επαρκής και το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι αποτελούν ένα από τα απαραίτητα «όπλα» για την εφαρμογή και σωστή λειτουργία ενός προγράμματος εκρίζωσης του BHV-1, τόσο σε επίπεδο εκτροφής όσο και κράτους, καθιστούν εμφανή την αναγκαιότητα χρήσης τους σε επίπεδο ρουτίνας στις ελληνικές εκτροφές.

Ένα άλλο εύρημα το οποίο θα πρέπει να επισημανθεί είναι το ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην οροθετικότητα για τον BHV-1 μεταξύ ζώων που γονιμοποιήθηκαν με φυσική οχεία και ζώων που γονιμοποιήθηκαν με τεχνητή σπερματέγχυση. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό οροθετικότητας στα ζώα που γονιμοποιήθηκαν με τεχνητή σπερματέγχυση σε σχέση με αυτά που γονιμοποιήθηκαν με φυσική οχεία και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($p=0,0000123$). Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στο ότι στο σύνολο των

εκτροφών που εφαρμόζουν την τεχνητή σπερματέγχυση για τη γονιμοποίηση των ζώων τους και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα, δεν χρησιμοποιείται σπέρμα ελεγμένο για τον BHV-1. Ο ιός όπως αναφέρθηκε, μπορεί και εισάγεται στις εκτροφές και μεταδίδεται από ζώο σε ζώο μέσω μολυσμένου σπέρματος (Kupferschmied *et al.*, 1986; Straub, 1990; Van Engelenburg *et al.*, 1993; Wrathall *et al.*, 2006). Οι αγελάδες μολύνονται κατά τη γονιμοποίησή τους και στη συνέχεια μολύνουν η μία την άλλη απεκκρίνοντας τον ιό με τις ρινικές, τις οφθαλμικές και τις εκκρίσεις του γεννητικού τους συστήματος (Yates, 1982; Straub, 1990; Mars *et al.*, 1999; Muyllkens *et al.*, 2007). Έτσι συνεχίζει ο κύκλος της μόλυνσης μέσα στην εκτροφή με επακόλουθο την εκδήλωση νόσου ή την εμφάνιση υπογονιμότητας και αποβολών. Επιπλέον, ένα άλλο γεγονός που θα μπορούσε να δικαιολογήσει το παραπάνω συμπέρασμα είναι ότι ενδεχομένως ο ιός να μεταδίδεται από ζώο σε ζώο (ακόμη κι όταν το σπέρμα είναι ελεγμένο) κατά τη μη σωστή εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης, με τη χρήση των ίδιων εργαλείων από ζώο σε ζώο και τη διάδοση έτσι της μόλυνσης.

Το καθεστώς που έχει αρχίσει εδώ και χρόνια να ισχύει στις περισσότερες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και είναι υποχρεωτικό στις χώρες οι οποίες έχουν απαλλαγεί από τον BHV-1 (πχ σκανδιναβικές χώρες), επιβάλλει το σπέρμα που χρησιμοποιείται στην τεχνητή σπερματέγχυση να είναι απαλλαγμένο από τον BHV-1 και να προέρχεται από οροαρνητικούς ταύρους. Επιπλέον, στα κέντρα τεχνητής σπερματέγχυσης επιβάλλεται οι ταύροι να είναι οροαρνητικοί ενώ απαγορεύεται ο εμβολιασμός τους έναντι του BHV-1 (Kupferschmied *et al.*, 1986; Wrathall *et al.*, 2006). Είναι εμφανής - και από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας- η αναγκαιότητα του ελέγχου του σπέρματος σε επίπεδο ρουτίνας.

Ένα άλλο συμπέρασμα που εξάγεται από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι ότι το ποσοστό των ζώων που φέρει αντισώματα κατά του BHV-1 αυξάνει με την ηλικία και μάλιστα η αύξηση αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι με την αύξηση της ηλικίας ενός ζώου αυξάνονται και οι πιθανότητες το ζώο να έλθει σε επαφή με τον ιό και να μολυνθεί σε περίπτωση, που το νόσημα ενζωτεί στην εκτροφή. Αυτό ισχύει γενικά σε λοιμογόνους παράγοντες, οι οποίοι προκαλούν μόλυνση εφ' όρου ζωής, όπως ο BHV-1 που ανήκει στην οικογένεια των ερπητοϊών. Η μόλυνση ενός ζώου από ερπητοϊό οδηγεί στην εγκατάσταση λανθάνουσας μόλυνσης και στη δημιουργία χρόνιων φορέων, στους οποίους σε καταστάσεις καταπόνησης ο ιός επανενεργοποιείται και απεκκρίνεται στο περιβάλλον. Είναι λογικό στις μεγαλύτερες ηλικίες να παρατηρούνται υψηλότερα ποσοστά οροθετικών ζώων καθώς το πιθανότερο είναι τα ζώα αυτά να είναι χρόνιοι φορείς του BHV-1. Συνεπώς, από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, υποδηλώνεται, ο ενζωτικός χαρακτήρας της νόσου στο σύνολο των συγκεκριμένων εκτροφών (Van Schaik *et al.*, 2002; Boelaert *et al.*, 2005, Ntafis *et al.*, 2007).

Τέλος, όσον αφορά την εκδήλωση αποβολών σε ζώα εμβολιασμένα και μη, όπως προαναφέρθηκε, τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 0,048 % και 20 %. Θα μπορούσε λοιπόν να λεχθεί ότι ο εμβολιασμός των ζώων έναντι του BHV-1 οδηγεί σε πιο ήπια

εκδήλωση της νόσου με μείωση της έντασης των κλινικών εκδηλώσεων καθώς και της συχνότητας των αποβολών, όπως υποστηρίζεται και από τη διεθνή βιβλιογραφία (Yates, 1982; Straub, 1990; Muylkens *et al.*, 2007; Nandi *et al.*, 2009).

3.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

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

Στα παραπάνω φαίνεται να συμβάλουν:

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

Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα:

- Τους ελλειπείς εμβολιασμούς.
- Το σπέρμα για την τεχνητή σπερματέγχυση πιθανόν να μην είναι ελεγμένο, να μην προέρχεται δηλαδή αποκλειστικά από πιστοποιημένα οροαρνητικούς ταύρους, όπως ισχύει σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες.

3.6 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ – ΜΕΤΡΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΝΟΣΗΜΑΤΟΣ

1. Να εκπαιδευτούν (ή / και να εκπαιδεύονται δια βίου) οι παραγωγοί της χώρας για το νόσημα και γενικότερα για τα μέτρα πρόληψης και υγιεινής που πρέπει να λαμβάνονται στις εκτροφές τους.
2. Να ενημερωθούν οι Ενώσεις Παραγωγών Βοοειδών για το νόσημα και τις επιπτώσεις του στην παραγωγή αλλά και για τις οικονομικές επιπτώσεις του εν γένει.

3. Να γίνει ενημέρωση των γαλακτοβιομηχανιών για το νόσημα και την επίπτωσή του στη γαλακτοπαραγωγή.
4. Επιβάλλεται η χώρα μας να οργανώσει και να εφαρμόσει άμεσα στρατηγική για τη μείωση της μετάδοσης του BHV-1 και αν είναι δυνατόν να εφαρμόσει μέτρα **εκρίζωσης** του νοσήματος.
5. Η βελτίωση των συνθηκών εκτροφής, τα μέτρα υγιεινής και η εφαρμογή εμβολιασμών -κατά προτίμηση με ιχνηθετημένα εμβόλια- είναι τα πρώτα μέτρα που πρέπει να ληφθούν άμεσα σε επίπεδο εκτροφής, για την **εκρίζωση** του νοσήματος.
6. Σε επίπεδο κρατικής παρέμβασης, μία πρώτη προσέγγιση θα μπορούσε να γίνει με τον μηνιαίο ορολογικό έλεγχο δειγμάτων από τις δεξαμενές γάλακτος της κάθε εκτροφής καθώς και με εξαμηνιαίους ορολογικούς ελέγχους των ζώων στις αγελαδοτροφικές εκμεταλλεύσεις αλλά και στις μονάδες εντατικής πάχυνσης μόσχων.
7. Να συσταθεί στους παραγωγούς η χρήση σπέρματος από πιστοποιημένα αρνητικούς ταύρους.
8. Η συνεχής και κατ' επανάληψη εγρήγορση των κτηνιάτρων στα δημόσια και ιδιωτικά κτηνιατρεία για σοβαρά λοιμώδη νοσήματα όπως η Λ.Ρ.Β. με δημοσιεύματα και ειδικά άρθρα, στα ειδικά συνέδρια, έντυπα, περιοδικά και ιστοσελίδες, επαγγελματικών επιστημονικών σωματείων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ackermann M., Engels M., (2006). Pro and contra IBR-eradication. *Veterinary Microbiology*. 113: 293–302.
2. Antinone S. E., Shubeita G. T., Collier K. E., Lee J. I., Haverlock-Moyns S., Gross S. P., Smith G. A.,(2006). The Herpesvirus capsid surface protein, VP26, and the majority of the tegument proteins are dispensable for capsid transport toward the nucleus. *Journal Of Virology*. 80: 5494–5498.
3. Babiuk L.A., Wardley R.C., Rouse B.T., (1975). Defense Mechanisms Against Bovine Herpesvirus Relationship of Virus-Host Cell Events to Susceptibility to Antibody-Complement Cell Lysis. *Infection And Immunity*. 12 (5): 958-963
4. Biuk-Rudan N, Cvetnić S, Madić J, Rudan D. (1999). Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. *Theriogenology*. 51(5): 875-881.
5. Boelaert F., Speybroeck N., de Kruif A., Aerts M., Burzykowski Molenberghs G., Berkvens D. L.,(2005).Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. *Preventive Veterinary Medicine* 69: 285–295.
6. Bosch J. C., Kaashoek M. J., van Oirschot J. T., (1997). Inactivated bovine herpesvirus 1 marker vaccines are more efficacious in reducing virus excretion after reactivation than a live marker vaccine. *Vaccine* 15:1512–1517.
7. Bowland.S. L, Shewen P. E., (2000). Bovine respiratory disease: Commercial vaccines currently available in Canada. *Veterinary Journal*. 41: 33-48.
8. Bryan L.A., Fenton R.A., Misra V., Haines D.M., (1994). Fatal, generalized bovine herpesvirus type-1 infection associated with a modified-live infectious bovine rhinotracheitis parainfluenza-3 vaccine administered to neonatal calves. *Canadian Veterinary Journal*. 35: 223–228.
9. Campadelli-Fiume G., Cocchi F., Menotti L., Lopez M., (2000). The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Reviews in Medical Virology*. 10: 305–319.
10. Carpenter D. E., Misra V., (1991). The most abundant protein in bovine herpes 1 virions is a homologue of herpes simplex virus type 1 UL47. *Journal of General Virology*. 72: 3077–3084.
11. Cascio K. E., Belknap E. B., Schultheiss P. C., Ames A. D., Collins J. K., (1999). Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11: 134–139.

12. Dohner K., Wolfstein A., Prank U., Echeverri C., Dujardin D., Vallee R., Sodeik B., (2002). Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Molecular Biology of the Cell*. 13: 2795–2809.
13. Edwards S., White H., Nixon P., (1990). A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus found in the UK. *Veterinary Microbiology*. 22: 213–223.
14. Elazhary M. A. S. Y., Derbyshire J. B. (1979). Effect of Temperature, Relative Humidity and Medium on the Aerosol Stability of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 43: 158-167.
15. Ely R. W., d’Offay J. M., Ruefer A. H., Cash C. H., (1996). Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 8: 487-492.
16. Engels M., Gelderblom H., Darai G., Ludwig H. (1983). Goat Herpesviruses: Biological and Physicochemical Properties. *Journal Of General Virology*. 64: 2237-2247.
17. Fonss A., Munksgaard L. (2008). Automatic blood sampling in dairy cows. *Computers and Electronics in Agriculture*. 64: 27-33.
18. Fraefel C., Wirth U.V., Vogt B., Schwyzer M., (1993). Immediate-early transcription over covalently joined genome ends of bovine herpesvirus 1: the *circ* gene. *Journal Of Virology*. 67: 1328–1333.
19. Fuchs M, Hubert P, Detterer J., Rziha H. J., (1999). Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild type virus and virus lacking glycoprotein E. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 2498–2507.
20. Garber D.A., Beverley S.M., Coen D.M., (1993). Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* 197: 459–462.
21. Geraghty R. J., Krummenacher C., Cohen G. H., Eisenberg R. J., Spear P. G., (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* 280: 1618–1620.
22. Gerdts V., Beyer J., Lomniczi B., Mettenleiter T.C., (2000). Pseudorabies virus expressing Bovine herpesvirus 1 glycoprotein B exhibits altered neurotropism and increased neurovirulence. *Journal Of Virology*. 74: 817–827.
23. Graham D. A., Foster J. C., German A., McLaren I. E, Adair B. M., Merza M., (1999). Evaluation of an immunofluorescent antibody test to detect bovine

- herpesvirus 1-specific IgM. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11: 324–329.
24. Gungor A. B, Ozkul A., (2007). Dynamics of natural bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) infection in a dairy herd. *Tropical Animal Health and Production*. 39 (1): 13-20.
 25. Hanon E., Lambot M., Hoornaert S., Lyaku J., Pastoret P. P., (1998). Bovine herpesvirus 1-induced apoptosis: phenotypic characterization of susceptible peripheral blood mononuclear cells. *Archives of Virology*. 143: 441–452.
 26. Hanon E., Keil G., van Drunen Littel-van den Hurk S., Griebel P., Vanderplasschen A., Rijsewijk F. A., Babiuk L., Pastoret P. P., (1999). Bovine herpesvirus 1-induced apoptotic cell death: role of glycoprotein D. *Virology*. 257: 191–197.
 27. Hage J. J., Vellema P., Schukken Y. H., Barkema H. W., Rijsewijk F. A., Van Oirschot J. T., Wentink G. H., (1997). Sheep do not have a major role in bovine herpesvirus 1 transmission, *Veterinary Microbiology*. 57: 41–54.
 28. Hage J. J., Schukken Y. H., Dijkstra T., Barkema H. W., van Valkengoed P. H, Wentink G. H., (1998). Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. *Preventive Veterinary Medicine*. 27.34 (2-3): 97-106.
 29. Henderson G., Zhang Y., Inman M., Jones D., Jones C., (2004). Infected cell protein 0 encoded by bovine herpesvirus 1 can activate caspase when overexpressed in transfected cells. *Journal Of General Virology*. 85: 3511–3516.
 30. Hinkley S., Ambagala A. P., Jones C. J., Srikumaran S., (2000). A VHS-like activity of bovine herpesvirus-1. *Archives of Virology*. 145: 2027–2046.
 31. Jarrett E. E. E, Hall E., (1983). IgE suppression by maternal IgG. *Immunology*. 48: 49-58.
 32. Jones C., (2003). Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clinical Microbiology Reviews*. 16: 79–95.
 33. Jones C., Chowdhury S., (2008). A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Animal Health Research Reviews* 8(2): 187–205.
 34. Kaashoek M. J., Moerman A., Madic J., Weerdmeester K., Maris-Veldhuis M., Rijsewijk F. A. M., Van Oirschot J. T., (1995). An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine*.13 (4): 342-346.

35. Kaashoek M. J., Rijsewijk F. A., Ruuls R. C., Keil G. M., Thiry E., Pastoret P. P., van Oirschot J. T., (1998). Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, g, or in both the gI and gE gene. *Vaccine*.16: 802–809.
36. Kelling. C. L, Schipper A., Haugse C. N., (1973) Antibody response in calves following administration of attenuated Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) vaccines. *Canadian Journal of comparative Medicine*. 37: 309-312.
37. Koppers-Lalic D., Rijsewijk F. A. M., Verschuren S. B., Van Gaans-van den Brink J. A., Neisig A., Rensing M. E., Neefjes J., Wiertz E. J., (2001). The UL41-encoded virion host shutoff (vhs) protein and vhs-independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. *Journal Of General Virology*. 82: 2071–2081.
38. Kramps J. A., Banks M., Beer M., Kerkhofs P., Perrin M., Wellenberg G. J., van Oirschot J. T., (2004). Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. *Veterinary Microbiology* 102: 169–181.
39. Kupferschmied H. U., Kihm U., Bachmann P., Müller K. H., Ackermann M., (1986). Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: A case report. *Theriogenology*. 25: 439–443.
40. Lehmann D., Sodoyer R., Leterme S., Crevat D., (2002). Improvement of serological discrimination between herpesvirus-infected animals and animals vaccinated with marker vaccines. *Veterinary Microbiology*. 86: 59–68.
41. Lemaire M., Meyer G., Baranowski E., Schynts F., Wellemans G., Kerkhofs P., Thiry E., (2000). Production of Bovine Herpesvirus Type 1-Seronegative Latent Carriers by Administration of a Live-Attenuated Vaccine in Passively Immunized Calves. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 4233–4238.
42. Lemaire M., Schynts F., Meyer G., Georgin J. P., Baranowski E., Gabriel A., Ros C., Belak S., Thiry E., (2001). Latency and reactivation of a glycoprotein E negative bovine herpesvirus type 1 vaccine: influence of virus load and effect of specific maternal antibodies. *Vaccine* 19: 4795–4804.
43. Li Y., Van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L. A., Liang X., (1995). Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. *Journal Of Virology*. 69: 4758–4768.
44. Liang X., Babiuk L. A., Van Drunen Littel-van den Hurk S., Fitzpatrick D. R., Zamb T. J., (1991). Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII, and gIV. *Journal Of Virology*. 65: 1124–1132.

45. Liang X., Pyne C., Li Y., Babiuk L. A., Kowalski J., (1995). Delineation of the essential function of bovine herpesvirus 1 gD: an indication for the modulatory role of gD in virus entry. *Virology*. 207: 429–441.
46. Liang X., Chow B., Babiuk L. A. (1997). Study of immunogenicity and virulence of bovine herpesvirus 1 mutants deficient in the UL49 homolog UL49.5 homolog and dUTPase genes in cattle. *Vaccine*. 15 (10): 1057-1064.
47. Liu T., Khanna K. M., Chen X., Fink D. J., Hendricks R. L., (2000). CD8 (+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *The Journal of Experimental Medicine*. 191: 1459–1466.
48. Mars M. H., de Jong M. C., van Maanen C., Hage J. J., van Oirschot J. T., (1999). Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. *Veterinary Microbiology*. 76: 1–13.
49. Mars M. H., de Jong M. C., van Oirschot J. T., (2000). A gE-negative BHV1 vaccine virus strain cannot perpetuate in cattle populations. *Vaccine* 18: 2120–2124.
50. Mars M. H., de Jong M., Franken P., van Oirschot J. T., (2001). Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. *Vaccine*. 9: 1924–1930.
51. Masri S. A., Olson W., Nguyen P. T., Prins S., Deregt D., (1996). Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 60: 100-107.
52. Mechor G. D., Rousseaux C. G., Radostits O. M., Babiuk L. A., Petrie L., (1987). Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 51: 452–459.
53. Meyer G., Hanon E., Georlette D., Pastoret P.P., Thiry E., (1998). Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. *Journal Of Virology*. 79: 1983–1987.
54. Meyer G., Lemaire M., Ros C., Belak K., Gabriel A., Cassart D., Coignoul F., Belak S., Thiry E., (2001). Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arcives of Virology*. 146: 633–652.
55. Miller J. M., Whetstone C. A., Van der Maaten M. J. (1991). Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *American Journal of Veterinary Research*. 52: 458–461.

56. Muylkens B., Meurens F., Schynts F., de Fays k., Pourchet A., Thiry J., Vanderplasschen A., Antoine N., Thiry E. (2006). Biological characterization of bovine herpesvirus-1 recombinants possessing the vaccine glycoprotein E negative phenotype. *Veterinary Microbiology*. 113: 283–291.
57. Muylkens B., Thiry J., Kirten P., Schynts F., Thiry E., (2007) Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis *Veterinary Research*. 38: 181–209.
58. Nandi S., Kumar M., Manohar M., Chauhan R. S., (2009). Bovine herpes virus infections in cattle. *Animal Health Research Reviews*. 10 (1); 85–98.
59. Ntafis V., Xylouri E., Diakou A., Sotirakoglou K., Kritikos I., Georgakilas E., Menegatos I., (2007). Serological survey of antibodies against *Toxoplasma gondii* in organic sheep and goat farms in Greece. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 58: 22–33.
60. Nuotio L., Neuvonen E., Hyytiäinen M. (2007). Epidemiology and eradication of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 49 (3): 1-6.
61. Okazaki K., Honda E., Kono Y., (1994). Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIII by a recombinant baculovirus in insect cells. *J. Gen. Virol.*, 75: 901–904.
62. Porter D.D., Larsen A.E., Cox N.A., (1975). Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus in Mustelidae. *Clinical Microbiology*. 1: 112-113.
63. Rijsewijk F.A., Kaashoek M.J., Langeveld J.P., Meloen R., Judek J., Bienkowska- Szewczyk K., Maris-Veldhuis M.A., van Oirschot J.T., (1999). Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *Journal Of General Virology*. 80: 1477–1483.
64. Rock D. L., Reed D. E., (1982). Persistent Infection with Bovine Herpesvirus Type 1: Rabbit Model. *Infection and Immunity*. 35 (1): 371-373.
65. Rock D., Lokensgard J., Lewis T., Kutish G., (1992). Characterization of dexamethasone induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *Journal Of Virology*. 66: 2484–2490.
66. Roizman B., Pellett P. E. (2001). The Family Herpesviridae: A Brief Introduction in *Fields Virology, 4th Edition: Chapter 71*. 2: 1929-1933.
67. Roizman B., Knipe D. M (2001). Herpes Simplex Viruses and Their Replication in: *Fields Virology, 4th Edition: Chapter 72*. 2: 1946-1951.
68. Schroder C., Linde G., Fehler F., Keil G. M., (1997). From essential to beneficial: glycoprotein D loses importance for replication of bovine herpesvirus 1 in cell culture. *Journal Of Virology*. 71: 25–33.

69. Schroder C., Keil G. M., (1999). Bovine herpesvirus 1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading and glycoproteins gH (W450) and gB for glycoprotein D-independent cell-to-cell spread. *Journal Of General Virology*. 80: 57–61.
70. Schynts F., Meurens F., Detry B., Vanderplasschen A., Thiry E., (2003). Rise and Survival of Bovine Herpesvirus 1 Recombinants after Primary Infection and Reactivation from Latency. *Journal Of Virology*. 77 (23): 12535–12542.
71. Simpson V. R. Wild Animals as Reservoirs of Infectious Diseases in the UK (2002). *The Veterinary Journal*. 163: 128-146.
72. Singh E .L, Thomas F. C, Papp-Vid G., Eaglesome M. D., Hare W. C. D., (1982). Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections II. The in vitro exposure of preimplantation bovine embryos to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Theriogenology*.18: 133-140.
73. Six A., Banks M., Engels M., Bascuñana C. R., Ackermann M. (2001). Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves (2001). *Arcives of Virology*. 146: 1325–1335.
74. Spilki F. R., Esteves P. A., da Silva A. D., Franco A. C., Rijsewijk F. A., Roehle P. M., (2005). A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). *Journal of Virological Methods*. 129: 191–193.
75. Straub O. C., (1990). Infectious bovine rhinotracheitis virus. In *Infectious Diseases of Ruminants*. Edited by Z. Zinter, B. Morein. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishers.p:71-108.
76. Thiry E., Saliki J., Bublot M., Pastoret P. P., (1987). Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 10: 59–63.
77. Thiry J., Keuser V., Muylkens B., Meurens F., Gogev S., Vanderplasschen A., Thiry E., (2005). Ruminant alpha herpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Veterinary Research*. 37 (2006): 169–190.
78. Thiry J., Widén F., Grégoire F., Linden A., Belák S., Thiry E., (2007). Isolation and characterisation of a ruminant alpha herpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. *BMC Veterinary Research*. 3: 26: 1-11.
79. Tizard R. I., (2004). Vaccines and their production. In: *Veterinary Immunology: An introduction* .pp:247-259. Published by Elsevier Inc., New York, USA. 7th Edition.

80. Trapp S., Osterrieder N., Keil G. M., Beer M., (2003). Mutagenesis of a bovine herpesvirus type 1 genome cloned as an infectious bacterial artificial chromosome: analysis of glycoprotein E and G double deletion mutants. *Journal of General Virology*. 84: 301–306.
81. Turin L, Russo S, Poli G., (1999). BHV-1: New Molecular Approaches to Control a Common and Widespread Infection. *Molecular Medicine*. 5: 261-284.
82. Van Drunen Littel-van den Hurk S., Gifford G. A., Babiuk L. A., (1990). Epitope specificity of the protective immune response induced by individual bovine herpesvirus-1 glycoproteins. *Vaccine*. 8(4): 358-368.
83. Van Drunen Littel-van den Hurk S., Tikoo K. S., Liang X., Babiuk L. A. (1993). Bovine herpesvirus-1 vaccines. *Immunology and Cell Biology*. 71: 405-420.
84. Van Engelenburg F. A. C., Maes R. K., Van Oirschot J. T., Rijsewijk F. A M., (1993). Development of a Rapid and Sensitive Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Bovine Herpesvirus Type 1 in Bovine Semen. *Journal Of Clinical Microbiology*. 31 (12): 3129-3135.
85. Van Engelenburg F. A. C., Kaashoek M. J., Van Oirschot J. T., Rijsewijk F. A. M. (1995). A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. *Journal of General Virology*. 76: 2387-2392.
86. Van Oirschot J. T., Kaashoek M. J., Rijsewijk F. A. M., Stegeman J. A., (1995). The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. *Journal of Biotechnology*. 44: 75-81.
87. Van Oirschot J.T., Kaashoek M. J., MarisVeldhuis M. A., Weerdmeester K., Rijsewijk F. A. M. (1997). An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. *Journal of Virological Methods*. 67: 23–34.
88. Van Schaik G., Shoukri M., Martin S. W., Schukken Y. H., Nielen M., Hage J. J., Dijkhuizen A. A., (1999). Modeling the Effect of an Outbreak of Bovine Herpesvirus Type 1 on Herd-Level Milk Production of Dutch Dairy Farms. *Journal of Dairy Science*. 82 (5): 944–952.
89. Van Schaik G., Schukken Y. H., Nielen M., Dijkhuizen A. A., Barkema H. W., Benedictus G., (2002). Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study, *Preventive Veterinary Medicine*. 54: 279–289.

90. Vonk Noordegraaf A., Labrovic A., Frankena K., Pfeiffer D. U., Nielen M., (2004). Simulated hazards of loosing infection-free status in a Dutch BHV1 model. *Preventive Veterinary Medicine* 62: 51–58.
91. Winkler M. T., Doster A., Jones C., (2000). Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *Journal of Virology*. 74: 5337–5346.
92. Wirth U. V., Gunkel K., Engels M., Schwyzer M., (1989). Spatial and temporal distribution of bovine herpesvirus 1 transcripts. *Journal Of Virology*. 63: 4882–4889.
93. Wrathall A. E, Simmons H. A, Van Soom A., (2006). Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen. *Theriogenology*. 65: 247–274.
94. Xia J. Q., Yason C., Kibenge F. S. B., (1995). Comparison of dotblot hybridization, polymerase chain reaction and virus isolation for the detection of bovine herpesvirus 1 in artificially infected bovine semen. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 59: 102–109.
95. Yates W. D. C., (1982). A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 46: 225-263.
96. Yeşilbaş K, Güngör B. (2008). Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-Western Turkey. *Tropical Animal Health and Production*. 40 (1): 55-60.
97. Γεωργούδης Ανδρέας, 2010 προσωπική επικοινωνία
98. Ξυλούρη – Φραγκιαδάκη, Ε., Αντωνάκος Γ. και Νοικοκύρης Π. Ν. Διαχείριση υγείας σε εκτροφή βοοειδών οροθετικών στη Λοιμώδη Ρινοτραχειίτιδα και τη Νόσο των Βλεννογόνων. 16^ο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρίας, Καλαμάτα 17-19/10/2000.
99. Ξυλούρη – Φραγκιαδάκη Ε., Καραπάνου Χ. Ορολογική διερεύνηση της Λοιμώδους Ρινοτραχειίτιδας των βοοειδών. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας, Αθήνα, 15-17 Μαρτίου 2001.
100. Παπαδόπουλος Ορέστης (1998). Λοιμώδης Ρινοτραχειίτιδα και Φλυκταινώδης Αιδοιοκολπίτιδα των Βοοειδών. (IBR, IPV). ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΖΩΩΝ. Α.Π.Θ. Έκδοση: Υπηρεσία Δημοσιευμάτων.
101. Τσότσος Αθανάσιος (1992). Ιατρική ιολογία (Γενική – Κλινική – Εργαστηριακή). Αθήνα. Ιατρικές εκδόσεις λίτσα.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο:	Ρόιδω Μπάτζιου
Όνομα πατρός:	Σπύρος
Όνομα μητρός:	Μαρία
Τόπος γέννησης:	Θεσσαλονίκη
Ημερομηνία Γέννησης:	16-07-1977
Υπηκοότητα:	Ελληνική
Οικογενειακή κατάσταση:	Άγαμη
Διεύθυνση κατοικίας:	Ηρώων Σκοπευτηρίου 45-47 Καισαριανή-Αθήνα.
Τηλέφωνο:	6977 756194
E-mail:	rompatziou@yahoo.com

Σπουδές

1997-2005: Αποφοίτηση από την Κτηνιατρική Σχολή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης με βαθμό πτυχίου “ ΚΑΛΩΣ” (6) [(6 και 22 εκατ.)], στις 21 Μαρτίου 2005.

1995: Αποφοίτηση από το Λύκειο Ελευθερίου-Κορδελιού με γενικό βαθμό 19 και 2/11.

Γλώσσες **Αγγλικά (Cambridge-CPE)**

Χρήση Η/Υ **Δίπλωμα ECDL CORE**

Μέλος σωματείων

Ενεργό μέλος του ερευνητικού κέντρου διάσωσης και περίθαλψης κητωδών ΑΡΙΩΝ.

Εργασιακή εμπειρία-μετεκπαίδευση

09/2005-12/2005: Μετεκπαίδευση στην Χειρουργική κλινική της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

21/12/2005-30/8/2006: Απασχόληση με οκτάμηνη σύμβαση εργασίας ιδιωτικού δικαίου στο Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Θεσσαλονίκης, στο τμήμα Παθολογίας πτηνών και ειδικότερα στην «**Εργαστηριακή διάγνωση και αντιμετώπιση της Γρίπης των πτηνών**».

20/09/2006-20/01/2007: Πλήρης απασχόληση στην κλινική ζώων συντροφιάς του κ. Κυριάκου Αγαθαγγελίδη, Θεσσαλονίκη.

01/02/2007-30/09/2007: Απασχόληση με οκτάμηνη σύμβαση εργασίας ιδιωτικού δικαίου στο Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Θεσσαλονίκης, στο τμήμα Παθολογίας πτηνών και ειδικότερα στην «**Εργαστηριακή διάγνωση και αντιμετώπιση της Γρίπης των πτηνών**».

28/01/2007-20/01/2008: Μερική απασχόληση στην κλινική ζώων συντροφιάς του κ. Κυριάκου Αγαθαγγελίδη, Θεσσαλονίκη.

12/03/2008-12/08/2008: Πλήρης απασχόληση στο “Νοσοκομείο ζώων Αθηνών” υπό τη διεύθυνση του κ. Χριστόπουλου.

10/2008: Εγγραφή μετά από επιτυχείς εξετάσεις στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με τίτλο «Γενετική Βελτίωση, Αναπαραγωγή και Διατροφή Αγροτικών Ζώων» με ειδίκευση στην Αναπαραγωγή Αγροτικών Ζώων

Ανακοινώσεις σε συνέδρια: Έλεγχος των αντισωμάτων κατά του Bovine Herpes virus-1 (BHV-1) σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Ρ. Μπάτζιου., Β. Ντάφης., Γ. Οικονόμου., Ε. Ξυλούρη. 25^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Ναύπλιο, 7-9 Οκτωβρίου 2009.

