

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ  
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΥΚΛΟΪΟΥ 2 ΤΟΥ ΧΟΙΡΟΥ  
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ  
ΣΕ ΧΟΙΡΙΑ**

ΜΑΡΙΝΑ Μ. ΣΟΦΙΑ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2008

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ  
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΥΚΛΟΪΟΥ 2 ΤΟΥ ΧΟΙΡΟΥ  
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ  
ΣΕ ΧΟΙΡΙΑ**

ΜΑΡΙΝΑ Μ. ΣΟΦΙΑ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2008

Στον πατέρα μου

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ  
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΥΚΛΟΙΟΥ 2 ΤΟΥ ΧΟΙΡΟΥ  
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΣΕ  
ΧΟΙΡΙΔΙΑ**

ΜΑΡΙΝΑ Μ. ΣΟΦΙΑ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΠΟΥ ΕΚΠΟΝΗΘΗΚΕ ΣΤΟ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναπλ. Καθηγητής	Χαράλαμπος Μπιλλίνης	Επιβλέπων
Αναπλ. Καθηγητής	Λεωνίδα Λεοντίδης	Μέλος Συμβ. Επιτροπής
Επ. Καθηγητής	Ιωάννης Παππάς	Μέλος Συμβ. Επιτροπής
Καθηγητής	Ιωάννης Βλέμματος	Μέλος Εξετ. Επιτροπής
Καθηγητής	Γεώργιος Κοπτόπουλος	Μέλος Εξετ. Επιτροπής
Καθηγήτρια	Ελευθερία Μπουρτζή- Χατζοπούλου	Μέλος Εξετ. Επιτροπής
Επ. Καθηγητής	Βασίλειος Ψύχας	Μέλος Εξετ. Επιτροπής

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	5
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	9
<b>ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ</b> .....	11
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b> .....	12
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b> .....	14
<b>1. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση</b> .....	15
1.1 Ταξινόμηση.....	15
1.2 Ιστορική Αναδρομή.....	15
1.3 Φυσικοχημικές Ιδιότητες.....	16
1.4 Γεωγραφική εξάπλωση του κυκλοϊού 2 του χοίρου.....	16
1.5 Οργάνωση γενώματος.....	16
1.5.1 Ανοιχτά Αναγνωστικά Πλαίσια.....	16
1.5.2 Σημείο έναρξης της αντιγραφής του ιού.....	17
1.6 Είσοδος του ιού στο κύτταρο.....	18
1.7 Αντιτύπωση.....	19
1.8 Μεταγραφή.....	19
1.9 Τρόποι μετάδοσης του κυκλοϊού 2 του χοίρου.....	20
1.10 Σύγκριση στελεχών κυκλοϊού 2 του χοίρου.....	20
1.11 Ανοσία έναντι του κυκλοϊού 2 του χοίρου.....	22
1.12 Πολυσυστηματικό Σύνδρομο Απίσχυσης των Απογαλακτισμένων Χοιριδίων.....	22
1.12.1 Εισαγωγή.....	22
1.12.2 Αιτιολογία.....	22
1.12.3 Γεωγραφική εξάπλωση.....	23
1.12.4 Μετάδοση και απέκκριση του ιού.....	23
1.12.5 Παθογένεια.....	24
1.12.6 Κλινικά συμπτώματα.....	24
1.12.7 Μακροσκοπικές αλλοιώσεις.....	25
1.12.8 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις.....	25
1.12.9 Νοσηρότητα και θνησιμότητα.....	26
1.12.10 Επιδημιολογία.....	26
1.12.11 Διάγνωση.....	27
1.12.11.1 Κλινική διάγνωση.....	27
1.12.11.2 Εργαστηριακή διάγνωση.....	28
1.12.11.3 Οριστική διάγνωση.....	29
1.12.12 Διαφορική διάγνωση.....	29
1.12.13 Πρόληψη.....	30
1.13 Πολυσυστηματικό Σύνδρομο Απίσχυσης των Απογαλακτισμένων Χοιριδίων σε αγριόχοιρους.....	31
1.14 Παθολογικές καταστάσεις με τις οποίες έχει σχετιστεί ο κυκλοϊός 2.....	32
1.14.1 Σύνδρομο Δερματίτιδας και Νεφροπάθειας των Χοίρων.....	32
1.14.1.1 Εισαγωγή.....	32
1.14.1.2 Γεωγραφική εξάπλωση.....	32
1.14.1.3 Αιτιολογία.....	32
1.14.1.4 Παθογένεια.....	33

1.14.1.5 Νοσηρότητα και θνησιμότητα .....	33
1.14.1.6 Κλινικά συμπτώματα .....	34
1.14.1.7 Μακροσκοπικές αλλοιώσεις .....	34
1.14.1.8 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις .....	35
1.14.1.9 Διάγνωση .....	35
1.14.1.10 Διαφορική διάγνωση.....	36
1.14.1.11 Πρόληψη .....	36
1.14.2 Αναπαραγωγικά προβλήματα .....	37
1.14.2.1 Ιστορικό .....	37
1.14.2.2 Πειραματικές μελέτες .....	37
1.14.2.3 Μετάδοση .....	38
1.14.2.4 Κλινικά συμπτώματα .....	38
1.14.2.5 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις .....	38
1.14.2.6 Επιδημιολογία.....	39
1.14.3 Αναπνευστικό Σύμπλεγμα των Χοίρων.....	39
1.14.3.1 Αιτιολογία.....	39
1.14.3.2 Κλινικά συμπτώματα .....	40
1.14.3.3 Κυκλοιός 2 και ΑΣΧ.....	40
1.15 Πειραματικές μελέτες με κυκλοιό 2 .....	40
1.15.1 Πειραματικές μολύνσεις σε γνοτοβιοτικά χοιρίδια .....	41
1.15.2 Πειραματικές μολύνσεις χοίρων απαλλαγμένων από ειδικούς παθογόνους μικροοργανισμούς.....	41
1.15.3 Πειραματικές μολύνσεις οροαρνητικών χοίρων από συμβατικές εκτροφές .....	42
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</b> .....	43
<b>2. Διάφορα κλινικά σύνδρομα σε οικόσιτους χοίρους</b> .....	44
2.1 Υλικά και μέθοδοι.....	44
2.1.1 Απομόνωση DNA από παθολογικά υλικά .....	44
2.1.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης .....	44
2.1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	47
2.1.4 Προσδιορισμός της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων του κυκλοιού 2 .....	47
2.1.5 Κατάθεση Ελληνικών στελεχών στην Τράπεζα Δεδομένων .....	48
2.1.6 Σύγκριση της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων και φυλογενετική ανάλυση	48
2.1.7 Παθολογοανατομικές εξετάσεις .....	49
2.2 Αποτελέσματα.....	51
2.2.1 Διάφορα κλινικά σύνδρομα .....	51
2.2.1.1 ΠΣΑΑΧ.....	51
2.2.1.1.1 Κλινικά συμπτώματα .....	51
2.2.1.1.2 Αποτελέσματα PCR .....	51
2.2.1.1.3 Μακροσκοπικές αλλοιώσεις .....	51
2.2.1.1.4 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις .....	52
2.2.1.2 ΣΔΝΧ.....	52
2.2.1.2.1 Κλινικά συμπτώματα .....	52
2.2.1.2.2 Αποτελέσματα PCR .....	52
2.2.1.2.3 Μακροσκοπικές αλλοιώσεις .....	52
2.2.1.2.4 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις .....	53

2.2.1.3	Εξιδρωματική επιδερμίτιδα .....	53
2.2.1.3.1	Κλινικά συμπτώματα .....	53
2.2.1.3.2	Αποτελέσματα PCR .....	53
2.2.1.3.3	Μακροσκοπικές αλλοιώσεις .....	53
2.2.1.3.4	Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις .....	53
2.2.1.4	Νεκρωτική λεμφαδενίτιδα .....	54
2.2.1.4.1	Κλινικά συμπτώματα .....	54
2.2.1.4.2	Αποτελέσματα PCR .....	54
2.2.1.4.3	Μακροσκοπικές αλλοιώσεις .....	54
2.2.1.4.4	Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις .....	54
2.2.1.5	Κοκκιωματώδης εντερίτιδα .....	54
2.2.1.5.1	Κλινικά συμπτώματα .....	54
2.2.1.5.2	Αποτελέσματα PCR .....	54
2.2.1.5.3	Μακροσκοπικές αλλοιώσεις .....	55
2.2.1.5.4	Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις .....	55
2.2.2	Φυλογενετική ανάλυση .....	55
2.3	Συζήτηση .....	60
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</b>	<b>.....</b>	<b>64</b>
3.	Πολυσυστηματικό Σύνδρομο Απίσχανσης των Απογαλακτισμένων Χοιριδίων σε αγριόχοιρους .....	65
3.1.1	Κλινικά περιστατικά .....	65
3.1.2	Απομόνωση DNA και RNA .....	65
3.1.3	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης .....	66
3.1.4	Ιστοπαθολογική εξέταση .....	66
3.1.5	Προσδιορισμός της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων .....	66
3.1.6	Κατάθεση στελεχών στην Τράπεζα Δεδομένων .....	66
3.1.7	Σύγκριση της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων και φυλογενετική ανάλυση .....	66
3.2	Αποτελέσματα .....	67
3.2.1	Ανίχνευση DNA και RNA .....	67
3.2.2	Παθολογοανατομικές αλλοιώσεις .....	67
3.2.3	Φυλογενετική Ανάλυση .....	68
3.3	Συζήτηση .....	70
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</b>	<b>.....</b>	<b>72</b>
<b>4.</b>	<b>Πειραματική μόλυνση χοιριδίων με κυκλοϊό 2 .....</b>	<b>73</b>
4.1	Σχεδιασμός πειραματικής μελέτης .....	73
4.2	Υλικά και μέθοδοι .....	74
4.2.1	Καλλιέργεια κυττάρων και τιτλοποίηση του ιού .....	74
4.2.1.1	Κύτταρα και θρεπτικά υλικά .....	74
4.2.1.2	Καλλιέργεια των κυττάρων .....	75
4.2.1.3	Στέλεχος του κυκλοϊού 2 για την πειραματική μόλυνση των χοιριδίων. ....	75
4.2.1.4	Καλλιέργεια του ιού σε κύτταρα .....	75
4.2.1.5	Τιτλοποίηση του ιού με την τεχνική της ανοσοουπεροξειδάσης .....	76
4.2.2	Παθολογικά υλικά .....	76
4.2.3	Τεχνικές για την εξέταση των παθολογικών υλικών .....	77
4.2.3.1	Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA .....	77

4.2.3.2 Απομόνωση DNA από παθολογικά υλικά .....	77
4.2.3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης .....	77
4.2.3.4 Παθολογοανατομικές εξετάσεις .....	77
4.2.3.4.1 Ιστοπαθολογικές εξετάσεις .....	78
4.2.3.4.2 Ανοσοϊστοχημική εξέταση.....	78
4.2.4 Στατιστική ανάλυση.....	79
4.3 Αποτελέσματα.....	80
4.3.1 Κλινικά συμπτώματα .....	80
4.3.2 Μέτρηση του βάρους.....	80
4.3.3 Σύσταση κοπράνων.....	80
4.3.4 Ανίχνευση αντισωμάτων του κυκλοϊού 2 με ELISA.....	80
4.3.5 Ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 2 στο πλάσμα του αίματος.....	81
4.3.6 Ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 2 στο ρινικό έκκριμα .....	81
4.3.7 Ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 2 στα κόπρανα .....	82
4.3.8 Ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 2 στα όργανα .....	82
4.3.9 Μακροσκοπικές αλλοιώσεις .....	83
4.3.10 Ιστοπαθολογικά ευρήματα.....	83
4.3.11 Σήμανση των αντιγόνων του κυκλοϊού 2 με ανοσοϊστοχημική μέθοδο ....	85
4.4 Συζήτηση .....	85
<b>ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>95</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>98</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>101</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΕΣ .....</b>	<b>103</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....</b>	<b>118</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....</b>	<b>130</b>

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας (Τμήμα Ιολογίας) του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΕΠΕΑΕΚ II - Ηράκλειτος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων τη διδακτορική διατριβή, αναπληρωτή καθηγητή Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Χ. Μπιλλίνη για την καθοδήγηση και τη βοήθειά του.

Ευχαριστώ τον καθηγητή της Παθολογικής Ανατομικής των Ζώων της Κτηνιατρικής σχολής του Α.Π.Θ. κ. Ι. Βλέμμα για τις επιστημονικές συμβουλές και τις χρήσιμες διορθώσεις του, καθώς και για την άψογη συνεργασία με το εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον επίκουρο καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής των Ζώων κ. Β. Ψύχα και τον κτηνίατρο κ. Γ. Σοφινίδη για τη βοήθειά τους στη συλλογή δειγμάτων, την πραγματοποίηση των νεκροτομών, την αξιολόγηση των παθολογοανατομικών αλλοιώσεων και τη μελέτη των ιστολογικών τομών. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επίκουρο καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής των Ζώων κ. Θ. Πουταχίδη για την βοήθειά του στην πραγματοποίηση των νεκροτομών, την αξιολόγηση των παθολογοανατομικών αλλοιώσεων, τη διεξαγωγή και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημείας και τη βοήθειά του στη συγγραφή της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή της Επιδημιολογίας, Βιοστατιστικής και Οικονομίας Ζωϊκής Παραγωγής του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Α. Λεοντίδη για τις συμβουλές του κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού τμήματος της μελέτης και τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω τον Dr. P. Cordioli (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell' Emilia – Romagna) ο οποίος παραχώρησε τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του κυκλοϊού 2 του χοίρου, καθώς και το πρωτόκολλο για την τεχνική της ανοσοϋπεροξειδάσης.

Ευχαριστώ τον κτηνίατρο ερευνητή του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. Καρδίτσας κ. Κ. Δεληγιάννη για την παραχώρηση χώρου για τη διεξαγωγή της πειραματικής μελέτης, καθώς και τους ζωοκόμους που με βοήθησαν στη συλλογή δειγμάτων.

Ευχαριστώ τον επίκουρο καθηγητή Ζωϊκής Παραγωγής της Κτηνιατρικής σχολής του Α.Π.Θ. κ. Π. Φορτομάρη για τη βοήθεια του στην επιλογή της ανοσοενισχυτικής ουσίας και για την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης.

Ευχαριστώ τον επίκουρο καθηγητή της Φαρμακολογίας και Τοξικολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ι. Παππά για το συμβουλευτικό του ρόλο κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Μικροβιολογίας – Ανοσολογίας – Λοιμωδών Νοσημάτων της Κτηνιατρικής σχολής του Α.Π.Θ. κ. Γ. Κοπτόπουλο και την καθηγήτρια Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων των Ζώων της Κτηνιατρικής σχολής του Α.Π.Θ. κ. Ε. Μπουρτζή – Χατζοπούλου για τις χρήσιμες διορθώσεις τους.

## ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

<b>ΑΑΠ:</b>	Ανοιχτό Αναγνωστικό Πλαίσιο / ORF, Open Reading Frame
<b>ΑΑΠ1:</b>	Ανοιχτό Αναγνωστικό Πλαίσιο 1 / ORF1, Open Reading Frame 1
<b>ΑΑΠ2:</b>	Ανοιχτό Αναγνωστικό Πλαίσιο 2 / ORF2, Open Reading Frame 2
<b>ΑΑΠ3:</b>	Ανοιχτό Αναγνωστικό Πλαίσιο 3 / ORF3, Open Reading Frame 3
<b>ΑΑΣΧ:</b>	Αναπνευστικό και Αναπαραγωγικό Σύνδρομο των Χοίρων
<b>ΑΣΧ:</b>	Αναπνευστικό Σύμπλεγμα των Χοίρων
<b>ΠΣΑΑΧ:</b>	Πολυσυστηματικό Σύνδρομο Απίσχνασης των Απογαλακτισμένων Χοιριδίων
<b>ΣΔΝΧ:</b>	Σύνδρομο Δερματίτιδας και Νεφροπάθειας των Χοίρων
<b>IgA:</b>	Ανοσοσφαιρίνη Α
<b>IgM:</b>	Ανοσοσφαιρίνη Μ
<b>IgG:</b>	Ανοσοσφαιρίνη G
<b>IPMA:</b>	Τεχνική της ανοσοϋπεροξειδάσης
<b>MEM:</b>	Minimum Essential Medium (Θρεπτικό υπόστρωμα)
<b>PCR:</b>	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης
<b>PK-15:</b>	Συνεχής κυτταρική σειρά από νεφρικά κύτταρα χοίρου
<b>primers:</b>	Ζεύγη εκκινητικών μορίων

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο κυκλοϊός 2 του χοίρου είναι ο αιτιολογικός παράγοντας του Πολυσυστηματικού Συνδρόμου Απίσχυασης των Απογαλακτισμένων Χοιριδίων (ΠΣΑΑΧ). Ο ιός έχει ανιχνευθεί και σε ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων όπως είναι το Σύνδρομο Δερματίτιδας και Νεφροπάθειας του Χοίρου (ΣΔΝΧ), το Αναπνευστικό Σύμπλεγμα του Χοίρου (ΑΣΧ), η νεογνική μυοκαρδίτιδα, η εξιδρωματική επιδερμίτιδα, τα αναπαραγωγικά προβλήματα σε χοιρομητέρες και η συγγενής χορεία. Στην Ελλάδα η πρώτη αναφορά του ΠΣΑΑΧ και του ΣΔΝΧ έγινε το 2002 (Saoulidis και συν., 2002).

Η παρούσα μελέτη χωρίζεται σε τρία μέρη. Στο πρώτο μέρος εξετάστηκε εάν τα Ελληνικά στελέχη του κυκλοϊού 2 απαντώνται σε παθολογικές καταστάσεις εκτός του ΠΣΑΑΧ και του ΣΔΝΧ. Για το σκοπό αυτό λήφθηκαν δείγματα οργάνων από χοίρους που εμφάνιζαν ΠΣΑΑΧ, ΣΔΝΧ, καθώς και ποικίλα κλινικά συμπτώματα, τα οποία εξετάστηκαν ιολογικά και ιστοπαθολογικά. Ακολούθησε προσδιορισμός της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων εννέα στελεχών του ιού που ανιχνεύθηκαν από χοίρους που νοσούσαν από διαφορετικά κλινικά σύνδρομα. Πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση στην οποία συμπεριληφθήκαν τα Ελληνικά στελέχη του ιού, καθώς και στελέχη που προέρχονταν από άλλες χώρες, με σκοπό να προκύψουν τα πρώτα επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με την προέλευση των Ελληνικών στελεχών.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης διερευνήθηκε εάν ο ιός μολύνει τους Ελληνικούς αγριόχοιρους (*Sus Scrofa*) και εάν η λοίμωξη οδηγεί στην πρόκληση του ΠΣΑΑΧ. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η ακολουθία των νουκλεοτιδίων σε δύο στελέχη του ιού από αγριόχοιρους και εκτιμήθηκε αν ο ιός μεταδίδεται ανάμεσα στους αγριόχοιρους και αν εμφανίζει ειδικότητα ξενιστή.

Στο τρίτο μέρος της μελέτης διερευνήθηκε η παθογόνος δράση ενός Ελληνικού στελέχους του ιού που απομονώθηκε από φυσικό περιστατικό νεκρωτικής λεμφαδενίτιδας. Πραγματοποιήθηκε πειραματική μόλυνση χοιριδίων ηλικίας 33 ημερών, για να διαπιστωθεί αν η πρόκληση νεκρωτικής λεμφαδενίτιδας αποτελεί χαρακτηριστική ιδιότητα του στελέχους του ιού ή αν υπεισέρχονται και άλλοι παράγοντες. Στην κατεύθυνση αυτή εξετάστηκε η επίδραση που είχαν η δόση του ιού (χαμηλή ή υψηλή)

και η χορήγηση ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο στην εξέλιξη της λοίμωξης από τον ιό.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

## **1. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση**

### **1.1 Ταξινόμηση**

Η οικογένεια *Circoviridae* περιλαμβάνει τα γένη *Circovirus* και *Gyrovirus*. Στο γένος *Circovirus* (Pringle, 1999) ταξινομούνται ο κυκλοϊός 1 (PCV1) (Mankertz και συν., 1997) και ο κυκλοϊός 2 του χοίρου (PCV2) (Hamel και συν., 1998), ο ιός της νόσου του ράμφους και του πτερώματος των ψιττακοειδών (BFDV) (Ritchie και συν., 1989), ο κυκλοϊός της χήνας (GoCV) (Todd και συν., 2001), ο κυκλοϊός του καναρινιού (CaCV) (Phenix και συν., 2001), ο κυκλοϊός του περιστεριού (PiCV) (Todd και συν., 2001) και ο κυκλοϊός της πάππιας (DuCV) (Hattermann και συν., 2003). Στο γένος *Gyrovirus* ανήκει ο ιός της λοιμώδους αναιμίας των ορνιθίων (CAV) (Kato και συν., 1995).

### **1.2 Ιστορική Αναδρομή**

Ο κυκλοϊός 1 του χοίρου διαπιστώθηκε το 1974, ως επιμόλυνση της συνεχούς κυτταρικής σειράς PK-15 (ATCC-CCL31), η οποία προέρχεται από κύτταρα νεφρού χοίρου (Tischer και συν., 1974). Ο ιός δεν προκαλεί κυτταροπαθολογικό αποτέλεσμα στα κύτταρα PK-15 και δεν είναι παθογόνος για τους χοίρους (Allan και συν., 1995, Tischer και συν., 1986).

Το 1991 παρατηρήθηκε σε θηλάζοντα χοιρίδια στον Καναδά μια νέα παθολογική κατάσταση, η οποία χαρακτηριζόταν από καθυστέρηση στην ανάπτυξη, ωχρότητα του δέρματος και αυξημένη θνησιμότητα. Το νόσημα ονομάστηκε Πολυσυστηματικό Σύνδρομο Απίσχυσης των Απογαλακτισμένων Χοιριδίων (ΠΣΑΑΧ) (Harding και Clark 1997). Το 1998 ένας ιός που έμοιαζε μορφολογικά με τον κυκλοϊό 1 απομονώθηκε από χοίρους με ΠΣΑΑΧ (Allan και συν., 1998β, Meehan και συν., 1998).

Η ανάλυση της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων του κυκλοϊού που συσχετίστηκε με το ΠΣΑΑΧ έδειξε ότι είχε σημαντικές διαφορές στο γένωμά του, σε σχέση με εκείνον που απομονώθηκε από τα κύτταρα PK-15. Ο νέος ιός ονομάστηκε κυκλοϊός 2 του χοίρου (PCV2) (Hamel και συν., 1998).

### **1.3 Φυσικοχημικές Ιδιότητες**

Ο κυκλοϊός του χοίρου είναι μικρός (διάμετρος 17 nm) χωρίς φάκελο ιός και έχει εικοσαεδρική συμμετρία. Το γένωμά του αποτελείται από ένα μονόκλωνο, κυκλικό DNA μόριο αρνητικής πολικότητας (Tischer 1982). Ο κυκλοϊός 1 έχει πυκνότητα 1.33 έως 1.37 g/cm<sup>3</sup> σε χλωριούχο καίσιο (Allan και συν., 1994, Tischer και συν., 1974) και δε συγκολλά τα ερυθρά αιμοσφαίρια χοίρου, πρόβατου, βοοειδών, ορνίθων, ινδορνίθων και ινδικών χοιριδίων (Allan και συν., 1994).

Ο κυκλοϊός του χοίρου είναι ανθεκτικός σε συνθήκες περιβάλλοντος και παραμένει λοιμογόνος σε pH 3 και θέρμανση στους 56°C έως 70°C για 15 λεπτά (Allan και συν., 1994). Τα απολυμαντικά που περιέχουν τεταρτοταγείς ενώσεις του αμμωνίου και φαινόλη είναι αποτελεσματικά για την αδρανοποίηση του κυκλοϊού 2 in vitro (Royer και συν., 2000).

### **1.4 Γεωγραφική εξάπλωση του κυκλοϊού 2 του χοίρου**

Ο κυκλοϊός 2 του χοίρου έχει παγκόσμια εξάπλωση και οροαρνητικές εκτροφές είναι δύσκολο να βρεθούν (Larochelle και συν., 2003, Rose και συν., 2003).

Η ύπαρξη του κυκλοϊού 2 διαπιστώθηκε την τελευταία δεκαετία, αλλά αντισώματα έναντι του ιού ανιχνεύθηκαν σε ορούς αίματος, που χρονολογούνται από το 1973 στη Βόρεια Ιρλανδία (Walker και συν., 2000) και το 1985 στον Καναδά, την Ισπανία (Segales και Domingo, 2002) και το Βέλγιο (Mesu και συν., 2000). Αντιγόνο και νουκλεϊκό οξύ του ιού ανιχνεύθηκαν σε ιστούς χοίρων από το 1970 (Grierson και συν., 2004).

### **1.5 Οργάνωση γενώματος**

#### **1.5.1 Ανοιχτά Αναγνωστικά Πλαίσια**

Στο γένωμα του κυκλοϊού του χοίρου θεωρείται ότι υπάρχουν έντεκα Ανοιχτά Αναγνωστικά Πλαίσια (ΑΑΠ, Open Reading Frame, ORF) (Hamel και συν., 1998) και έχουν διερευνηθεί τα ΑΑΠ1, ΑΑΠ2 και ΑΑΠ3.

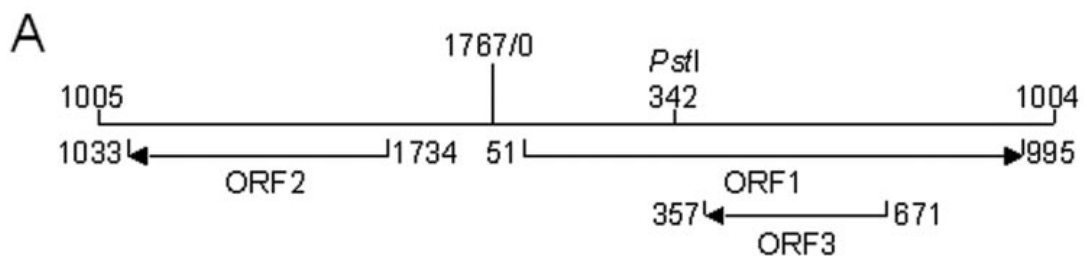
Το ΑΑΠ1 αποτελείται από 936 νουκλεοτίδια για τον κυκλοϊό 1 και 942 για τον κυκλοϊό 2 (Σχήμα 1). Κωδικοποιεί το γονίδιο της ρεπλικάσης, που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση των πρωτεϊνών Rep και Rep' (RepP, Rep'P) οι οποίες είναι απαραίτητες για τον

πολλαπλασιασμό του ιού (Cheung, 2003, Mankertz και συν., 1997, Meehan και συν., 1997).

Το ΑΑΠ2 βρίσκεται στη συμπληρωματική αλυσίδα του γενώματος του ιού που συντίθεται στον ξενιστή κατά τον πολλαπλασιασμό του (Σχήμα 1). Κωδικοποιεί το γονίδιο για την πρωτεΐνη της κάψας (CapP) που είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη του ιού. Το ΑΑΠ2 αποτελείται από 699 νουκλεοτίδια και για τους δύο ιούς (Mankertz και συν., 1998, Nawagitgul και συν., 2000).

Το ΑΑΠ3 βρίσκεται στη συμπληρωματική αλυσίδα του γενώματος του ιού μέσα στο ΑΑΠ1 (Σχήμα 1) (Liu και συν., 2005). Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στη διαδικασία της «απόπτωσης» που προκαλεί ο ιός *in vitro* και *in vivo*. Το ΑΑΠ3 αποτελείται από 612 νουκλεοτίδια για τον κυκλοϊό 1 και 315 για τον κυκλοϊό 2 (Liu και συν., 2005, Liu και συν., 2006).

Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση του γενώματος του κυκλοϊού 2 του χοίρου



### 1.5.2 Σημείο έναρξης της αντιγραφής του ιού

Το σημείο έναρξης της αντιγραφής του κυκλοϊού (*ori*) βρίσκεται μεταξύ του ΑΑΠ1 και του ΑΑΠ2 και περιλαμβάνει τον προαγωγέα του γονιδίου της ρεπλικάσης. Το *ori* αποτελείται από 111 ζεύγη βάσεων μεταξύ των νουκλεοτιδίων 728 και 838 του γενώματος του κυκλοϊού 1. Αντίστοιχο τμήμα υπάρχει και στο γένωμα του κυκλοϊού 2 (Mankertz και συν., 1997).

Το *ori* είναι το σημείο από το οποίο αρχίζει η σύνθεση του θετικού (+) κλώνου του ιού και αποτελείται από χαρακτηριστικές ακολουθίες νουκλεοτιδίων. Ειδικότερα, μια αντίστροφα επαναλαμβανόμενη ακολουθία σχηματίζει «καμπύλη ή φούρκα», στην κορυφή της οποίας υπάρχει μια ακολουθία νουκλεοτιδίων (nonamer) (5'-T/AAGTATTAC-3') που έχει διαπιστωθεί σε όλους τους κυκλοϊούς. Τα nonamer των

δύο ιών διαφέρουν τόσο στον αριθμό (12 με 10 νουκλεοτίδια), όσο και στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. Για τον κυκλοϊό 1 το nonamer έχει την ακολουθία **CTGTAGTATT** ↓AC, ενώ για τον κυκλοϊό 2 την ακολουθία **TAAGTATT** ↓AC. Ωστόσο, στους δύο ιούς υπάρχει ένα όμοιο οκτανουκλεοτίδιο (υπογραμμισμένο), το οποίο είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό του DNA του κυκλοϊού 1 (Mankertz και συν., 1997). Δίπλα στη συγκεκριμένη ακολουθία υπάρχει η εξαμερής επαναλαμβανόμενη ακολουθία 5'-CGGCAG τέσσερις φορές (H1-H4). Τα εξαμερή H2 και H3 χωρίζονται από μια ακολουθία πέντε νουκλεοτιδίων. Το H4 έχει διαφορά σε ένα νουκλεοτίδιο σε σχέση με τα υπόλοιπα εξαμερή (5'-CGTCAG). Το ελάχιστο σημείο δέσμευσης (MBS) των πρωτεϊνών Rep και Rep' για τον πολλαπλασιασμό του ιού, αποτελείται από το 3' άκρο της αντίστροφης επανάληψης και τα εξαμερή H1 και H2 (Steinfeldt και συν., 2001).

## 1.6 Είσοδος του ιού στο κύτταρο

Ο κυκλοϊός 2 έχει διαπιστωθεί in vivo σε διάφορους τύπους κυττάρων, όπως είναι τα λεμφοκύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Η ανίχνευση του κυκλοϊού 2 σε διάφορους τύπους κυττάρων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι εισέρχεται στα κύτταρα μέσω ενός υποδοχέα ο οποίος εκφράζεται συχνά (Misinzo και συν., 2006). Ειδικότερα, ο ιός χρησιμοποιεί υποδοχείς γλυκοζαμινογλυκανών (GAG). Στην πρωτεΐνη της κάψας του ιού διαπιστώθηκε η ακολουθία αμινοξέων 'Ile-Arg-Lys-Val-Lys-Val', η οποία είναι διατηρημένη ανάμεσα στα στελέχη και αντιστοιχεί στο μοτίβο XBBXBX (όπου B αντιστοιχεί σε βασικό αμινοξύ και όπου X σε ουδέτερο/υδρόφοβο αμινοξύ) για έναν υποδοχέα των γλυκοζαμινογλυκανών (Misinzo και συν., 2006).

Ο ιός συνδέεται σε υποδοχείς που κατανέμονται σε ολόκληρη την επιφάνεια των μονοκυττάρων για να εισέλθει σε αυτά. Τα ιϊκά σωματίδια εντοπίζονται μαζί με τη κλαθρίνη και η μόλυνση από τον ιό περιορίζεται μετά από χρήση χημικών αναστολέων που εμποδίζουν την ενδοκύττωση μέσω υποδοχέων που βρίσκονται σε βοθρία της μεμβράνης καλυμένα με κλαθρίνη. Για τη μόλυνση των κυττάρων απαιτείται όξινο περιβάλλον (Misinzo και συν., 2005).

## 1.7 Αντιτύπωση

Δύο προϊόντα του γονιδίου της ρεπλικάσης, οι πρωτεΐνες Rep και Rep' (RepP, Rep'P), είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του ιού (Cheung, 2003c, 2004a, Mankertz και Hillenbrand, 2001). Η Rep'P έχει μικρότερο αριθμό αμινοξέων σε σχέση με τη RepP και το καρβοξυ-τελικό άκρο της (C-terminus) εκφράζεται σε διαφορετικό ΑΑΠ. Οι δύο πρωτεΐνες ενώνονται με διατηρημένες ακολουθίες νουκλεοτιδίων στο γένωμα του ιού *in vitro*. Η RepP εμφανίζει ομοιότητες με τις πρωτεΐνες των nanoviruses και geminiviruses. Στο αμινο-τελικό άκρο των δύο πρωτεϊνών έχουν διαπιστωθεί τρεις διατηρημένες περιοχές (I, II, III), οι οποίες απαντώνται στα ένζυμα που συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό μέσω του μηχανισμού του κυλιόμενου κύκλου. Η RepP, αλλά όχι η Rep'P εμφανίζει την ακολουθία GKS (P-loop), στην οποία ενώνονται τα δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs). Οι πρωτεΐνες κόβουν τον ιικό κλώνο μεταξύ των νουκλεοτιδίων 7 και 8 στην ακολουθία nonamer που βρίσκεται στην κορυφή της «καμπύλης» (loop) και συνδέουν μονόκλωνα τμήματα του ιικού DNA (Finsterbush και συν., 2006).

Μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο, το μονόκλωνο DNA γένωμα μετατρέπεται σε δίκλωνο, το οποίο ονομάζεται DNA αντιγραφόμενης μορφής και χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την αντιτύπωση του ιού. Οι Rep και Rep' ενώνονται στις εξαμερείς επαναλαμβανόμενες ακολουθίες που βρίσκονται μέσα στο οτί, κόβουν τον ιικό κλώνο ανάμεσα στα νουκλεοτίδια 7 και 8 της αλληλουχίας nonamer και ενώνονται στο 5'-άκρο του DNA. Το αποτέλεσμα είναι να δημιουργηθεί ένα ελεύθερο 3'-OH άκρο, το οποίο δίνει το έναυσμα για τη σύνθεση του θετικού (+) κλώνου. Αφού ολοκληρωθεί ένας κύκλος αντιγραφής, ένα δεύτερο κόψιμο τερματίζει τη σύνθεση του DNA και δημιουργείται ένα κυκλικό μονόκλωνο μόριο DNA.

## 1.8 Μεταγραφή

Το ΑΑΠ1 κωδικοποιεί το γονίδιο της ρεπλικάσης και μεταγράφεται στο Rep, δηλαδή το αρχικό RNA αντίγραφο από το οποίο προέρχονται τέσσερα RNA (Rep', Rep3a, Rep3b και Rep3c). Τα πέντε RNA αντίγραφα έχουν κοινά 5' και 3' άκρα και κωδικοποιούνται από τα νουκλεοτίδια 18 μέχρι 1004. Από το Rep (RNA) προέρχεται η πρωτεΐνη Rep (RepP), που κωδικοποιείται από τα νουκλεοτίδια 51 έως 992 και

αποτελείται από 233 αμινοξέα. Το Rep' (RNA) κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Rep' (Rep'P), η οποία αποτελείται από 178 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη κωδικοποιείται από τα νουκλεοτίδια 51 έως 967 με την παρεμβολή ενός ιντρονίου 394 νουκλεοτιδίων (Cheung, 2003a). Οι πρωτεΐνες Rep και Rep' είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του ιού (Meehan και συν., 1997, Mankertz και συν. 1997, 1998). Τα υπόλοιπα RNA (Rep3a, Rep3b και Rep3c) κωδικοποιούν πρωτεΐνες που έχουν άγνωστη λειτουργία (Cheung, 2003a).

Το RNA για την πρωτεΐνη της κάψας (CP), αρχίζει από το νουκλεοτίδιο 469 έως το 1005, με μια περιοχή σύνδεσης μεταξύ των νουκλεοτιδίων 361 έως 1737. Η πρωτεΐνη της κάψας (CapP) κωδικοποιείται από τα νουκλεοτίδια 1735 έως 1036 και αποτελείται από 233 αμινοξέα (Cheung, 2003a).

Επίσης, έχουν διαπιστωθεί τρία RNA (NS0, NS515 και NS672), τα οποία έχουν κοινά 3' άκρα και καθένα από αυτά μεταγράφεται ανεξάρτητα από το δικό του εκκινήτη, ο οποίος βρίσκεται μέσα στο ΑΑΠ1. Τα NS515 και NS672 (RNA) δε φαίνεται να κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες (Cheung, 2003a).

### **1.9 Τρόποι μετάδοσης του κυκλοϊού 2 του χοίρου**

Ο κυκλοϊός 2 του χοίρου απεκκρίνεται μέσω της σιέλου, των ρινικών εκκρίσεων, των κοπράνων (Segales και συν., 2005, Shibata και συν., 2003) και του σπέρματος (Hamel και συν., 2000). Επίσης, έχει παρατηρηθεί κάθετη μετάδοση (από τη μητέρα στο έμβρυο), που πιθανολογείται ότι αποτελεί τον κυριότερο τρόπο μόλυνσης των εμβρύων σε σύες που εμφανίζουν αναπαραγωγικά προβλήματα (Kim και συν., 2004, Ladekjaer-Mikkelsen και συν., 2001, Park και συν., 2005, West και συν., 1999).

### **1.10 Σύγκριση στελεχών κυκλοϊού 2 του χοίρου**

Ο κυκλοϊός 1 και ο κυκλοϊός 2 του χοίρου ταξινομούνται σε διαφορετικούς γενότυπους με περίπου 80% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (Hamel και συν., 1998, Meehan και συν., 1998) και 75% ομοιότητα σε επίπεδο αμινοξέων (Morozon και συν., 1998). Το ΑΑΠ1 των δύο ιών εμφανίζει ομοιότητα 83% έως 85% σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και 86% σε επίπεδο αμινοξέων (Morozon και συν., 1998, Mankertz και συν., 2003). Αντίθετα, στο ΑΑΠ2 η ομοιότητα είναι 62% έως 67% σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και 65% σε επίπεδο αμινοξέων (Mankertz και συν., 2003).

Τα στελέχη του ιού που ανήκουν στον ίδιο γενότυπο εμφανίζουν ομοιότητα μεγαλύτερη από 90% σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων. Το ΑΑΠ1 είναι περισσότερο διατηρημένο σε σχέση με το ΑΑΠ2. Στο ΑΑΠ3, η ομοιότητα σε επίπεδο αμινοξέων είναι 61.5% για τα στελέχη του κυκλοϊού 1 και 94.5% για τα στελέχη του κυκλοϊού 2 (Liu και συν., 2005).

Στελέχη του κυκλοϊού 2 που ανιχνεύθηκαν από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές εμφάνιζαν μεγαλύτερη από 95% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Οι διαφορές στο γένωμά τους ήταν μικρές και δε συσχετίστηκαν με την περιοχή προέλευσης των στελεχών (Mankertz και συν., 2000). Επίσης, στελέχη του ιού που ανιχνεύθηκαν από χοίρους με ΠΣΑΑΧ ή ασυμπτωματική λοίμωξη είχαν μεγάλη ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων (Larochelle και συν., 2003, Pogradichniy και συν., 2002, de Boissesson και συν., 2004).

Η ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων ήταν μεγαλύτερη από 96% για στελέχη του ιού που ανιχνεύθηκαν από χοίρους που νοσούσαν από διαφορετικά κλινικά σύνδρομα (Larochelle και συν., 2002). Η νουκλεοτιδική διακύμανση ήταν 97% έως 100% για το ΑΑΠ1 και 93% έως 100% για το ΑΑΠ2 (Larochelle και συν., 2002). Οι Wen και συν. (2005) διαπίστωσαν ότι η ομοιότητα των στελεχών από διαφορετικά κλινικά σύνδρομα για το ΑΑΠ2 ήταν 90.5% έως 99.5% σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και 88% έως 100% σε επίπεδο αμινοξέων. Η σύγκριση της ακολουθίας των αμινοξέων στην πρωτεΐνης της κάψας έδειξε τρεις περιοχές (59-80 ή 57-90, 121-136, 180-191) που εμφάνιζαν πολυμορφισμούς (Larochelle και συν., 2002, Wen και συν., 2005). Δύο από αυτές βρίσκονταν μέσα σε ανοσοενεργές περιοχές (65-87 και 113-147), που είχαν ανιχνευθεί με Pepscan ανάλυση (Mahé και συν., 2000). Οι πολυμορφισμοί που παρατηρήθηκαν δε συσχετίστηκαν με στελέχη που προέρχονταν από διαφορετικά κλινικά σύνδρομα (Larochelle και συν., 2002, Pogradichniy και συν., 2002, de Boissesson και συν., 2004).

Στελέχη του κυκλοϊού 2 απομονώθηκαν από αγριόχοιρους με υποκλινική λοίμωξη και ΠΣΑΑΧ εμφάνιζαν μεγάλη ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων τόσο μεταξύ τους, όσο και με στελέχη που απομονώθηκαν από οικόσιτους χοίρους με υποκλινική λοίμωξη και ΠΣΑΑΧ (Csagola και συν., 2006, Knell και συν., 2005, Schulze και συν., 2004).

### **1.11 Ανοσία έναντι του κυκλοϊού 2 του χοίρου**

Η μόλυνση των χοίρων από κυκλοϊό 2 οδηγεί στην ενεργοποίηση της χυμικής και της κυτταρικής ανοσίας.

Οι χοίροι με υποκλινική λοίμωξη ή ΠΣΑΑΧ εμφανίζουν χυμική ανοσολογική απάντηση στον ιό με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Ο προστατευτικός ρόλος των αντισωμάτων αμφισβητείται, ενώ οι διαφορές στην πρωτεΐνη της κάψας που εμφανίζουν τα στελέχη φαίνεται ότι επηρεάζουν την ανοσολογική απάντηση (Meerts και συν., 2006).

Η επίδραση του κυκλοϊού 2 στην κυτταρική ανοσία έχει μελετηθεί τόσο σε πειραματικές μελέτες, όσο και σε φυσικά περιστατικά. Σε χοίρους με ΠΣΑΑΧ παρατηρείται λευκοπενία, που αφορά τα Β-λεμφοκύτταρα, τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK-κύτταρα) και υποπληθυσμούς των Τ-λεμφοκυττάρων, αλλά όχι τα μονοκύτταρα. Τα μονοκύτταρα / μακροφάγα μεταναστεύουν στο λεμφικό ιστό ο οποίος εμφανίζει αραίωση του αριθμού των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων κατά την εξέλιξη του νοσήματος. Ο λεμφικός ιστός διηθείται από μακροφάγα / ιστιοκύτταρα και τελικά από γιγαντοκύτταρα στα οποία ανιχνεύεται αντιγόνο ή /και ιϊκό DNA (Nielsen και συν., 2003).

### **1.12 Πολυσυστηματικό Σύνδρομο Απίσχυσης των Απογαλακτισμένων Χοιριδίων**

#### **1.12.1 Εισαγωγή**

Η πρώτη αναφορά του Πολυσυστηματικού Συνδρόμου Απίσχυσης των Απογαλακτισμένων Χοιριδίων (ΠΣΑΑΧ) έγινε στον Καναδά (Harding και Clark, 1997). Το νόσημα παρατηρήθηκε σε χοιρίδια μετά τον απογαλακτισμό και χαρακτηριζόταν από απίσχυση, ωχρότητα του δέρματος και σπανιότερα ίκτερο. Τα προσβλημένα χοιρίδια εμφάνιζαν αλλοιώσεις σε διάφορα όργανα και ιδιαίτερα στο λεμφικό ιστό.

#### **1.12.2 Αιτιολογία**

Ο αιτιολογικός παράγοντας του ΠΣΑΑΧ θεωρείται ότι είναι ο κυκλοϊός 2 του χοίρου. Σε ορισμένες περιπτώσεις, για την κλινική εκδήλωση του νοσήματος απαιτούνται και άλλοι παράγοντες, εκτός από τη μόλυνση των χοίρων με τον ιό. Ειδικότερα, χοίροι που μολύνθηκαν πειραματικά με κυκλοϊό 2 και παρβοϊό (Ellis και συν., 1999, Kennedy και συν., 2000) ή με κυκλοϊό 2 και τον ιό του Αναπαραγωγικού και Αναπνευστικού Συνδρόμου των Χοίρων (ΑΑΣΧ) (Allan και συν., 2000β, Harms και συν., 2001)

εμφάνισαν σοβαρή κλινική νόσο. Επιπλέον, διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος με ανοσοενισχυτική ουσία (Krakowka και συν., 2001, Kyriakis και συν., 2002) ή πρόκληση ανοσοκαταστολής (Kawashima και συν., 2003) επιδείνωσαν την κλινική εικόνα του νοσήματος.

### **1.12.3 Γεωγραφική εξάπλωση**

Το ΠΣΑΑΧ έχει παγκόσμια εξάπλωση, εκτός από την Αυστραλία, όπου ως το 2000 δεν είχαν αναφερθεί κρούσματα (Allan και Ellis, 2000).

Το νόσημα έχει διαπιστωθεί σε πολλές χώρες της Ευρώπης, όπως στην Ιρλανδία (Spillane, 1998), τη Δανία (Allan και συν., 1999), την Ισπανία (Allan και συν., 1999), την Ολλανδία (Wellenberg και συν., 2000), την Ελλάδα (Saoulidis και συν., 2002), τη Τσεχία (Celer και συν., 2002), τη Σουηδία (Wallgren και συν., 2004), την Κροατία (Jemersic και συν., 2004) και τη Βουλγαρία (Motovski και Segales, 2004).

Επίσης, το ΠΣΑΑΧ έχει διαπιστωθεί σε χώρες της Βορείου και Νοτίου Αμερικής (Allan και συν., 1998, Harding και Clark, 1997, Sarradell και συν., 2002), της Ασίας (Onuki και συν., 1999, Maldonado και συν., 2004) και της Αφρικής (Drew και συν., 2004).

Αντιγόνο του ιού ανιχνεύθηκε σε ιστοτεμάχια χοίρων στα οποία διαπιστώθηκαν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις συμβατές με εκείνες που παρατηρούνται στο ΠΣΑΑΧ και τα οποία χρονολογούνται από το 1986 στην Ισπανία (Rodriguez-Arrioja και συν., 2003) και την Ελβετία (Staebler και συν., 2005), το 1989 στην Ιαπωνία (Mori και συν., 2000) και το 1993 στην Ταϊλάνδη (Kiatipattanasakul-Banlunara και συν., 2002).

### **1.12.4 Μετάδοση και απέκκριση του ιού**

Ο κυκλοϊός 2 μεταδίδεται στους χοίρους κυρίως με την εισπνοή μολυσμένων μικροσταγονιδίων και μέσω της πεπτικής οδού. Η μετάδοση του ιού γίνεται γρηγορότερα όταν στο ίδιο κελί υπάρχει μεγάλος αριθμός χοίρων που έρχονται σε άμεση επαφή, ιδιαίτερα κατά την περίοδο του απογαλακτισμού και της πάχυνσης. Μέχρι σήμερα, δεν έχει διαπιστωθεί άλλος τρόπος μετάδοσης του ιού, που να οδηγεί στην κλινική εκδήλωση του ΠΣΑΑΧ (Sibila και συν., 2004).

Ο κυκλοϊός 2 του χοίρου αποβάλλεται στο περιβάλλον με τα κόπρανα, τα ούρα και τις ρινικές, οφθαλμικές και στοματοφαρυγγικές εκκρίσεις όσων χοίρων νοσούν από ΠΣΑΑΧ (Bolin και συν., 2001, Shibata και συν., 2003, Sibila και συν., 2004).

#### **1.12.5 Παθογένεια**

Η παθογένεια του ΠΣΑΑΧ δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Πιστεύεται ότι ο αρχικός πολλαπλασιασμός του ιού λαμβάνει χώρα στα μακροφάγα κύτταρα και τα κύτταρα του λεμφικού ιστού των αμυγδαλών, των λεμφογαγγλίων ή των πλακών του Peyer, στην περίπτωση που ο ιός εισέλθει στον οργανισμό από το στόμα (Rosell και συν., 1999). Ο ιός μεταφέρεται με τη λέμφο ή / και αιματογενώς με τα μακροφάγα και διασπείρεται σε πολλά όργανα (Rosell και συν., 1999).

Οι παράγοντες που ενεργοποιούν την προσέλκυση των μονοκυττάρων στο λεμφικό ιστό δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Η διήθηση από τα μακροφάγα κύτταρα επέρχεται στα αρχικά στάδια της λοίμωξης και συμπίπτει χρονικά με τις μακροσκοπικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται στο λεμφικό ιστό (Rosell και συν., 1999). Κατά την εξέλιξη του νοσήματος, η αραίωση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων στο λεμφικό ιστό και η διήθηση με μακροφάγα / πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα γίνονται λιγότερο έντονες (Quintana και συν., 2001).

#### **1.12.6 Κλινικά συμπτώματα**

Το ΠΣΑΑΧ εμφανίζεται συνήθως σε χοίρους ηλικίας 5 έως 13 εβδομάδων. Το νόσημα όμως, έχει αναφερθεί σε χοίρους ηλικίας 12 έως 14 εβδομάδων ή σε χοίρους κάθε ηλικίας (Harding, 1996).

Τα κυριότερα κλινικά συμπτώματα που παρατηρούνται είναι απίσχναση, δύσπνοια, διάρροια, ωχρότητα του δέρματος και ίκτερος στο δέρμα και τους ορατούς βλεννογόνους. Σπανιότερα, οι προσβεβλημένοι χοίροι εμφανίζουν βήχα, πυρετό, γαστρικά έλκη και μηνιγγίτιδα, ενώ μπορεί να επέλθει αιφνίδιος θάνατος (Harding, 1997, Harding και Clark, 1997).

Ορισμένα από τα κλινικά συμπτώματα γίνονται πιο έντονα ή είναι αποτέλεσμα δευτερογενών λοιμώξεων. Ειδικότερα, σε εκτροφές με ΠΣΑΑΧ έχουν αναφερθεί και άλλα νοσήματα, όπως το Αναπαραγωγικό και Αναπνευστικό Σύνδρομο των Χοίρων

(ΑΑΣΧ), η νόσος του Audjesky, η νόσος του Glässer, η στρεπτοκοκκική μηνιγγίτιδα, η σαλμονέλλωση, η κολοβακτηριδίαση μετά τον απογαλακτισμό, η διαιτητική ηπάτωση και η πυώδης βρογχοπνευμονία από *Pasteurella haemolytica*, *Bordetella bronchiseptica* και *Streptococcus suis* (Madec και συν., 2000).

### **1.12.7 Μακροσκοπικές αλλοιώσεις**

Οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται σε χοίρους με ΠΣΑΑΧ ποικίλλουν κατά περίπτωση και δε θεωρούνται παθογνωμονικές για τη διάγνωση του νοσήματος. Συχνότερα προσβάλλονται τα λεμφογάγγλια και οι πνεύμονες.

Τα επιπολής βουβωνικά, υπογνάθια, μεσεντέρια και βρογχικά λεμφογάγγλια εμφανίζονται διογκωμένα κατά τα αρχικά στάδια της νόσου. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι φυσιολογικά ή μικρότερα σε μέγεθος (Rosell και συν., 1999). Περιστασιακά, στα λεμφογάγγλια παρατηρούνται περιοχές νέκρωσης με πολυεστιακή κατανομή που είναι ορατές κατά τη μακροσκοπική εξέταση (Segales και συν., 2000β).

Κατά τη διάνοιξη της θωρακικής κοιλότητας, οι πνεύμονες δε συμπύσσονται και είναι ελαστικής σύστασης. Στην επιφάνειά τους παρατηρούνται περιοχές ερυθρού ή / και ωχρού χρώματος κατά περίπτωση (Segales και συν., 2000γ).

Σπανιότερα, παρατηρούνται ίκτερος στο δέρμα και σε άλλους ιστούς, διόγκωση των νεφρών και δευτερογενής βακτηριδιακή βρογχοπνευμονία. Το ήπαρ μπορεί να είναι μικρότερο σε μέγεθος. Η παρουσία γαστροοισοφαγικών ελκών και η συνακόλουθη αιμορραγία σχετίζονται με την ωχρότητα του δέρματος, που συχνά παρατηρείται στο νόσημα (Segales και συν., 2000γ).

Σε χρόνια περιστατικά του συνδρόμου, οι προσβεβλημένοι χοίροι εμφανίζουν απίσχναση (Segales και συν., 2000γ).

### **1.12.8 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις**

Οι χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις του ΠΣΑΑΧ εντοπίζονται στο λεμφικό ιστό. Ειδικότερα, σταθερό εύρημα αποτελεί η αραίωση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων η οποία συνοδεύεται κατά περίπτωση από πολυεστιακή έως διάχυτη, μικρού έως έντονου βαθμού διήθηση από μακροφάγα ή / και πολυπύρνα γιγαντοκύτταρα. Χαρακτηριστικό εύρημα αποτελεί η παρουσία σφαιρικών, ομοιογενών,

βασεόφιλων ενδοκυτταροπλασματικών εγκλείστων στα μακροφάγα κύτταρα (Rosell και συν., 1999).

Η υποξεία διάμεση πνευμονία είναι η συχνότερη αλλοίωση που παρατηρείται στους πνεύμονες (Rosell και συν., 1999). Σε μερικές περιπτώσεις διαπιστώνονται μεγάλα ιστοκύτταρα και πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα στο τοίχωμα των βρόγχων ή / και των κυψελίδων. Σε χρόνια περιστατικά, παρατηρείται ανάπτυξη συνδετικού ιστού στο τοίχωμα των βρογχίων (Segales και συν., 2000β).

Στο ήπαρ διαπιστώνεται διήθηση των πυλαίων διαστημάτων από φλεγμονικά κύτταρα και διόγκωση, κενотоπίωση του κυτταροπλάσματος των ηπατικών κυττάρων, καθώς και νέκρωσή τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται ανάπτυξη συνδετικού ιστού στα μεσολόβια διαστήματα και έντονου βαθμού απώλεια των ηπατικών κυττάρων στα ηπατικά λόβια (Clark, 1997).

Διήθηση από μακροφάγα και λεμφοκύτταρα παρατηρείται στους νεφρούς, το πάγκρεας, το έντερο και το μυοκάρδιο. Επιπλέον, έχει αναφερθεί μετρίου έως έντονου βαθμού κοκκιωματώδης εντερίτιδα με μείωση του ύψους των λαχνών του εντέρου (Segales και συν., 2000γ).

### **1.12.9 Νοσηρότητα και θνησιμότητα**

Η νοσηρότητα και η θνητότητα στις εκτροφές με ΠΣΑΑΧ ποικίλλουν κατά περίπτωση και κυμαίνονται από 4% έως 15 % και από 70% έως 80 %, αντίστοιχα. Σε επιδημίες αυξάνεται το ποσοστό προσβολής, καθώς και η θνησιμότητα των χοίρων μετά τον απογαλακτισμό (Madec και συν., 2000) .

### **1.12.10 Επιδημιολογία**

Η κρίσιμη ηλικία των χοίρων να νοσήσουν είναι από την 5<sup>η</sup> έως τη 13<sup>η</sup> εβδομάδα (Harding, 1996). Η ανταπόκριση των προσβεβλημένων χοίρων στο σύνδρομο διαφέρει. Ορισμένοι χοίροι εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα και πεθαίνουν μέσα σε λίγες ημέρες, ενώ άλλοι επιζούν και εμφανίζουν καθυστέρηση στην ανάπτυξή τους. Στον ίδιο θάλαμο, χοίροι από συγκεκριμένες τοκετομάδες είναι πιο ευπαθείς (Madec και συν., 2000). Τα ευνοησιμμένα αρσενικά είναι πιο ευπαθή σε σχέση με τα θηλυκά. Επίσης, χοίροι με μικρότερο σωματικό βάρος κατά τη γέννηση, την περίοδο της

γαλουχίας ή την αρχή της περιόδου πάχυνσης εμφανίζουν το νόσημα με μεγαλύτερη συχνότητα (Correge και συν., 2001).

Οι πιθανότητες να εμφανιστεί το ΠΣΑΑΧ αυξάνονται, όταν οι παχυνόμενοι χοίροι είναι οροθετικοί για τον παρβοϊό και τον ιό του ΑΑΣΧ, όταν χρησιμοποιούνται στις σύες αντικατάστασης ξεχωριστά εμβόλια για τον παρβοϊό και την ερυθρά αντί για μικτά (Rose και συν., 2003) και όταν οι σύες αντικατάστασης εμβολιάζονται για το ΑΑΣΧ (Lopez-Soria και συν., 2005). Επιπρόσθετα, τα μεγάλα κελιά στους θαλάμους απογαλακτισμού, η χρήση κοινής απολυμαντικής λεκάνης σε γειτονικά κελιά στους θαλάμους πάχυνσης, το υψηλό ποσοστό υιοθεσιών και η χρήση σπέρματος από την εκτροφή, αυξάνουν τις πιθανότητες εμφάνισης του συνδρόμου (Rose και συν., 2003). Επιπλέον έχει διαπιστωθεί ότι η μόλυνση των χοίρων σε νεαρή ηλικία αποτελεί παράγοντα επικινδυνότητας για την κλινική εκδήλωση του νοσήματος (Lopez-Soria και συν., 2005).

Οι πιθανότητες να εμφανιστεί το νόσημα σε μια εκτροφή μειώνονται όταν οι χοιρομητέρες εμβολιάζονται για *E. coli* (Rose και συν., 2003) και ατροφική ρινίτιδα (Lopez-Soria και συν., 2005) και γίνεται συχνή αγωγή για τα εξωπαράσιτα (Rose και συν., 2003). Η ομαδική διαμονή των συών κατά την κυοφορία, η χρήση συών αντικατάστασης από την εκτροφή και η παραμονή των κελιών της γαλουχίας και του απογαλακτισμού κενών για επαρκές χρονικό διάστημα μειώνουν τις πιθανότητες εμφάνισης του νοσήματος (Rose και συν., 2003).

Οι αλλαγές στις συνθήκες εκτροφής και διαχείρισης φαίνεται ότι επηρεάζουν την εμφάνιση του νοσήματος (Allan και Ellis, 2000). Ωστόσο, το ΠΣΑΑΧ έχει παρατηρηθεί σε εκτροφές όπου εφαρμόζονται αυστηρά μέτρα βιοασφάλειας και δεν έγιναν εισαγωγές χοίρων για δύο χρόνια ή μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

### **1.12.11 Διάγνωση**

#### **1.12.11.1 Κλινική διάγνωση**

Τα κλινικά συμπτώματα και οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις αποτελούν ενδείξεις για τη διάγνωση του νοσήματος. Παρόμοια κλινικά συμπτώματα και μακροσκοπικές αλλοιώσεις προκαλούνται από τον ιό του ΑΑΣΧ, τον ιό της γρίπης, τη *Salmonella*, καθώς και από περιβαλλοντικούς και διατροφικούς παράγοντες.

### **1.12.11.2 Εργαστηριακή διάγνωση**

#### *Ανίχνευση ή απομόνωση του ιού*

Η ανίχνευση του κυκλοϊού 2 στους ιστούς δεν επαρκεί για τη διάγνωση, γιατί γενετικό υλικό ή / και αντιγόνο του ιού έχουν ανιχνευθεί σε κλινικά υγιείς χοίρους (Sorden, 2000).

Η απομόνωση του ιού επιτυγχάνεται με ενοφθαλμισμό κατάλληλα παρασκευασμένου εναιωρήματος παθολογικού υλικού σε καλλιέργειες κυττάρων. Το παθολογικό υλικό προέρχεται από λεμφικά όργανα (λεμφογάγγλια, σπλήνας, πλάκες Peyer) ή σπανιότερα από άλλα όργανα (πνεύμονες, ήπαρ, νεφροί). Ο ιός αναπτύσσεται σε κυτταρική σειρά από κύτταρα νεφρού χοίρου (PK-15). Η αντιτύπωσή του στην κυτταροκαλλιέργεια δεν προκαλεί την εμφάνιση κυτταροπαθογόνου αποτελέσματος. Η παρουσία του διαπιστώνεται έμμεσα με ανοσοφθορισμό (Tischer και συν., 1986), τη δοκιμή της ανοσοϋπεροξειδάσης (Albina και συν., 2001) και την εξουδετέρωση με μονοκλωνικά αντισώματα (Allan και συν., 1998β).

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος του ιού σε ιστούς χοίρων που νοσούν από το ΠΣΑΑΧ. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται ζεύγη εκκινητικών μορίων (primers) για τον πολλαπλασιασμό τμημάτων του γενόματος του ιού που αντιστοιχούν στο ΑΑΠ1 και το ΑΑΠ2 (Fenaux και συν., 2000, Mankertz και συν., 2000).

Ο in-situ υβριδισμός εφαρμόζεται για την ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος του ιού σε ιστοπαθολογικές τομές (Kennedy και συν., 2000, McNeilly και συν., 1999, Rosell και συν., 1999).

#### *Ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό των χοίρων*

Η ανίχνευση των αντισωμάτων του κυκλοϊού 2 επιτυγχάνεται με την τεχνική της ανοσοπευροξειδάσης (IPMA) ή του ανοσοφθορισμού (Balasch και συν., 1999, Ellis και συν., 1999) σε κύτταρα PK-15, που έχουν ενοφθαλμιστεί με τον ιό και έχουν αναπτυχθεί σε πλάκες των 96 φρεατίων.

Η ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι του ιού γίνεται και με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA. Για την ανταγωνιστική ELISA χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά

αντισώματα έναντι του ιού και ως αντιγόνο χρησιμοποιείται ιός που έχει πολλαπλασιαστεί σε καλλιέργεια κυττάρων (Walker και συν., 2000). Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι ο ιός πολλαπλασιάζεται δύσκολα σε καλλιέργειες κυττάρων. Υπάρχουν δοκιμές ELISA που χρησιμοποιούν ως αντιγόνο πεπτίδιο (επίτοπος B-133) από την πρωτεΐνη της κάψας του ιού (Mahe και συν., 2000, Truong και συν., 2001). Στην περίπτωση αυτή η τεχνική έχει μεγάλη ειδικότητα και χαμηλή ευαισθησία. Όταν χρησιμοποιείται ως αντιγόνο ολόκληρη η πρωτεΐνη της κάψας, η δοκιμή εμφανίζει μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία (Blanchard και συν., 2003, Nawagitgul και συν., 2002).

#### *Ιστοπαθολογική εξέταση*

Οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στο λεμφικό ιστό, όπως είναι η αραιώση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων και η κοκκιωματώδης φλεγμονή, είναι παθογνωμονικές (Rosell και συν., 1999).

#### **1.12.11.3 Οριστική διάγνωση**

Η οριστική διάγνωση του ΠΣΑΑΧ βασίζεται σε τρία κριτήρια: α) τα κλινικά συμπτώματα, β) τις χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις και γ) την ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος ή / και αντιγόνου του κυκλοϊού 2 στους ιστούς που εμφανίζουν αλλοιώσεις (Sorden, 2000). Ειδικότερα, το αντιγόνο ή το νουκλεϊκό οξύ του ιού, θα πρέπει να ανευρίσκονται σε έναν τουλάχιστο ιστό και να συσχετίζονται με τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις.

#### **1.12.12 Διαφορική διάγνωση**

Το ΠΣΑΑΧ θα πρέπει να διαφοροποιείται από νοσήματα στα οποία παρατηρούνται παρόμοια κλινικά συμπτώματα. Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει το ΑΑΣΧ, καθώς και όλα τα νοσήματα και τις παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από απίσχναση (Harding και Clark, 1997).

### 1.12.13 Πρόληψη

Διαχειριστικά μέτρα, όπως η βελτίωση των συνθηκών υγιεινής και η μείωση των παραγόντων καταπόνησης, συντελούν στη μείωση των οικονομικών επιπτώσεων του ΠΣΑΑΧ, χωρίς να ελέγχουν πλήρως το νόσημα (Madec και συν., 1999).

Ο μικρός αριθμός των χοίρων σε κάθε κελί, ο διαχωρισμός τους ανάλογα με την ηλικία, η εφαρμογή του συστήματος όλα μέσα – όλα έξω, ο καλός αερισμός και οι καλές συνθήκες υγιεινής φαίνεται ότι βοηθούν στον έλεγχο του νοσήματος. Η αποτελεσματικότητα των προαναφερθέντων διαχειριστικών μέτρων πιθανά να συντελεί στον έλεγχο και άλλων λοιμογόνων παραγόντων (ιός ΑΑΣΧ, παρβοϊός) που επιδεινώνουν τη λοίμωξη από κυκλοϊό 2 και έμμεσα οδηγούν στην κλινική εκδήλωση του νοσήματος (Guilmoto και Wessel-Robert, 2000).

Οι σύγχρονοι τρόποι διαχείρισης έχουν αλλάξει τη δυναμική πολλών ιών στις εκτροφές. Ειδικότερα, ο εμβολιασμός για το ΑΑΣΧ αυξάνει το επίπεδο των μητρικών αντισωμάτων έναντι του ιού, με αποτέλεσμα η λοίμωξη να εμφανίζεται σε χοίρους μεγαλύτερης ηλικίας. Το αποτέλεσμα είναι να συμπίπτουν χρονικά η λοίμωξη από τον ιό του ΑΑΣΧ και η οροθετικότητα για τον κυκλοϊό 2. Ο έλεγχος του ΠΣΑΑΧ γίνεται με αλλαγές στον τρόπο διαχείρισης, με σκοπό να τροποποιηθεί η δυναμική τόσο του κυκλοϊού 2, όσο και άλλων λοιμογόνων παραγόντων στην εκτροφή (Guilmoto και Wessel-Robert, 2000).

Πολλά από τα κοινά χρησιμοποιούμενα απολυμαντικά είναι αναποτελεσματικά *in vitro*. Ο καλός καθαρισμός και η απολύμανση των εγκαταστάσεων συντελούν στη μείωση του ιϊκού φορτίου. Η καταπολέμηση του ιού από το περιβάλλον των εκτροφών είναι δύσκολη, διότι ο ιός είναι ιδιαίτερα σταθερός σε συνθήκες περιβάλλοντος (Guilmoto και Wessel-Robert, 2000).

Ένα αδρανοποιημένο εμβόλιο έναντι του κυκλοϊού 2 (Reynaud και συν., 2004α, 2004β) είναι διαθέσιμο σε μερικές Ευρωπαϊκές χώρες. Πρόσφατα το σκεύασμα κυκλοφόρησε και στη χώρα μας. Το εμβόλιο χορηγείται στις σύες και τα νεαρά ζώα αντικατάστασης (Reynaud και συν., 2004α, 2004β). Ωστόσο, δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα, εάν ο εμβολιασμός των συών μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη ή τον έλεγχο του ΠΣΑΑΧ σε επίπεδο εκτροφής.

### **1.13 Πολυσυστηματικό Σύνδρομο Απίσχνωσης των Απογαλακτισμένων Χοιριδίων σε αγριόχοιρους**

Λοίμωξη από τον κυκλοϊό 2 του χοίρου έχει διαπιστωθεί σε αγριόχοιρους (*Sus scrofa*) (Csagola και συν., 2006, Knell και συν., 2005, Schulze και συν., 2004, Toplak και συν., 2004, Vicente και συν., 2004). Στην Ισπανία, διαπιστώθηκε οροθετικότητα στο 47.8 % των αγριόχοιρων (Vicente και συν., 2004). Η οροθετικότητα και ο τίτλος των αντισωμάτων συσχετίστηκαν με τα συστήματα εκτροφής, αφού αγριόχοιροι που προέρχονταν από εντατικές εκτροφές εμφάνιζαν υψηλότερο ποσοστό προσβολής (Vicente και συν., 2004). Ερευνητές από τη Γερμανία (Knell και συν., 2005) διαπίστωσαν με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) ότι το 18.1% των αγριόχοιρων ήταν θετικοί για τον ιό. Επίσης, στην Ουγγαρία ανιχνεύθηκε νουκλεϊκό οξύ του ιού στο 20.5% των αγριόχοιρων που εξετάστηκαν (Csagola και συν., 2006).

Η μόλυνση των αγριόχοιρων από τον κυκλοϊό 2 οδηγεί σε υποκλινική λοίμωξη ή ΠΣΑΑΧ. Το πρώτο περιστατικό του νοσήματος σε αγριόχοιρο αναφέρθηκε στη Γερμανία (Schulze και συν., 2004) και επιβεβαιώθηκε από δεύτερη αναφορά στην Ισπανία (Vicente και συν., 2004). Οι αγριόχοιροι εμφάνισαν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις όμοιες με εκείνες που παρατηρούνται στους εκτρεφόμενους χοίρους που νοσούν από ΠΣΑΑΧ, ενώ παράλληλα νουκλεϊκό οξύ του ιού ανιχνεύθηκε στους ιστούς τους. Τα κλινικά συμπτώματα δεν ήταν δυνατό να καταγραφούν, αφού τα ζώα βρέθηκαν νεκρά και η διάγνωση έγινε μετά το θάνατό τους. Το αποτέλεσμα ήταν να βασιστεί η διάγνωση στις χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις και στην ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος ή αντιγόνου του ιού στους ιστούς που εμφάνιζαν αλλοιώσεις (Schulze και συν., 2004, Toplak και συν., 2004, Vicente και συν., 2004). Το νόσημα παρατηρήθηκε σε αγριόχοιρους μεγαλύτερης ηλικίας (άνω των έξι μηνών) σε σχέση με την ηλικία που εμφανίζεται το νόσημα στους εκτρεφόμενους χοίρους (Schulze και συν., 2004, Vicente και συν., 2004).

Το ποσοστό προσβολής των αγριόχοιρων είναι μικρότερο σε σχέση με εκείνο που παρατηρείται στους εκτρεφόμενους χοίρους, γιατί οι παράγοντες που βοηθούν την εξάπλωση του ιού στις εντατικές εκτροφές των χοίρων (συνθήκες διαβίωσης, υϊκό φορτίο κατά τη μόλυνση, μικρή περίοδος γαλουχίας, εμβολιασμοί) (Vicente και συν., 2004), δεν ισχύουν για την πλειονότητα των αγριόχοιρων.

## **1.14 Παθολογικές καταστάσεις με τις οποίες έχει σχετιστεί ο κυκλοϊός 2**

Ο κυκλοϊός 2 έχει απομονωθεί από χοίρους που εμφάνιζαν ποικίλα κλινικά συμπτώματα. Ειδικότερα, ο ιός ανιχνεύθηκε σε χοίρους με Σύνδρομο Δερματίτιδας και Νεφροπάθειας (ΣΔΝΧ) (Allan και Ellis, 2000, Gresham και συν., 2001, Meehan και συν., 2001), αναπαραγωγικά προβλήματα (Josephson και Charbonneau, 2001, Ladekjaer-Mikkelsen και συν., 2001, O'Connor και συν., 2001, West και συν., 1999), Αναπνευστικό Σύμπλεγμα των Χοίρων (ΑΣΧ) (Allan and Ellis, 2000, Harms και συν., 2002, Kim και συν., 2003), συγγενή χορεία (Stevenson και συν., 2001), εξιδρωματική επιδερμίτιδα (Wattrang και συν., 2002), κοκκιωματώδη εντερίτιδα (Chae, 2004) και νεκρωτική λεμφαδενίτιδα (Chae, 2004). Στη συνέχεια περιγράφονται τα κλινικά σύνδρομα που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα.

### **1.14.1 Σύνδρομο Δερματίτιδας και Νεφροπάθειας των Χοίρων**

#### **1.14.1.1 Εισαγωγή**

Το Σύνδρομο Δερματίτιδας και Νεφροπάθειας των Χοίρων (ΣΔΝΧ) διαπιστώθηκε για πρώτη φορά το 1993 στην Αγγλία. Το νόσημα έχει σποραδική εμφάνιση (ποσοστό προσβολής 1% ή και μικρότερο) και εμφανίζεται σε χοίρους με βάρος 40 έως 70 κιλά. Οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις παρατηρούνται στο δέρμα και τους νεφρούς, ενώ διαπιστώνονται χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις όπως είναι η οξεία σπειραματονεφρίτιδα και η συστηματική νεκρωτική αγγειίτιδα (Smith και συν., 1993).

#### **1.14.1.2 Γεωγραφική εξάπλωση**

Από το 1993, το νόσημα έχει αναφερθεί στον Καναδά, τη Νότια Αφρική, την Ισπανία, τις ΗΠΑ, τη Χιλή, τη Γαλλία, την Ολλανδία, την Αργεντινή, την Ιταλία, τη Κορέα (Morilla και συν., 2002) και την Ελλάδα (Saoulidis και συν., 2002).

#### **1.14.1.3 Αιτιολογία**

Η αιτιολογία του ΣΔΝΧ δεν έχει διευκρινιστεί. Το σύνδρομο πιθανά να προκαλείται από παράγοντες που διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα των χοίρων

(υπερευαισθησία τύπου III) όπως φάρμακα, χημικές ουσίες, αλλεργιογόνα των τροφών, ενδογενή αντιγόνα και λοιμώδεις παράγοντες (ιός του ΑΑΣΧ, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus spp.*) (Drolet και συν., 1999). Ο ιός του ΑΑΣΧ, η *Pasteurella multocida*, ο *Streptococcus spp.* και οι λιποπολυσακχαρίτες των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων συσχετίζονται με το νόσημα (Drolet και συν., 1999).

Ο κυκλοϊός 2 του χοίρου ανιχνεύεται με μεγάλη συχνότητα σε φυσικά περιστατικά του ΣΔΝΧ. Ο αιτιολογικός ρόλος του ιού στην πρόκληση του νοσήματος αμφισβητείται, αφού πειραματική μόλυνση χοίρων με τον ιό δεν προκάλεσε αλλοιώσεις συμβατές με εκείνες του ΣΔΝΧ.

Ελάχιστες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό να διευκρινιστεί ο ρόλος άλλων παραγόντων, εκτός από τους λοιμώδεις, στην αιτιολογία του συνδρόμου.

#### **1.14.1.4 Παθογένεια**

Η υπερευαισθησία τύπου III θεωρείται ότι αποτελεί τον παθογενετικό μηχανισμό του νοσήματος (Smith και συν., 1993). Τα ανοσοσύμπλοκα που δημιουργούνται από τη συνένωση του αντιγόνου με τα αντισώματα και το συμπλήρωμα, εγκαθίστανται στα τοιχώματα των αγγείων και τα αγγειώδη σπειράματα του νεφρικού σωματίου, όπου προκαλούν φλεγμονή και συγκέντρωση μεγάλου αριθμού ουδετερόφιλων κυττάρων (Hélie και συν., 1995, Smith και συν., 1993). Η ανοσοσφαιρίνη Μ (IgM), η ανοσοσφαιρίνη Α (IgA) και σε ορισμένες περιπτώσεις η ανοσοσφαιρίνη G (IgG), καθώς και οι παράγοντες του συμπληρώματος C3 και C1q έχουν ανιχνευθεί στα αγγεία και τα σπειράματα των νεφρών (Hélie και συν., 1995, Smith και συν., 1993). Το ή τα αντιγόνο/α που εμπλέκονται στο ΣΔΝΧ είναι άγνωστο/α.

#### **1.14.1.5 Νοσηρότητα και θνησιμότητα**

Το ΣΔΝΧ εμφανίζεται σε θηλάζοντα χοιρίδια, παχυνόμενους χοίρους και σπανιότερα σε ενήλικα ζώα (Drolet και συν., 1999). Η συχνότητα εμφάνισης του νοσήματος στις εκτροφές είναι μικρότερη από 1% και συνήθως κυμαίνεται από 0.05% έως 0.5% (Segales και συν., 1998). Το ένα τρίτο των χοίρων που νοσούν είναι ηλικίας 1.5 έως 3 μηνών, ενώ συνήθως τα ζώα πεθαίνουν (Segales και συν., 1998). Όσοι χοίροι επιζούν, αναρρώνουν και αποκτούν βάρος 7 έως 10 ημέρες μετά την εμφάνιση των

πρώτων κλινικών συμπτωμάτων. Έχουν αναφερθεί εκτροφές που εμφανίζουν μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής με τη θνησιμότητα να κυμαίνεται έως 20% (Gresham και συν., 2000).

#### **1.14.1.6 Κλινικά συμπτώματα**

Ορισμένοι χοίροι αναρρώνουν σε σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ άλλοι εμφανίζουν χωλότητα, ελαφρά άνοδο της θερμοκρασίας, ανορεξία ή απώλεια βάρους. Σπανιότερα παρατηρούνται ξαφνικοί θάνατοι (Drolet και συν., 1999).

Το ΣΔΝΧ, μπορεί να συνυπάρχει με άλλα νοσήματα ή παθολογικές καταστάσεις όπως η νόσος του Glasser, το ΑΑΣΧ, το ΠΣΑΑΧ, η επιπεφυκίτιδα και τα γαστρικά έλκη (Drolet και συν., 1999).

#### **1.14.1.7 Μακροσκοπικές αλλοιώσεις**

Κατά την οξεία μορφή της νόσου παρατηρούνται ακανόνιστου σχήματος ερυθρές κηλίδες και βλατίδες στα άκρα και την περινεϊκή περιοχή που εμφανίζουν τάση να συνενώνονται. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι αλλοιώσεις έχουν γενικευμένη κατανομή και παρατηρούνται στην κοιλιακή χώρα, το θώρακα και τα αυτιά. Κατά την εξέλιξη του νοσήματος οι αλλοιώσεις καλύπτονται από εφελκίδες οι οποίες σταδιακά υποχωρούν, συνήθως σε δύο με τρεις εβδομάδες και σε ορισμένες περιπτώσεις αφήνουν ουλές (Drolet και συν., 1999).

Αλλοιώσεις, επίσης παρατηρούνται στους νεφρούς, τους πνεύμονες και τα λεμφογάγγλια. Οι νεφροί είναι διογκωμένοι και αποχρωματισμένοι με πετέχειες στη φλοιώδη μοίρα τους. Κατά τη διάνοιξη της θωρακικής κοιλότητας, οι πνεύμονες δε συμπύσσονται και είναι διάστικτοι από εστίες φαιού χρώματος. Πυώδης βρογχοπνευμονία παρατηρείται περιστασιακά. Τα νεφρικά και τα βουβωνικά λεμφογάγγλια είναι συνήθως διογκωμένα και ερυθρού χρώματος. Επίσης, παρατηρούνται υποδόριο οίδημα, αυξημένο αρθρικό υγρό και ορώδεις συλλογές στις σωματικές κοιλότητες. Σποραδικά, διαπιστώνεται εστιακή ή διάχυτη νέκρωση του σπλήνα λόγω σχηματισμού εμφράκτων (Drolet και συν., 1999, Segales και συν., 1998).

Ορισμένοι χοίροι με ΣΔΝΧ δεν εμφανίζουν αλλοιώσεις στο δέρμα. Σε άλλους δεν παρατηρούνται αλλοιώσεις στους νεφρούς ή όταν υπάρχουν είναι ελαφρού βαθμού. Τα

παραπάνω περιστατικά θεωρούνται άτυπες μορφές του συνδρόμου επειδή συνυπάρχει συστηματική νεκρωτική αγγειΐτιδα (Drolet και συν., 1999, Segales και συν., 1998).

#### **1.14.1.8 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις**

Η πιο χαρακτηριστική ιστοπαθολογική αλλοίωση είναι η έντονου βαθμού διάχυτη ινιδώδης σπειραματονεφρίτιδα. Στα αγγειώδη σπειράματα παρατηρούνται εναποθέσεις ινικής, παρουσία πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων και ερυθροκυττάρων. Στις οξείες περιπτώσεις προσβάλλονται όλα τα αγγειώδη σπειράματα των νεφρικών σωματίων. Οι χρόνια προσβεβλημένοι χοίροι εμφανίζουν ελαφρού έως έντονου βαθμού αύξηση του διάμεσου συνδετικού ιστού του νεφρού και σπειραματοσκλήρυνση. Λευκοκυτταρική νεκρωτική αγγειΐτιδα έχει παρατηρηθεί σε διάφορα όργανα όπως είναι οι νεφροί (πύελος, σπειράματα), τα λεμφογάγγλια, ο σπλήνας, οι πνεύμονες, το ήπαρ, η καρδιά, ο στόμαχος, η ουροδόχος κύστη, ο εγκέφαλος (μήνιγγες) και το δέρμα. Η νεκρωτική αγγειΐτιδα στο χόριο οδηγεί σε ισχαιμία και νέκρωση της επιδερμίδας. Η νεκρωτική αγγειΐτιδα συνήθως παρατηρείται στις μετρίου μεγέθους αρτηρίες και τα τριχοειδή αγγεία που παρουσιάζουν ινδοειδή νέκρωση του μέσου και έσω χιτώνα. Επίσης, στο τοίχωμα των αρτηριών διαπιστώνεται έντονου βαθμού διήθηση από φλεγμονικά κύτταρα (Segales και συν., 1998, Thibault και συν., 1998).

Στα λεμφογάγγλια παρατηρείται ελαφρού έως έντονου βαθμού αραίωση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων, η οποία συνοδεύεται από διήθηση από μακροφάγα κύτταρα ή / και πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα (Rosell και συν., 2000, Segales και συν., 1998).

Έχει παρατηρηθεί ελαφρού έως μέτριου βαθμού διάμεση πνευμονία, η οποία συνοδεύεται από οίδημα και υπεραϊμία του πνευμονικού παρεγχύματος (Rosell και συν., 2000).

#### **1.14.1.9 Διάγνωση**

Υποψία του ΣΔΝΧ τίθεται με βάση τα κλινικά συμπτώματα, τις μακροσκοπικές αλλοιώσεις και το μικρό ποσοστό προσβολής του νοσήματος στις περισσότερες εκτροφές. Ωστόσο, τα κλινικά συμπτώματα δεν είναι χαρακτηριστικά και οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις δεν παρατηρούνται πάντοτε στο δέρμα και τους νεφρούς. Η

συχνότητα εμφάνισης της άτυπης μορφής του συνδρόμου έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερα στις εκτροφές που το νόσημα έχει υψηλό ποσοστό προσβολής (Segales και συν., 1998, Thibault και συν., 1998).

Η οριστική διάγνωση βασίζεται στις χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις, όπως είναι η σπειραματονεφρίτιδα και η συστηματική νεκρωτική αγγειΐτιδα και στην ηλικία των ζώων (Segales και συν., 1998, Thibault και συν., 1998).

#### **1.14.1.10 Διαφορική διάγνωση**

Το ΣΔΝΧ θα πρέπει να διαφοροποιείται από τα νοσήματα στα οποία παρατηρούνται δερματικές αλλοιώσεις όπως είναι η κλασική πανώλη (στελέχη χαμηλής λοιμογόνου δύναμης), η αφρικανική πανώλη, τα δερματικά νοσήματα από *Erysipelothrix rhusiopathiae* και *Actinobacillus suis*, και οι βακτηριδιακές σηψαιμικές καταστάσεις (Segales και συν., 1998).

Επίσης, το ΣΔΝΧ θα πρέπει να διαφοροποιείται από τα νοσήματα που προκαλούν παρόμοιες αλλοιώσεις στους νεφρούς, όπως είναι η κλασική πανώλη, η αφρικανική πανώλη και η σηψαιμία από *Salmonella* (Segales και συν., 1998).

Η διαφορική διάγνωση του ΣΔΝΧ θα πρέπει να προσαρμόζεται ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή και να περιλαμβάνει τα νοσήματα στα οποία εμφανίζονται αλλοιώσεις στο δέρμα ή / και τους νεφρούς (Segales και συν., 1998).

#### **1.14.1.11 Πρόληψη**

Το ΣΔΝΧ χαρακτηρίζεται από χαμηλό ποσοστό προσβολής και κατά συνέπεια δεν προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες (Segales και συν., 1998). Σημαντικές από οικονομική άποψη μπορεί να θεωρηθούν οι άτυπες μορφές του νοσήματος στις οποίες παρατηρούνται μέτρια έως υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα.

Η χορήγηση αντιμικροβιακών σκευασμάτων δεν είναι αποτελεσματική τόσο για τη θεραπεία των δερματικών αλλοιώσεων, όσο και για τη μείωση της θνησιμότητας (Segales και συν., 1998, Smith και συν., 1993). Αποτελεσματικά προληπτικά μέτρα δεν υπάρχουν, αφού η αιτιολογία και η παθογένεια του νοσήματος δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως.

### **1.14.2 Αναπαραγωγικά προβλήματα**

Ο κυκλοϊός 2 του χοίρου αποτελεί αίτιο αναπαραγωγικών προβλημάτων στις σύες.

#### **1.14.2.1 Ιστορικό**

Οι West και συν. (1999) διαπίστωσαν σε εκτροφή στο Δυτικό Καναδά αναπαραγωγικά προβλήματα, όπως γέννηση θνησιγενών χοιριδίων και αποβολές στο τέλος της κυοφορίας, που συσχετίστηκαν με τον κυκλοϊό 2. Ο ιός ανιχνεύθηκε στο μυοκάρδιο των χοιριδίων, ενώ δε διαπιστώθηκαν άλλοι ιοί με εμβρυϊκό τροπισμό. Επίσης, οι O' Connor και συν. (2001) ανίχνευσαν τον ιό στην καρδιά, τους πνεύμονες και το σπλήνα σε θνησιγενή και νεκρά νεογέννητα χοιρίδια από μια νεοσύστατη εκτροφή στον Καναδά. Στη Δανία, οι Ladekjaer-Mikkelsen και συν. (2001) ανίχνευσαν αντιγόνο και αντισώματα έναντι του κυκλοϊού 2 σε τοκετοομάδα με νεκρά χοιρίδια από εκτροφή με χοίρους απαλλαγμένους από ειδικούς παθογόνους μικροοργανισμούς (SPF).

Οι Bogdan και συν. (2001) εξέτασαν ιστοτεμάχια που προέρχονταν από φυσικά περιστατικά αποβολών ή αναπαραγωγικών προβλημάτων κατά το χρονικό διάστημα 1995 έως 1998. Ο κυκλοϊός 2 δεν ανιχνεύθηκε σε αυτά και θεωρήθηκε ότι τα αναπαραγωγικά προβλήματα που συσχετίζονται με τον ιό αποτελούν πρόσφατη κλινική εκδήλωση της λοίμωξης.

#### **1.14.2.2 Πειραματικές μελέτες**

Οι πειραματικές μελέτες ακολούθησαν τις αναφορές που συσχέτισαν τον κυκλοϊό 2 με τα αναπαραγωγικά προβλήματα στις σύες.

Οι Sanchez και συν. (2001), ενοφθάλμισαν με κυκλοϊό 2 δύο έμβρυα από κάθε έγκυο συ την 57<sup>η</sup>, 75<sup>η</sup> και 92<sup>η</sup> ημέρα της κυοφορίας αντίστοιχα και τα συνέλεξαν 21 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό. Ο ιός πολλαπλασιάστηκε στα έμβρυα σε διάφορα στάδια της κυοφορίας και προκάλεσε μακροσκοπικές αλλοιώσεις σε εκείνα που ενοφθαλμίστηκαν την 57<sup>η</sup> ημέρα της κύησης.

Οι Pensaert και συν. (2004), ενοφθάλμισαν έμβρυα την 57<sup>η</sup> και 75<sup>η</sup> ημέρα της κυοφορίας, όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο πείραμα. Η πειραματική μελέτη

τερματίστηκε στο τέλος της κυοφορίας. Ο ιός προκάλεσε εμβρυϊκό θάνατο στα έμβρυα που ενοφθαλμίστηκαν στο μέσο της κυοφορίας, μετά το σχηματισμό του ανοσοποιητικού συστήματος. Στα έμβρυα που μολύνθηκαν κατά το σχηματισμό του ανοσοποιητικού συστήματος, ανιχνεύθηκαν ο ιός και αντισώματα έναντι του ιού και παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις κατά το τέλος της κυοφορίας.

Οι Park και συν. (2005), μόλυναν ενδορρινικά με κυκλοϊό 2 έγκυες σύες τρεις εβδομάδες πριν την αναμενόμενη ημερομηνία τοκετού. Αποβολές και πρώιμοι τοκετοί παρατηρήθηκαν στις σύες. Αντιγόνο και νουκλεϊκό οξύ του ιού ανιχνεύθηκε στα λεμφογάγγλια, το σπλήνα, το θύμο, τους πνεύμονες, τις αμυγδαλές και το ήπαρ των θνησιγενών και ζωντανών χοιριδίων. Ο ιός πέρασε μέσω του πλακούντα στα έμβρυα, πολλαπλασιάστηκε αρχικά στον λεμφικό ιστό και προκάλεσε αναπαραγωγικά προβλήματα.

#### **1.14.2.3 Μετάδοση**

Η μετάδοση του κυκλοϊού 2 στα έμβρυα γίνεται κάθετα (Kim και συν., 2004, Ladekjaer-Mikkelsen και συν., 2001, Park και συν., 2005, West και συν., 1999) και ο ιός απεκκρίνεται με το σπέρμα (Hamel και συν., 2000, Kim και συν., 2001, Larochelle και συν., 2000).

#### **1.14.2.4 Κλινικά συμπτώματα**

Στις εκτροφές που διαπιστώνονται αναπαραγωγικά προβλήματα που συσχετίζονται με τον κυκλοϊό 2, παρατηρούνται αποβολές κατά το τελευταίο στάδιο της κυοφορίας και γέννηση θνησιγενών χοιριδίων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρούνται αποβολές κατά το μέσο της κυοφορίας, γέννηση μουμιοποιημένων εμβρύων ή πρώιμος εμβρυϊκός θάνατος. Χοιρίδια τα οποία γεννιούνται ιαμικά δεν εμφανίζουν αντισώματα έναντι του ιού, ίσως γιατί αναπτύσσουν ανοσοανοχή κατά τη διάρκεια της κυοφορίας (Kim και συν., 2004) .

#### **1.14.2.5 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις**

Στο μυοκάρδιο των εμβρύων διαπιστώνονται εκτεταμένες περιοχές εκφύλισης και νέκρωσης με οίδημα και ελαφρού βαθμού ίνωση. Επίσης, παρατηρείται μετρίου βαθμού

διήθηση από λεμφοκύτταρα και μακροφάγα (West και συν., 1999). Στους πνεύμονες, παρατηρούνται αλλοιώσεις φλεγμονής που έχουν πολυεστιακή κατανομή. Οι αλλοιώσεις χαρακτηρίζονται από διήθηση από μονοπύρρηνα κύτταρα στον αυλό των κυψελίδων (Kim και συν., 2004). Συνήθως, ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις δεν παρατηρούνται σε άλλα όργανα.

#### **1.14.2.6 Επιδημιολογία**

Οι περισσότερες αναφορές αναπαραγωγικών προβλημάτων που σχετίζονται με τον κυκλοϊό 2 αφορούν εκτροφές στον Καναδά (O' Connor και συν., 2001, West και συν., 1999). Ο αριθμός των κλινικών περιστατικών από άλλες χώρες είναι περιορισμένος.

Τα αναπαραγωγικά προβλήματα που οφείλονται στον ιό δεν παρατηρούνται σε όλες τις εκτροφές που εμφανίζεται το ΠΣΑΑΧ (O' Connor και συν., 2001). Άγνωστο είναι οι λόγοι που συντελούν, ώστε η λοίμωξη από τον ιό να εκδηλωθεί με τη μορφή αναπαραγωγικών προβλημάτων. Ωστόσο, τα κλινικά περιστατικά αφορούν σύες που δεν είχαν αντισώματα έναντι του ιού (O' Connor και συν., 2001).

Επίσης, η απέκκριση του ιού με το σπέρμα (Hamel και συν., 2000) είναι άγνωστο αν συντελεί στη μετάδοση του ιού και την πρόκληση αναπαραγωγικών προβλημάτων. Οι επιπτώσεις που έχει ο συγκεκριμένος τρόπος μετάδοσης στην επιδημιολογία και τον έλεγχο της λοίμωξης από τον ιό, θα πρέπει να μελετηθούν.

### **1.14.3 Αναπνευστικό Σύμπλεγμα των Χοίρων**

#### **1.14.3.1 Αιτιολογία**

Η αιτιολογία του Αναπνευστικού Συμπλέγματος των Χοίρων (ΑΣΧ) δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και διαφέρει ανάλογα με την εκτροφή. Το σύνδρομο οφείλεται σε διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς του αναπνευστικού συστήματος των χοίρων (Thacker, 2001).

Το *Mycoplasma hyopneumoniae* και ο ιός του ΑΑΣΧ απομονώνονται συχνά. Στην αιτιολογία εμπλέκονται και άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως ο ιός της γρίπης, ο κυκλοϊός 2 του χοίρου, ο *Actinobacillus Pleuropneumoniae* και η *Pasteurella Multocida* (Halbur, 1998, Thacker, 2001).

### **1.14.3.2 Κλινικά συμπτώματα**

Το ΑΣΧ παρατηρείται σε αναπτυσσόμενους και παχυνόμενους χοίρους ηλικίας 16 έως 22 εβδομάδων. Χαρακτηρίζεται από αργή και ανομοιόμορφη ανάπτυξη των χοίρων, μειωμένη πρόσληψη και μετατρεψιμότητα της τροφής, ληθαργικότητα, πυρετό, βήχα και δύσπνοια (Halbur, 1998, Thacker, 2001).

### **1.14.3.3 Κυκλοϊός 2 και ΑΣΧ**

Ο κυκλοϊός 2 ανιχνεύθηκε σε χοίρους που εμφάνιζαν ΑΣΧ (Harms και συν., 2002, Kim και συν., 2003). Η ανίχνευσή του στους πνεύμονες αποτέλεσε ένδειξη ότι ο ιός εμπλέκεται στο νόσημα, αλλά δε διευκρινίστηκε αν έχει αιτιολογικό ρόλο, αλληλεπιδρά ή δρα συνεργικά με άλλους παράγοντες. Στην πλειοψηφία των χοίρων απομονώθηκαν και άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί.

Η πιο κοινή ιστοπαθολογική αλλοίωση που παρατηρείται στο ΑΣΧ στην περίπτωση που εμπλέκεται ο κυκλοϊός 2 είναι βρογχοδιάμεση πνευμονία (Kim και συν., 2003). Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι δύσκολο να διαφοροποιηθούν τα φυσικά περιστατικά του ΑΣΧ από το ΠΣΑΑΧ, γιατί τα νοσήματα έχουν παρόμοια κλινική εικόνα (δύσπνοια, απώλεια βάρους) (Chae και συν., 2005). Η διαφοροποίηση γίνεται με βάση τις παθολογικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις (αραιώση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων) που παρατηρούνται στο λεμφικό ιστό των χοίρων που νοσούν από ΠΣΑΑΧ (Chae και συν., 2005).

## **1.15 Πειραματικές μελέτες με κυκλοϊό 2**

Πειραματικές μολύνσεις χοίρων με κυκλοϊό 1 δεν οδήγησαν στην εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων ή την εμφάνιση ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων (Allan και συν., 1995, Krakowka και συν., 2001, Tischer και συν., 1986). Αντίθετα, αλλοιώσεις που παρατηρούνται στο ΠΣΑΑΧ έχουν προκληθεί πειραματικά σε γνοτοβιοτικά χοιρίδια, χοιρίδια απαλλαγμένα από ειδικούς παθογόνους μικροοργανισμούς (SPF), καθώς και σε χοιρίδια από συμβατικές εκτροφές, μετά από ενοφθαλμισμό τους με κυκλοϊό 2.

Στη συνέχεια, αναφέρονται οι πειραματικές μελέτες στις οποίες οι χοίροι ενοφθαλμίστηκαν με κυκλοϊό 2 και έλαβαν ανοσοενισχυτικές ουσίες.

### **1.15.1 Πειραματικές μολύνσεις σε γνοτοβιοτικά χοιρίδια**

Οι Krakowka και συν. (2001), ενοφθάλμισαν χοιρίδια με κυκλοϊό 2 και χορήγησαν υποδόρια ανοσοενισχυτική ουσία (KLH-ICFA) στο αριστερό ισχίο και την ωμοπλάτη σε ορισμένα από αυτά. Η διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος οδήγησε σε αυξημένο πολλαπλασιασμό του ιού. Επιπλέον, αυξημένος αριθμός κυττάρων που έφεραν το αντιγόνο του ιού διαπιστώθηκε στα λεμφογάγγλια των περιοχών που έγινε η έγχυση.

Σε ένα δεύτερο πείραμα, οι Krakowka και συν. (2001) ενοφθάλμισαν χοιρίδια με κυκλοϊό 2. Σε ορισμένα χορηγήθηκε ανοσοενισχυτική ουσία (KLH-ICFA) με ή χωρίς ταυτόχρονη διέγερση των μακροφάγων του περιτοναίου μετά από ενδοπεριτοναϊκές εγχύσεις με thioglycollate broth. Όλα τα ανοσοποιημένα χοιρίδια εμφάνισαν μέτριας έως σοβαρής μορφής ΠΣΑΑΧ, ενώ εκείνα που μολύνθηκαν μόνο με τον ιό δε νόσησαν. Στα χοιρίδια που εμφάνισαν ΠΣΑΑΧ, ο ιός πολλαπλασιάστηκε σε μεγαλύτερο βαθμό.

### **1.15.2 Πειραματικές μολύνσεις χοίρων απαλλαγμένων από ειδικούς παθογόνους μικροοργανισμούς**

Οι Ladekjaer-Mikkelsen και συν. (2002), χορήγησαν ενδορρινικά κυκλοϊό 2 σε χοιρίδια ηλικίας τριών εβδομάδων. Στα μισά χοιρίδια χορηγήθηκε ενδομυϊκά ανοσοενισχυτική ουσία τη 2<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> ημέρα μετά την μόλυνση. Το πείραμα είχε διάρκεια πέντε εβδομάδων.

Όλα τα ενοφθαλμισμένα χοιρίδια βρέθηκαν οροθετικά 14 ημέρες μετά τη μόλυνση, ενώ αντιγόνο του ιού ανιχνεύθηκε στο λεμφικό ιστό. Τα χοιρίδια που εμφάνισαν ΠΣΑΑΧ είχαν περισσότερα αντίγραφα DNA του ιού στον ορό του αίματος σε σχέση με εκείνα που δεν εμφάνισαν κλινικά συμπτώματα. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα κλινικά συμπτώματα, τις μακροσκοπικές και ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις ανάμεσα στα ενοφθαλμισμένα χοιρίδια, ανεξάρτητα με το αν χορηγήθηκε σε αυτά ανοσοενισχυτική ουσία.

### **1.15.3 Πειραματικές μολύνσεις οροαρνητικών χοίρων από συμβατικές εκτροφές**

Οι Opriessnig και συν. (2003), χρησιμοποίησαν χοιρίδια οροαρνητικά για τον κυκλοϊό 2 και τα ενοφθάλμισαν με ιό στα λεμφογάγγλια. Ορισμένα χοιρίδια εμβολιάστηκαν με βακτηριοσίνες (*Actinobacillus pleuropneumoniae* και *Mycoplasma hyorhneumoniae*) πριν την έναρξη του πειράματος.

Στα πειραματόζωα παρατηρήθηκαν ήπια αναπνευστική νόσος, διάρροια και μετρίου βαθμού διόγκωση των λεμφογαγγλίων. Η διάρκεια της ιαιμίας, ο αριθμός των αντιγράφων DNA του ιού στον ορό, η κατανομή του αντιγόνου στους ιστούς και η αραίωση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων ήταν μεγαλύτερες στα χοιρίδια που εμβολιάστηκαν με βακτηριοσίνες.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

## **2. Διάφορα κλινικά σύνδρομα σε οικόσιτους χοίρους**

### **2.1 Υλικά και μέθοδοι**

#### **2.1.1 Απομόνωση DNA από παθολογικά υλικά**

Η απομόνωση του DNA από ιστοτεμάχια από διάφορα όργανα γινόταν με τη χρήση εμπορικού kit Puregene (DNA cell and tissue isolation kit, Gentra Systems, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Το DNA αποθηκευόταν στους -20°C για να εξεταστεί με την τεχνική της PCR.

#### **2.1.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης**

Για την ανίχνευση του DNA του κυκλοϊού 1, χρησιμοποιούνταν οι εκκινητές F41/B42, όπως περιγράφηκαν από τους Mankertz και συν. (2000) (Πίνακας 1). Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιούνταν για την ανίχνευση του DNA του κυκλοϊού 2 αναγνώριζαν όλες τις περιοχές του γενόματος του ιού (Lark, UK). Η αλληλουχία τους ήταν όπως η προτεινόμενη από τους Fenaux και συν. (2000) (CV1/CV2, CV3/CV4) και Mankertz και συν. (2000) (F58/B59, F60/B61, F62/B63, F64/B65, F66/B67, F68/B69) (Πίνακας 1).

Τα ακόλουθα αντιδραστήρια χρησιμοποιούνταν σε κάθε αντίδραση PCR:

2 μl DNA από το προς εξέταση δείγμα

2 μl 10× ρυθμιστικού διαλύματος PCR (invitrogen)

1 mM MgCl<sub>2</sub> (invitrogen)

0,2 mM dNTP's (τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια, invitrogen)

0,2 ή 0,3 μονάδες (U) Taq DNA polymerase (invitrogen) ανάλογα με τους εκκινητές

0,4 μl από κάθε εκκινητή (100 pmol/μl, invitrogen)

Απεσταγμένο νερό (Distilled water DNAase, RNAase free, invitrogen) μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης στα 20 μl

Στη συνέχεια, ο θετικός μάρτυρας, ο αρνητικός μάρτυρας και τα προς εξέταση δείγματα τοποθετούνταν στον αυτόματο ηλεκτρονικό θερμοκυκλοποιητή (PTC-100, MJ Research inc.) για τον πολλαπλασιασμό τους.

Το παρακάτω πρόγραμμα χρησιμοποιούνταν για τους εκκινητές που περιγράφηκαν από τους Fenaux και συν. (2000):

1. 94°C για 1 min

2. 55°C για 1 min

3. 72°C για 3 min

4. επανάληψη σταδίων 1, 2, 3 για 35 φορές

5. 72°C για 7 min

Το ακόλουθο πρόγραμμα χρησιμοποιούνταν για τους εκκινητές που περιγράφηκαν από τους Mankertz και συν. (2000):

1. 95°C για 4 min

2. 95°C για 20 sec

3. θερμοκρασία ανάλογα με το ζευγάρι των εκκινητών για 20 sec (Πίνακας 1)

4. 72°C για 45 sec

5. επανάληψη 2, 3, 4 για 42 φορές

6. 72°C για 10 min

Πίνακας 1. Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του DNA του κυκλοϊού 1 και του κυκλοϊού 2.

<b>Εκκινητές</b>	<b>Αλληλουχία νουκλεοτιδίων</b>	<b>Μοριακό μέγεθος προϊόντος PCR (bp)</b>	<b>Βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού</b>
<b>Κυκλοϊός 2</b>			
CV1	AGGGCTGTGGCCTTTGTTAC	989	55.0°C
CV2	TCTTCCAATCACGCTTCTGC		
CV3	TGGTGACCGTTGCAGAGCAG	1092	55.0°C
CV4	TGGGCGGTGGACATGATGAG		
F58	GAGTCAAGAACAGGTTTGGGTGTG	503	58.3°C
B59	ACGTATCCAAGGAGGCGTTACC		
F60	TTTCCTTCTCCAACGGTAGCG	593	57.7°C
B61	GCTCTCCAAGGTACTIONCACAGC		
F62	AGCTCCTCGATCTCAAGGACAAC	554	56.7°C
B63	CCGTGGATTGTTCTGTAGCATT		
F64	AATGCTACAGAACAATCCACGGAG	392	55.0°C
B65	CCATACAATCCCCCAACCCTTC		
F66	GGTTTGTAGCCTCAGCCAAAGC	416	56.4°C
B67	GCACCTTCGGATATACTGTCA AGG		
F68	AGAAACAAGTGGTGGGATGGTTAC	333	55.9°C
B69	TGGAAATTCAGGGCATGGG		
<b>Κυκλοϊός 1</b>			
F41	ATACGGTAGTATTGGAAAGGTAGGG	688	57.0°C
B42	ACACTCGATAAGTATGTGGCCTTCT		

### 2.1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ανάλυση του τελικού προϊόντος της PCR γινόταν σε πηκτή αγαρόζης 1,5% ή 2%, η οποία τοποθετούταν σε σύστημα οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Αρχικά σε 10 μl πολλαπλασιασμένου DNA προσθέτοταν 2 μl κυανού της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue) και τοποθετούταν στα φρεάτια της πηκτής με μικροπιπέτα. Στο πρώτο φρεάτιο τοποθετούταν 10 μl DNA μάρτυρα μοριακού βάρους (100 bp DNA ladder, invitrogen). Η ηλεκτροφόρηση διαρκούσε 30 λεπτά και η τάση του ηλεκτρικού ρεύματος ήταν 100 V. Στη συνέχεια, η πηκτή τοποθετούταν για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Το τμήμα που είχε αντιγραφεί εμφανιζόταν ως φθορίζουσα ζώνη. Τα δείγματα θεωρούνταν θετικά όταν το μοριακό μέγεθος του προϊόντος της PCR ήταν το ίδιο με εκείνο του γνωστού DNA μάρτυρα (Πίνακας 1).

Η πηκτή αγαρόζης 1,5% ή 2% είχε την ακόλουθη σύσταση:

Αγαρόζη (Ultra Pure Gibco BRL)	1,5 ή 2 gr
1 × TAE buffer (Tris-acid EDTA, Gibco - Invitrogen)	100 ml
Βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide, Invitrogen)	2 μl (10 μg / ml)

Το 1 × TAE ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης είχε την ακόλουθη σύσταση:

50 × TAE buffer	10 ml
Νερό απεσταγμένο – αποστειρωμένο	490 ml

### 2.1.4 Προσδιορισμός της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων του κυκλοϊού 2

Η ακολουθία των νουκλεοτιδίων προσδιορίστηκε σε εννέα στελέχη του κυκλοϊού 2 από οικόσιτους χοίρους. Αρχικά, πολλαπλασιάζοταν το DNA του ιού σε ολόκληρο το γένωμά του με τη χρήση διαφορετικών ζευγών εκκινητικών μορίων. Τα προϊόντα κάθε PCR αναλύονταν σε πηκτή αγαρόζης και ακολουθούσε εκχύλισή τους από την πηκτή με τη χρήση εμπορικού kit (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen Ltd, West Sussex, UK). Τα προϊόντα της εκχύλισης στέλνονταν στη Γερμανία ή Αγγλία (MWG, Biotech ή Lark) για την εξακρίβωση της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων. Ο προσδιορισμός της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων γινόταν δύο φορές για κάθε δείγμα.

### **2.1.5 Κατάθεση Ελληνικών στελεχών στην Τράπεζα Δεδομένων**

Τέσσερα από τα εννέα Ελληνικά στελέχη του ιού κατατέθηκαν στην Τράπεζα Δεδομένων (GenBank) με τους ακόλουθους αριθμούς καταχώρησης (GenBank accession numbers): DQ915585 (GRE1), DQ915586 (GRE2), DQ915587 (GRE3), DQ915588 (GRE4).

### **2.1.6 Σύγκριση της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων και φυλογενετική ανάλυση**

Η ακολουθία των νουκλεοτιδίων προσδιορίστηκε σε εννέα στελέχη του κυκλοϊού 2 που προήρθαν από οικόσιτους χοίρους. Τα στελέχη ονομάστηκαν με τους κωδικούς GRE1 έως GRE9 (Πίνακας 2). Στελέχη του ιού από άλλους χοίρους (Πίνακας 2) που ήταν κατατεθειμένα στην Τράπεζα Δεδομένων (GenBank) και είχαν ανιχνευθεί από ΠΣΑΑΧ ή από παθολογικές καταστάσεις που συσχετίστηκαν με τον ιό, χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων και τη φυλογενετική ανάλυση. Η σύγκριση της ακολουθίας των στελεχών έγινε με το πρόγραμμα Clustal W. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ολόκληρο το γένωμα των στελεχών, καθώς και στα ΑΑΠ2 και ΑΑΠ3. Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα PAUP χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum-likelihood analysis) (Salemi και Vandamme, 2003).

Το πρότυπο αντικατάστασης των νουκλεοτιδίων (nucleotide substitution model) επιλέχθηκε για κάθε φυλογενετικό δέντρο. Η επιλογή του προτύπου αντικατάστασης γινόταν με τον ακόλουθο τρόπο:

α) Δημιουργία ενός φυλογενετικού δέντρου που εξηγούσε με λογικό τρόπο τα δεδομένα

β) Χρήση του πιο πολύπλοκου προτύπου αντικατάστασης των νουκλεοτιδίων (GTR + I + Γ) με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood)

γ) Προσδιορισμός όλων των παραμέτρων του προτύπου και υπολογισμός της τιμής της πιθανοφάνειας (likelihood score) του φυλογενετικού δέντρου

δ) Έλεγχος των παραμέτρων που προσδιορίστηκαν, με σκοπό να διαπιστωθεί αν θα μπορούσαν να γίνουν απλοποιήσεις με τις οποίες θα διατηρούνταν η αποτελεσματικότητα του προτύπου. Εκτίμηση του απλοποιημένου προτύπου για να

διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητά του. Εάν το απλοποιημένο πρότυπο δεν εξηγούσε επαρκώς τα δεδομένα, χρησιμοποιούταν το προηγούμενο πρότυπο.

ε) Επανάληψη του σταδίου δ μέχρι να γίνουν όλες οι πιθανές απλοποιήσεις.

στ) Προσδιορισμός του προτύπου και των παραμέτρων του.

Μετά την επιλογή του προτύπου αντικατάστασης των νουκλεοτιδίων, ακολούθησε η διαδικασία για την επιλογή του καλύτερου φυλογενετικού δέντρου χρησιμοποιώντας τη μέθοδο heuristic search. Τέσσερα στελέχη του κυλοϊού 1 του χοίρου (PCV1) χρησιμοποιήθηκαν για να τοποθετηθεί η ρίζα στο δέντρο.

### **2.1.7 Παθολογοανατομικές εξετάσεις**

Οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις στα όργανα 18 χοίρων από εννέα εκτροφές εκτιμήθηκαν κατά τη διάρκεια της νεκροτομής. Στη συνέχεια, λήφθηκαν ιστοτεμάχια από τα υπογνάθια, βρογχικά, μεσεντέρια και επιπολής βουβωνικά λεμφογάγγλια, το ήπαρ, το σπλήνα, τους πνεύμονες και τους νεφρούς τα οποία προορίζονταν για εξέταση με το φωτονικό μικροσκόπιο. Ειδικότερα, τα ιστοτεμάχια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10% σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (pH 7) για 48-72 ώρες. Μετά την έγκλιση τους σε παραφίνη, λήφθηκαν τομές πάχους 4-6 μm, οι οποίες χρωματίστηκαν με τη μέθοδο της αιματοξυλίνης – εωσίνης. Η επεξεργασία των δειγμάτων, καθώς και η εξέτάσή τους με το φωτονικό μικροσκόπιο έγινε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ).

Πίνακας 2. Στελέχη του κυκλοϊού 2 του χοίρου που συμμετείχαν στη φυλογενετική ανάλυση.

<b>Όνομα στελέχους</b>	<b>Κωδικός καταχώρησης στη Genbank</b>	<b>Χώρα προέλευσης</b>	<b>Κλινικό ιστορικό</b>
Imp.1147	AJ293869.1	Αγγλία	ΣΔΝΧ
Fd5	AY321997	Γαλλία	ΠΣΑΑΧ
Fd8	AY321995	Γαλλία	ΠΣΑΑΧ, ΣΔΝΧ
Fd12	AY321989	Γαλλία	ΠΣΑΑΧ, ΣΔΝΧ
Fh14	AY321982	Γαλλία	Κήλη
Fh18	AY321987	Γαλλία	Πνευμονία, πλευρίτιδα, περικαρδίτιδα
FRA3	AF201311	Γαλλία	ΠΣΑΑΧ
-	BD309022	-	Μυοκαρδίτιδα, αποβολή
-	BD309028	-	Μυοκαρδίτιδα, αποβολή
JHP	AF520783.1	Κορέα	ΣΔΝΧ
PCV2_212	AY256455.1	Ουγγαρία	ΣΔΝΧ
Imp.1121	AJ293868.1	Καναδάς	Αποβολή
PCV2_B	AF112862.1	Καναδάς	Διάφορα κλινικά σύνδρομα
PCV2_C	AF109398.1	Καναδάς	Διάφορα κλινικά σύνδρομα
PCV2_E	AF109399.1	Καναδάς	Διάφορα κλινικά σύνδρομα
PCV2_SC	AF465211.1	Ταϊβάν	Διάφορα κλινικά σύνδρομα
PCV2_BF	AF381175.1	Κίνα	Διάφορα κλινικά σύνδρομα
PCV2_HR	AF381176.1	Κίνα	Διάφορα κλινικά σύνδρομα
PCV2_BX	AF381177.1	Κίνα	Διάφορα κλινικά σύνδρομα
HZ0202	AY217743.1	Κίνα	Διάφορα κλινικά σύνδρομα
GER1	AF201305	Γερμανία	ΠΣΑΑΧ
SPA2	AF201309	Ισπανία	ΠΣΑΑΧ
AUT1	AY424401	Αυστρία	ΠΣΑΑΧ
AUT4	AY424404	Αυστρία	ΠΣΑΑΧ
NLPMWS1	AY484413	Ολλανδία	ΠΣΑΑΧ
ROM	DQ233257	Ρουμανία	ΠΣΑΑΧ, ΣΔΝΧ
GRE1	DQ915585	Ελλάδα	ΠΣΑΑΧ
GRE2	DQ915586	Ελλάδα	ΠΣΑΑΧ
GRE3	DQ915587	Ελλάδα	ΠΣΑΑΧ
GRE4	DQ915588	Ελλάδα	ΠΣΑΑΧ
GRE5	-	Ελλάδα	Κοκκιωματώδης εντερίτιδα
GRE6	-	Ελλάδα	Εξιδρωματική επιδερμίτιδα
GRE7	-	Ελλάδα	ΣΔΝΧ
GRE8	-	Ελλάδα	Νεκρωτική λεμφαδενίτιδα
GRE9	-	Ελλάδα	ΣΔΝΧ

## **2.2 Αποτελέσματα**

### **2.2.1 Διάφορα κλινικά σύνδρομα**

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν εννέα εκτροφές χοίρων οι οποίες βρίσκονταν σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της χώρας μας. Από κάθε εκτροφή επιλέχθηκαν δύο χοίροι που εμφάνιζαν χαρακτηριστικά για την εκτροφή κλινικά συμπτώματα. Ιστοτεμάχια από διάφορα όργανα συλλέχθηκαν για PCR και ιστοπαθολογικές εξετάσεις.

Τα κλινικά σύνδρομα που διαπιστώθηκαν στις εννέα εκτροφές, λαμβάνοντας υπόψη τα κλινικά συμπτώματα, τις μακροσκοπικές και ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις και την ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 2 σε διάφορα όργανα ήταν τα ακόλουθα: α) ΠΣΑΑΧ διαγνώστηκε σε τέσσερις εκτροφές, β) ΣΔΝΧ σε δύο εκτροφές, γ) εξιδρωματική επιδερμίτιδα σε μία εκτροφή, δ) νεκρωτική λεμφαδενίτιδα σε μία εκτροφή και ε) κοκκιωματώδης εντερίτιδα σε μία εκτροφή.

#### **2.2.1.1 ΠΣΑΑΧ**

##### **2.2.1.1.1 Κλινικά συμπτώματα**

Σε τέσσερις εκτροφές, οι χοίροι ηλικίας 6 έως 12 εβδομάδων εμφάνιζαν δύσπνοια και προοδευτική απώλεια βάρους. Η νοσηρότητα κυμαινόταν από 20% έως 30%, ενώ η θνησιμότητα ήταν περίπου 50%. Όσα ζώα νοσούσαν, δεν ανταποκρίνονταν στη χορήγηση αντιβιοτικών.

##### **2.2.1.1.2 Αποτελέσματα PCR**

Στα υπογνάθια, βρογχικά, μεσεντέρια και επιπολής βουβωνικά λεμφογάγγλια, το σπλήνα, το ήπαρ και τους πνεύμονες ανιχνεύθηκε DNA του κυκλοϊού 2. Τα δείγματα ήταν αρνητικά για τον κυκλοϊό1.

##### **2.2.1.1.3 Μακροσκοπικές αλλοιώσεις**

Παρατηρήθηκε διόγκωση των υπογναθίων, βρογχικών, μεσεντερίων και επιπολής βουβωνικών λεμφογαγγλίων (Εικόνες 1 και 2, Παράρτημα Ι). Οι πνεύμονες ήταν διογκωμένοι, ελαστικοί και εμφάνιζαν ωχρές και ερυθρές περιοχές στην επιφάνειά τους (Εικόνα 3, Παράρτημα Ι). Σε ορισμένες περιπτώσεις, στους νεφρούς διαπιστώθηκαν

διάσπαρτα λευκωπά οζίδια που αφορούσαν κυρίως τη φλοιώδη και σπανιότερα τη μυελώδη μοίρα.

#### 2.2.1.1.4 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις

Στα λεμφογάγγλια, τις αμυγδαλές και το σπλήνα (Εικόνα 4, Παράρτημα Ι) διαπιστώθηκαν αραιώση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων, διήθηση από μεγάλα μακροφάγα (ιστιοκύτταρα) και σχηματισμός πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων. Επίσης, παρατηρήθηκε διάμεση πνευμονία, η οποία συνοδευόταν από υπεραιμία και οίδημα. Στο ήπαρ, τα πυλαία διαστήματα είχαν διηθηθεί από λεμφοκύτταρα και μακροφάγα. Στη φλοιώδη μοίρα των νεφρών διαπιστώθηκαν εστίες ή εκτεταμένες περιοχές διάμεσης νεφρίτιδας.

### 2.2.1.2 ΣΔΝΧ

#### 2.2.1.2.1 Κλινικά συμπτώματα

Δερματικές αλλοιώσεις και απώλεια βάρους διαπιστώθηκαν σε χοίρους ηλικίας 10 έως 12 εβδομάδων που προέρχονταν από δύο εκτροφές. Το ποσοστό προσβολής ήταν περίπου 1% και η θνησιμότητα 10%.

#### 2.2.1.2.2 Αποτελέσματα PCR

Το δέρμα, οι πνεύμονες, οι νεφροί και ο σπλήνας ήταν θετικοί για το DNA του κυκλοϊού 2, ενώ DNA του κυκλοϊού 1 δεν ανιχνεύθηκε.

#### 2.2.1.2.3 Μακροσκοπικές αλλοιώσεις

Μακροσκοπικές αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν στο δέρμα και τους νεφρούς. Οι αλλοιώσεις του δέρματος (Εικόνα 5, Παράρτημα Ι), εντοπίζονταν κατά κύριο λόγο στα οπίσθια άκρα και στην περινεϊκή χώρα. Ειδικότερα, διαπιστώθηκαν ακανόνιστου σχήματος ερυθρές κηλίδες και βλατίδες που είχαν τάση για συνένωση. Οι νεφροί ήταν διογκωμένοι, αποχρωματισμένοι, με ανώμαλη λεπτοκοκκώδη όψη της επιφάνειάς τους (Εικόνα 6, Παράρτημα Ι). Τέλος, τα λεμφογάγγλια ήταν διογκωμένα και ομοιογενή στην επιφάνεια τομής τους.

#### 2.2.1.2.4 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις

Στο χόριο και τον υποδόριο ιστό του δέρματος, στους νεφρούς και το σπλήνα διαπιστώθηκαν ινιδώδης ή νεκρωτική αγγειίτιδα. Στους νεφρούς παρατηρήθηκαν σπειραματονεφρίτιδα και διάμεση νεφρίτιδα (Εικόνα 7, Παράρτημα Ι), ενώ στα λεμφογάγγλια κοκκιωματώδης φλεγμονή.

### 2.2.1.3 Εξιδρωματική επιδερμίτιδα

#### 2.2.1.3.1 Κλινικά συμπτώματα

Σε μια εκτροφή, οι χοίροι ηλικίας 7 έως 9 εβδομάδων εμφάνιζαν αλλοιώσεις στο δέρμα και απώλεια βάρους.

#### 2.2.1.3.2 Αποτελέσματα PCR

Στα υπογνάθια, βρογχικά, μεσεντέρια και επιπολής βουβωνικά λεμφογάγγλια, στους νεφρούς, το δέρμα, τους πνεύμονες, το ήπαρ και το σπλήνα ανιχνεύθηκε DNA του κυκλοϊού 2, ενώ τα ίδια δείγματα ήταν αρνητικά για τον κυκλοϊό 1.

#### 2.2.1.3.3 Μακροσκοπικές αλλοιώσεις

Οι χοίροι βρίσκονταν σε κακή θρεπτική κατάσταση και εμφάνιζαν ερυθρό- ή/και καστανόμαυρες κρούστες σε όλη σχεδόν την επιφάνεια του δέρματος (Εικόνα 8, Παράρτημα Ι). Στο κεφάλι, τα αυτιά και τα άκρα παρατηρήθηκαν ερυθρού χρώματος βλατίδες. Τα υπογνάθια, βρογχικά και επιπολής βουβωνικά λεμφογάγγλια ήταν διογκωμένα και μαλακής σύστασης. Στα υπογνάθια λεμφογάγγλια παρατηρήθηκαν μικρές νεκρωτικές εστίες.

#### 2.2.1.3.4 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις

Στο δέρμα διαπιστώθηκαν νέκρωση της επιδερμίδας και της θηλώδους στιβάδας του χορίου, αλλά δεν παρατηρήθηκε νεκρωτική ή ινιδώδης αγγειίτιδα. Στα υπογνάθια και τα επιπολής βουβωνικά λεμφογάγγλια διαπιστώθηκαν πολυεστιακή ή διάχυτη πηκτική νέκρωση, καθώς και εναποθέσεις αλάτων ασβεστίου. Επίσης, στο σπλήνα και τα βρογχικά λεμφογάγγλια διαπιστώθηκαν μικρές εστίες νέκρωσης.

#### **2.2.1.4 Νεκρωτική λεμφαδενίτιδα**

##### **2.2.1.4.1 Κλινικά συμπτώματα**

Σε μία εκτροφή, οι χοίροι ηλικίας 6 έως 8 εβδομάδων εμφάνιζαν διάρροια. Το ποσοστό προσβολής κυμαινόταν από 30% έως 50%, ενώ η θνησιμότητα ήταν περίπου 50%.

##### **2.2.1.4.2 Αποτελέσματα PCR**

Στα υπογνάθια, βρογχικά, μεσεντέρια και επιπολής βουβωνικά λεμφογάγγλια, στο σπλήνα, το ήπαρ, τους πνεύμονες και την καρδιά ανιχνεύθηκε DNA του κυκλοϊού 2, ενώ τα παραπάνω όργανα ήταν αρνητικά για τον κυκλοϊό 1.

##### **2.2.1.4.3 Μακροσκοπικές αλλοιώσεις**

Οι χοίροι βρίσκονταν σε κακή θρεπτική κατάσταση και ήταν αφυδατωμένοι. Κατά τη νεκροτομή διαπιστώθηκαν καταρροϊκή εντερίτιδα και πύκνωση των πνευμόνων. Τα λεμφογάγγλια, κυρίως τα βρογχικά και τα επιπολής βουβωνικά, ήταν διογκωμένα.

##### **2.2.1.4.4 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις**

Σε όλα τα λεμφογάγγλια διαπιστώθηκε εστιακή, πολυεστιακή ή διάχυτη πηκτική νέκρωση (Εικόνα 9, Παράρτημα Ι). Επίσης, παρατηρήθηκαν βρογχοδιάμεση πνευμονία, ελαφρού βαθμού εστιακή διάμεση νεφρίτιδα και διήθηση από μονοπύρηνια κύτταρα των περιπυλαίων διαστημάτων του ήπατος.

#### **2.2.1.5 Κοκκιοματώδης εντερίτιδα**

##### **2.2.1.5.1 Κλινικά συμπτώματα**

Σε μια εκτροφή, οι χοίροι ηλικίας 5 έως 7 εβδομάδων εμφάνιζαν διάρροια.

##### **2.2.1.5.2 Αποτελέσματα PCR**

Στα βρογχικά, μεσεντέρια και επιπολής βουβωνικά λεμφογάγγλια, τον ειλεό (πλάκες Peyer), το σπλήνα, το ήπαρ, τους πνεύμονες, την καρδιά και τους νεφρούς ανιχνεύθηκε DNA του κυκλοϊού 2, ενώ στα παραπάνω όργανα δεν ανιχνεύθηκε DNA του κυκλοϊού 1.

#### 2.2.1.5.3 Μακροσκοπικές αλλοιώσεις

Οι χοίροι ήταν αφυδατωμένοι και βρίσκονταν σε κακή θρεπτική κατάσταση. Κατά τη νεκροτομή, παρατηρήθηκε καταρροϊκή εντερίτιδα.

#### 2.2.1.5.4 Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις

Στις πλάκες του Peyer διαπιστώθηκαν κοκκιωματώδης φλεγμονή και αραιώση των λεμφοκυττάρων (Εικόνες 10 και 11, Παράρτημα Ι). Η κοκκιωματώδης φλεγμονή χαρακτηριζόταν από την παρουσία επιθηλιοειδών κυττάρων και γιγαντοκυττάρων, στο κυτταρόπλασμα των οποίων διαπιστώθηκαν πολλά μεγάλα αμφίφιλα έγκλειστα. Στα μεσεντέρια λεμφογάγγλια διαπιστώθηκε κοκκιωματώδης φλεγμονή, ενώ τα υπόλοιπα λεμφογάγγλια εμφάνιζαν πολυεστιακή έως διάχυτη πηκτική νέκρωση.

### 2.2.2 Φυλογενετική ανάλυση

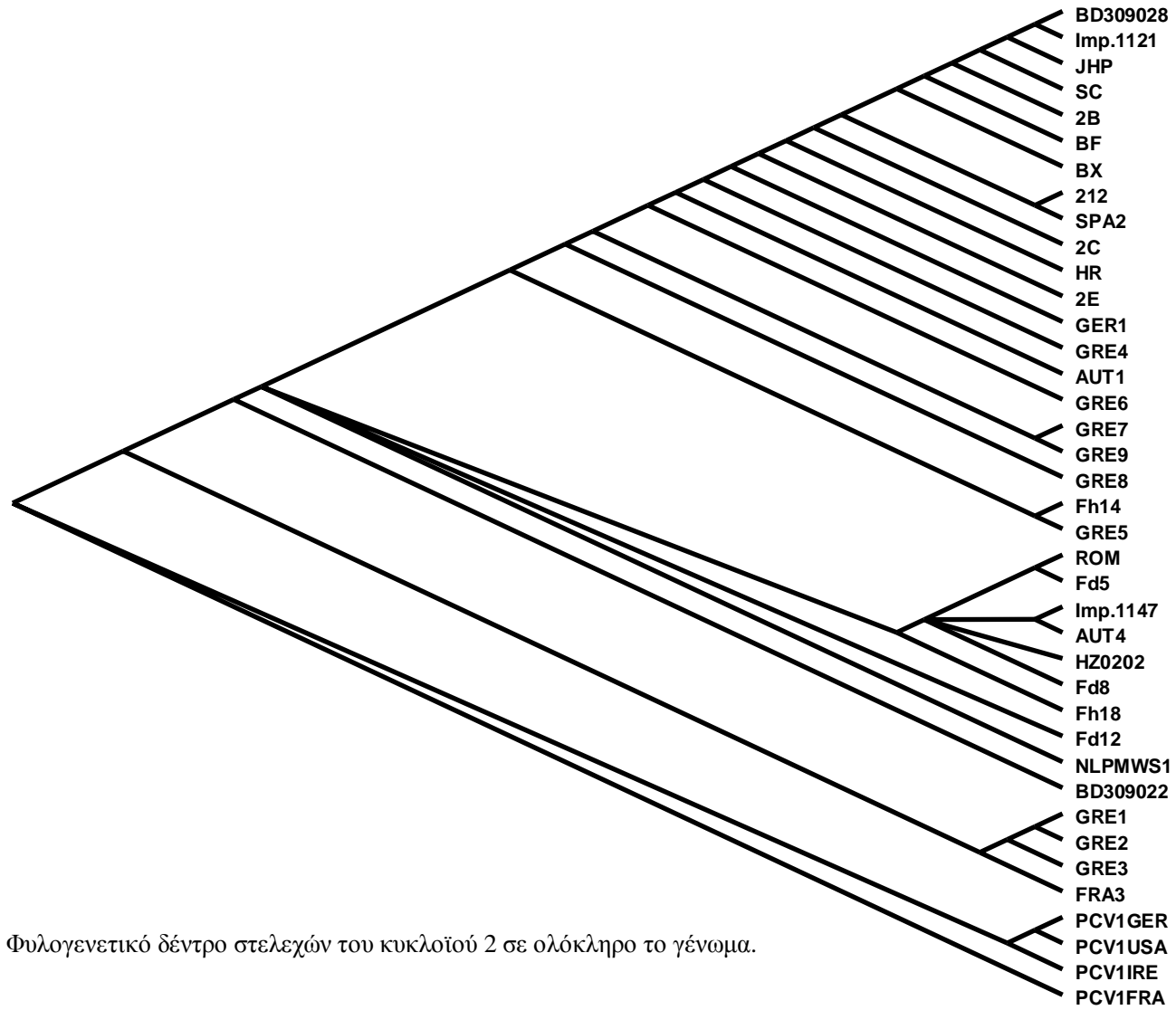
Δύο Ελληνικά στελέχη του κυκλοϊού 2 από οικόσιτους χοίρους (GRE4, GRE6) αποτελούνταν από 1.768 βάσεις, ενώ επτά απαρτίζονταν από 1.767 βάσεις, λόγω της έλλειψης ενός νουκλεοτιδίου στη θέση 1.040 - 1.042 (Fenaux και συν., 2000).

Με βάση τη φυλογενετική ανάλυση που έγινε σε ολόκληρο το γένωμα των στελεχών, τα Ελληνικά στελέχη σχημάτισαν δύο ομάδες με 91.4% έως 99.7% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (Σχήμα 1). Την πρώτη ομάδα σχημάτισαν τρία (GRE1, GRE2, GRE3) από τα τέσσερα Ελληνικά στελέχη που απομονώθηκαν από φυσικά περιστατικά ΠΣΑΑΧ. με 99% έως 99.7% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Η δεύτερη ομάδα περιλάμβανε τα υπόλοιπα Ελληνικά στελέχη με 91.4% έως 99.5% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Ειδικότερα, τα στελέχη που απομονώθηκαν από περιστατικά ΣΔΝΧ (GRE7, GRE9) κατατάχθηκαν μαζί με 99.5% ομοιότητα.

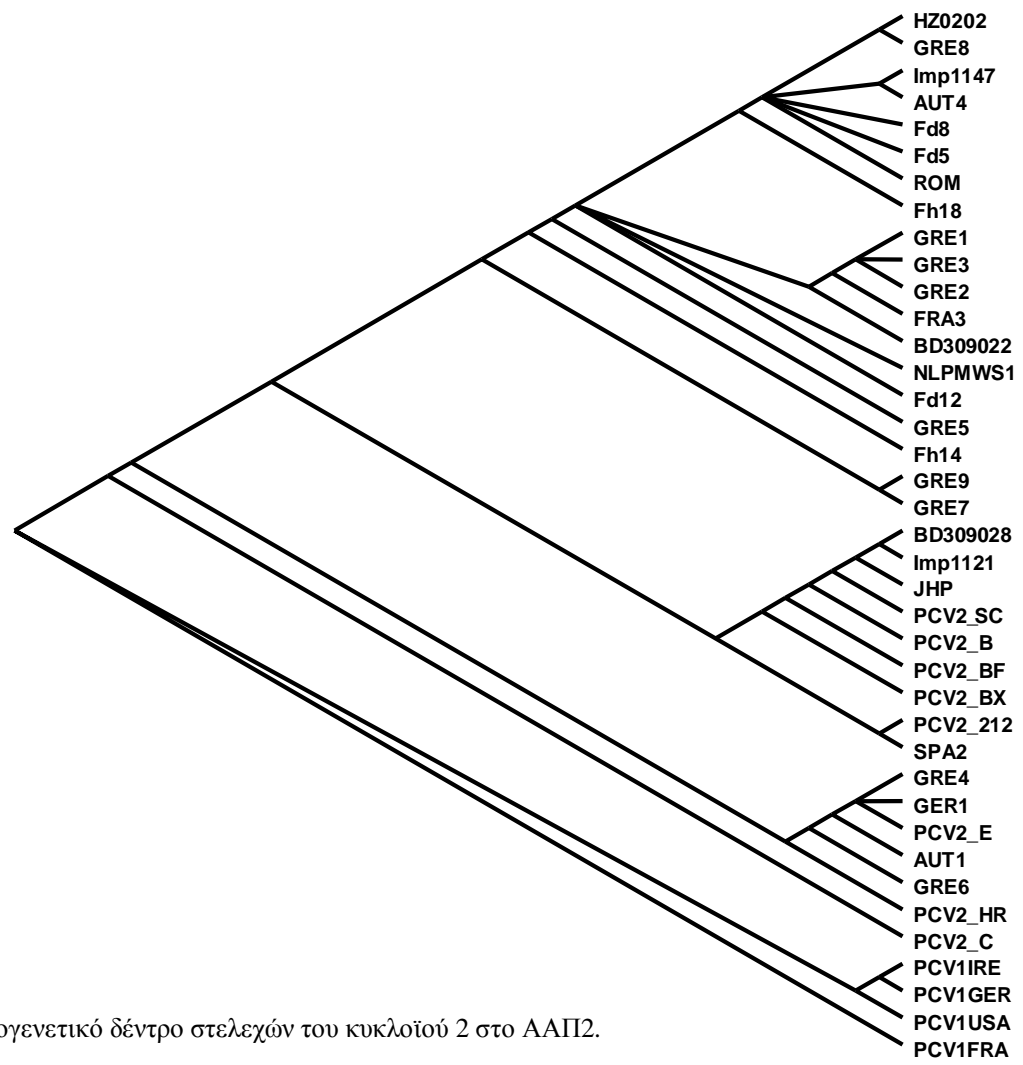
Το φυλογενετικό δέντρο που αφορούσε το ΑΑΠ2 έδειξε ότι τα Ελληνικά στελέχη σχημάτισαν δύο ομάδες με 88.4% έως 100% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (Σχήμα 2). Την πρώτη ομάδα σχημάτισαν ένα στέλεχος από ΠΣΑΑΧ (GRE4) και ένα στέλεχος από εξιδρωματική επιδερμίτιδα (GRE6) με 97% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Στη δεύτερη ομάδα συμπεριλήφθηκαν τα υπόλοιπα στελέχη με 89.8% έως 99.3% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Ειδικότερα, τα στελέχη από τα φυσικά

περιστατικά ΠΣΑΑΧ (GRE1, GRE2, GRE3) σχημάτισαν μια υποομάδα (98.6% έως 100% ομοιότητα) και δύο στελέχη από ΣΔΝΧ (GRE7, GRE9) μια δεύτερη (99.3% ομοιότητα).

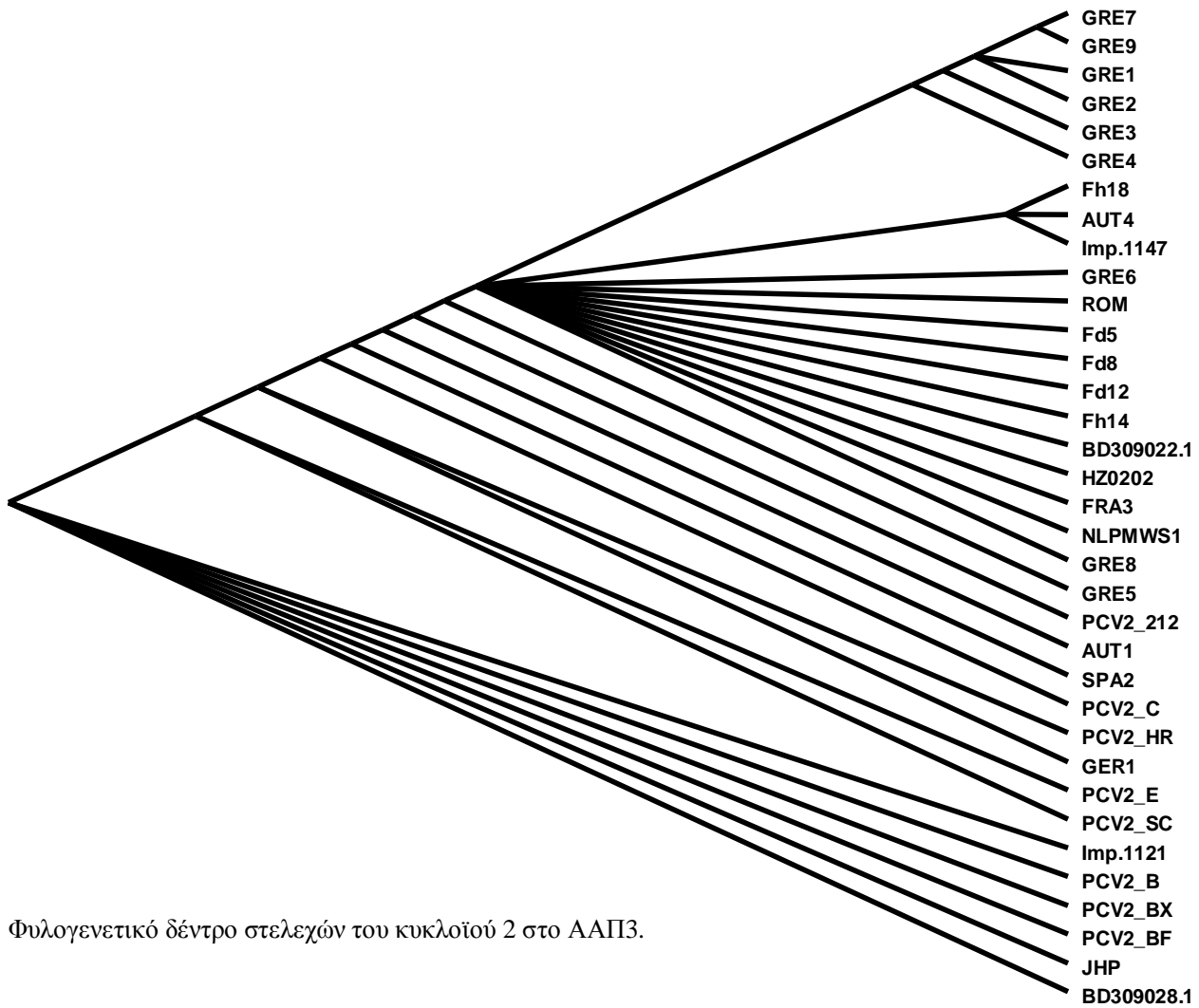
Τα Ελληνικά στελέχη είχαν 93.8% έως 100% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων στο ΑΑΠ3. Από τη φυλογενετική ανάλυση (Σχήμα 3) προέκυψε ότι τα τέσσερα Ελληνικά στελέχη από ΠΣΑΑΧ (GRE1, GRE2, GRE3, GRE4) και τα δύο στελέχη από ΣΔΝΧ (GRE7, GRE9) σχημάτισαν ομάδα με 94.9% έως 100% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Τα υπόλοιπα Ελληνικά στελέχη κατατάχθηκαν σε μια ευρύτερη ομάδα που περιλάμβανε τα Ελληνικά στελέχη από ΠΣΑΑΧ και ΣΔΝΧ.



Σχήμα 1. Φυλογενετικό δέντρο στελεχών του κυκλοϊού 2 σε ολόκληρο το γένωμα.



Σχήμα 2. Φυλογενετικό δέντρο στελεχών του κυκλώου 2 στο ΑΑΠ2.



Σχήμα 3. Φυλογενετικό δέντρο στελεχών του κυκλοϊού 2 στο ΑΑΠ3.

### 2.3 Συζήτηση

Το ΠΣΑΑΧ αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1997 (Harding και Clark, 1997) και ένα χρόνο αργότερα διαπιστώθηκε ότι ο κυκλοϊός 2 είναι ο αιτιολογικός παράγοντας του νοσήματος (Meehan και συν., 1998). Ο ιός συσχετίστηκε με διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις των χοίρων, αλλά μέχρι σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί ο ρόλος του στην αιτιοπαθογένεια των νοσημάτων. Σε παλαιότερες μελέτες είχε προταθεί η άποψη ότι τα στελέχη του ιού που απομονώθηκαν από χοίρους που νοσούσαν από διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις, όπως αναπαραγωγικά προβλήματα ή ΣΔΝΧ, θα μπορούσαν να διαφέρουν γενετικά από τα στελέχη που απομονώθηκαν από φυσικά περιστατικά ΠΣΑΑΧ (Meehan και συν., 2001, O'Connor και συν., 2001). Το ΠΣΑΑΧ και το ΣΔΝΧ στους οικόσιτους χοίρους αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στην Ελλάδα το 2002 (Saoulidis και συν., 2002). Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε αν ο κυκλοϊός 2 απαντάται σε χοίρους που εμφάνιζαν διαφορετικά κλινικά σύνδρομα στην Ελλάδα. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η ακολουθία των νουκλεοτιδίων εννέα στελεχών του ιού που ανιχνεύθηκαν από χοίρους οι οποίοι νοσούσαν από ΠΣΑΑΧ ή εμφάνιζαν διαφορετικά κλινικά σύνδρομα.

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν τέσσερις εκτροφές, στις οποίες οι χοίροι νοσούσαν από ΠΣΑΑΧ. Τα κλινικά συμπτώματα, οι μακροσκοπικές και οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις ήταν συμβατές με το νόσημα. Η διάγνωση του νοσήματος έγινε σύμφωνα με τα τρία κριτήρια κατά Sorden (2000). Επίσης, ΣΔΝΧ διαπιστώθηκε σε δύο εκτροφές. Η διάγνωση βασίστηκε στις μακροσκοπικές και τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. Παράλληλα, ο κυκλοϊός 2 ανιχνεύθηκε σε διάφορα όργανα των χοίρων. Η κλινική εικόνα και οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που εμφάνιζαν οι χοίροι που νοσούσαν από το ΣΔΝΧ ήταν όμοιες με εκείνες που αναφέρονται από τους Morilla και συν. (2002).

Εκτός από ΠΣΑΑΧ και ΣΔΝΧ, εξιδρωματική επιδερμίτιδα διαπιστώθηκε σε μια εκτροφή στην οποία οι χοίροι εμφάνιζαν δερματικές αλλοιώσεις. Η διάγνωση βασίστηκε στις μακροσκοπικές και τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν εστίες νέκρωσης στα υπογνάθια, τραχειοβρογχικά και επιπολής βουβωνικά λεμφογάγγλια. Ο κυκλοϊός 2 ανιχνεύθηκε σε διάφορα όργανα (νεφροί, δέρμα, πνεύμονες, ήπαρ, σπλήνας) συμπεριλαμβανομένων των λεμφογαγγλίων.

Νεκρωτική λεμφαδενίτιδα διαπιστώθηκε σε μια εκτροφή στην οποία οι χοίροι μετά τον απογαλακτισμό εμφάνιζαν διάρροια. Κατά τη νεκροτομή παρατηρήθηκαν καταρροϊκή εντερίτιδα και διόγκωση των λεμφογαγγλίων, ενώ κατά την ιστοπαθολογική

εξέταση διαπιστώθηκε πηκτική νέκρωση στα υπογνάθια, βρογχικά, μεσεντέρια και επιπολής βουβονικά λεμφογάγγλια. Ο κυκλοϊός 2 ανιχνεύθηκε σε διάφορα όργανα συμπεριλαμβανομένων των λεμφογαγγλίων που εμφάνιζαν νεκρώσεις.

Τέλος, κοκκιωματώδης εντερίτιδα διαγνώστηκε σε μια εκτροφή, στην οποία οι χοίροι εμφάνιζαν διάρροια. Κατά τη νεκροτομή παρατηρήθηκε καταρροϊκή εντερίτιδα. Στην ιστοπαθολογική εξέταση, διαπιστώθηκαν κοκκιωματώδης φλεγμονή και αραιώση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων στις πλάκες του Peyer. Κοκκιωματώδης φλεγμονή διαπιστώθηκε στα μεσεντέρια λεμφογάγγλια και πηκτική νέκρωση στα βρογχικά και τα επιπολής βουβονικά λεμφογάγγλια. Ο κυκλοϊός 2 ανιχνεύθηκε στο έντερο, τα λεμφογάγγλια, καθώς και σε διάφορα άλλα όργανα.

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί φυσικά περιστατικά εξιδρωματικής επιδερμίτιδας (Kim και Chae, 2004β), νεκρωτικής λεμφαδενίτιδας (Chae, 2004) και κοκκιωματώδους εντερίτιδας (Chae, 2004), τα οποία συσχετίστηκαν με τον κυκλοϊό 2. Από όσο γνωρίζουμε, ο συσχετισμός των παραπάνω νοσημάτων με τον ιό αναφέρεται για πρώτη φορά στη χώρα μας στη συγκεκριμένη μελέτη. Ο ρόλος όμως του ιού στα προαναφερθέντα νοσήματα, με εξαίρεση το ΠΣΑΑΧ, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να διαπιστωθεί αν πρόκειται για αιτιολογικό ή προδιαθέτοντα παράγοντα ή τυχαίο εύρημα.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η ακολουθία των νουκλεοτιδίων ενός στελέχους του ιού από κάθε εκτροφή. Ακολούθησε φυλογενετική ανάλυση σε ολόκληρο το γένωμα που αφορούσε Ελληνικά στελέχη του ιού, καθώς και στελέχη κατατεθειμένα στην Τράπεζα Δεδομένων, τα οποία ανιχνεύθηκαν από χοίρους που εμφάνιζαν διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις. Τα στελέχη σχημάτισαν ομάδες στο φυλογενετικό δέντρο ανεξάρτητα από τη χώρα προέλευσής τους. Ειδικότερα, τα Ελληνικά στελέχη δεν ήταν μονοφυλετικά και σχημάτισαν ομάδα μαζί με στελέχη από τη Γαλλία, τη Γερμανία και την Αυστρία. Η ομοιότητα των Ελληνικών στελεχών με στελέχη από άλλες Ευρωπαϊκές χώρες μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο κυκλοϊός 2 πιθανά να εισήρθε στη χώρα μας με την εισαγωγή γεννητόρων από το εξωτερικό. Επίσης, τα στελέχη δε σχημάτισαν ομάδες με βάση τα κλινικά σύνδρομα από τα οποία ανιχνεύθηκαν, καταρρίπτοντας την αρχική υπόθεση ότι διαφορετικά στελέχη του ιού σχετίζονται με τα διαφορετικά κλινικά σύνδρομα. Τα παραπάνω ευρήματα συμφωνούν με προηγούμενη μελέτη στην οποία προσδιορίστηκε η ακολουθία των νουκλεοτιδίων σε μεγάλο αριθμό στελεχών που προέρχονταν από χοίρους που εμφάνιζαν διαφορετικά κλινικά σύνδρομα. Από τη σύγκρισή τους προέκυψε ότι τα στελέχη είχαν μικρές διαφορές στο γένωμά τους οι

οποίες δε συσχετίστηκαν με τα διαφορετικά κλινικά σύνδρομα (Larochelle και συν., 2002).

Η φυλογενετική ανάλυση στο ΑΑΠ2 πραγματοποιήθηκε γιατί η συγκεκριμένη περιοχή εμφανίζει τη μεγαλύτερη διακύμανση σε επίπεδο νουκλεοτιδίων ανάμεσα στα στελέχη. Θεωρήθηκε ότι η διαφορά στη λοιμογόνο δύναμη που εμφάνιζαν τα στελέχη του ιού θα μπορούσε να οφείλεται στην ποικιλομορφία που παρατηρείται στην πρωτεΐνη της κάψας, η οποία κωδικοποιείται από το ΑΑΠ2 (Larochelle και συν., 2002). Από τη φυλογενετική ανάλυση στη συγκεκριμένη μελέτη προέκυψε ότι τα στελέχη σχημάτισαν ομάδες στο φυλογενετικό δέντρο ανεξάρτητα από το κλινικό σύνδρομο από το οποίο ανιχνεύθηκαν. Το ΑΑΠ2 φαίνεται ότι δεν καθορίζει τη λοιμογόνο δύναμη των στελεχών, όπως έχει ήδη αναφερθεί από τους Larochelle και συν. (2002).

Παρόλα αυτά, η λοιμογόνος δύναμη του ιού θα μπορούσε να καθορίζεται από άλλα γονίδια ή γονιδιακές περιοχές. Για τον παραπάνω λόγο έγινε φυλογενετική ανάλυση στο ΑΑΠ3, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη διαδικασία της απόπτωσης που προκαλεί ο ιός *in vivo* και *in vitro* (Liu και συν., 2005, 2006). Σύμφωνα με τους Liu και συν. (2006), η έκφραση της πρωτεΐνης του ΑΑΠ3 έχει ως αποτέλεσμα την αραίωση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων και εμφανείς αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων. Στο φυλογενετικό δέντρο τα Ελληνικά στελέχη που ανιχνεύθηκαν από φυσικά περιστατικά ΠΣΑΑΧ και ΣΔΝΧ σχημάτισαν μια ομάδα. Στα προαναφερθέντα περιστατικά, διαπιστώθηκαν οι χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που προκαλεί ο ιός όπως αραίωση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων και κοκκιοματώδης φλεγμονή στα λεμφογάγγλια. Τα Ελληνικά στελέχη που ανιχνεύθηκαν από τα φυσικά περιστατικά κοκκιοματώδους εντερίτιδας, νεκρωτικής λεμφαδενίτιδας και εξιδρωματικής επιδερμίτιδας, στα οποία διαπιστώθηκαν και νεκρώσεις στα λεμφογάγγλια, κατατάχθηκαν μεμονωμένα σε μια ευρύτερη ομάδα που περιλάμβανε τα Ελληνικά στελέχη από ΠΣΑΑΧ και ΣΔΝΧ. Τα στελέχη σχημάτισαν ομάδες ανεξάρτητα από το κλινικό σύνδρομο από το οποίο ανιχνεύθηκαν και θα μπορούσαμε να εξηγήσουμε την κατάταξη των Ελληνικών στελεχών στο φυλογενετικό δέντρο με βάση το είδος των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων που παρατηρήθηκαν. Όσα στελέχη ανιχνεύθηκαν από φυσικά περιστατικά στα οποία παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που προκαλεί ο ιός σχημάτισαν μια ομάδα..

Από τις φυλογενετικές αναλύσεις σε ολόκληρο το γένωμα των στελεχών και στα ΑΑΠ2 και ΑΑΠ3 προέκυψε ότι τα στελέχη εμφάνιζαν μεγάλη ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων ανεξάρτητα από το κλινικό σύνδρομο από το οποίο ανιχνεύθηκαν ή τη

χώρα προέλευσής τους. Ωστόσο, η φυλογενετική ανάλυση στο ΑΑΠ3 έδειξε ότι υπάρχει συσχετισμός ανάμεσα στα στελέχη και το είδος των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων που παρατηρούνται. Μέχρι σήμερα, έχει διαπιστωθεί ότι το ΑΑΠ1, το ΑΑΠ2 και το ΑΑΠ3 κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες και δεν έχει διευκρινιστεί ο ακριβής αριθμός των ΑΑΠ που υπάρχουν στο γένωμα του ιού. Είναι πιθανό ότι εκτός από το ΑΑΠ3 στο οποίο αποδίδεται η αραιώση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων, άλλα γονίδια που κωδικοποιούνται στο γένωμα του ιού να είναι υπεύθυνα για τη λοιμογόνο δύναμή του. Επίσης, παράγοντες όπως η ηλικία και η οδός μόλυνσης, θα μπορούσαν να επηρεάζουν τη παθογόνο δράση του ιού και την εκδήλωση διαφορετικών κλινικών συνδρόμων.

Από τη σύγκριση των Ελληνικών στελεχών σε επίπεδο νουκλεοτιδίων προέκυψε ότι το στέλεχος που ανιχνεύθηκε από το χοίρο που εμφάνιζε νεκρωτική λεμφαδενίτιδα είχε τη μεγαλύτερη διακύμανση. Με σκοπό να διερευνηθεί αν η νεκρωτική λεμφαδενίτιδα αποτελεί χαρακτηριστική ιδιότητα του στελέχους του ιού ή αν υπεισέρχονται και άλλοι παράγοντες στην πρόκλησή της, σε επόμενο κεφάλαιο της διατριβής θα μελετηθούν τα αποτελέσματα της πειραματικής μόλυνσης χοιριδίων με το παραπάνω στέλεχος.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

### **3. Πολυσυστηματικό Σύνδρομο Απίσχνανσης των Απογαλακτισμένων Χοιριδίων σε αγριόχοιρους**

#### **3.1.1 Κλινικά περιστατικά**

Ένας θηλυκός αγριόχοιρος (*Sus scrofa*), ο οποίος κυοφορούσε, βρέθηκε νεκρός σε μια κυνηγετική περιοχή ( $5 \times 10^6 \text{ m}^2$ ) στην Καλαμπάκα το 2002. Τεμάχια ιστών από το σπλήνα, τους πνεύμονες, το ήπαρ, τη μήτρα, καθώς και δύο έμβρυα προσκομίστηκαν από την Κυνηγετική Ομοσπονδία στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το 2005, ένας αρσενικός αγριόχοιρος (*Sus scrofa*) βρέθηκε σε ημιθανή κατάσταση σε ένα άλλο κυνηγετικό καταφύγιο ( $479 \times 10^6 \text{ m}^2$ ) στην περιοχή της Καλαμπάκας. Το ζώο ήταν σε απίσχνανση, εμφάνιζε δύσπνοια και υπέκυψε κατά τη μεταφορά του στο τμήμα Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ο προσδιορισμός της ηλικίας του έγινε με βάση την έκφυση των οδόντων (Boitani και Mattei, 1992) και διαπιστώθηκε ότι ήταν μικρότερο των έξι μηνών. Επακολούθησε νεκροτομή κατά την οποία λήφθηκαν ιστοτεμάχια από τα υπογνάθια, βρογχικά, μεσεντέρια και επιπολής βουβονικά λεμφογάγγλια, τους πνεύμονες, το ήπαρ, τους νεφρούς, την καρδιά και το λεπτό έντερο. Δείγματα και από τους δύο αγριόχοιρους διατηρήθηκαν στους  $-70^\circ\text{C}$  για να εξεταστούν με την τεχνική της PCR. Τεμάχια αυτών μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10% για ιστοπαθολογική εξέταση.

Οι δύο κυνηγετικές περιοχές συνόρευαν γεγονός που επέτρεπε τη μετακίνηση των αγριόχοιρων ανάμεσα στις δύο περιοχές.

#### **3.1.2 Απομόνωση DNA και RNA**

Η απομόνωση του DNA από ιστοτεμάχια από τα διάφορα όργανα γινόταν με τη χρήση του εμπορικού kit Puregene (DNA cell and tissue isolation kit, Gentra Systems, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Το DNA αποθηκευόταν στους  $-20^\circ\text{C}$  για να εξεταστεί με PCR. Η απομόνωση του RNA γινόταν με τη χρήση του εμπορικού kit Puregene (RNA cell and tissue isolation kit, Gentra Systems, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Το RNA διατηρούταν στους  $-70^\circ\text{C}$  για να εξεταστεί με την τεχνική της αντίστροφης μεταγραφάσης - αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR).

### **3.1.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης**

Τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων για την ανίχνευση DNA του κυκλοϊού1 (Mankertz και συν., 2000) και του κυκλοϊού 2 (Mankertz και συν., 2000) περιγράφηκαν στην παράγραφο 2.1.2. Οι εκκινητές που περιγράφηκαν από τους Kim και συν. (2003β) χρησιμοποιούνταν για την ανίχνευση DNA του παρβοϊού. Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιούνταν για την ανίχνευση του ιού του ΑΑΣΧ έχουν περιγραφεί από τους Gilbert και συν. (1997).

### **3.1.4 Ιστοπαθολογική εξέταση**

Η περιγραφή της μεθοδολογίας της ιστοπαθολογικής εξέτασης είναι η ίδια με αυτή που αναφέρεται στην παράγραφο 2.1.7.

### **3.1.5 Προσδιορισμός της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων**

Η περιγραφή της μεθοδολογίας με την οποία έγινε ο προσδιορισμός της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων σε δύο στελέχη του κυκλοϊού 2 από αγριόχοιρους είναι η ίδια με αυτή που αναφέρεται στην παράγραφο 2.1.4.

### **3.1.6 Κατάθεση στελεχών στην Τράπεζα Δεδομένων**

Τα δύο Ελληνικά στελέχη του ιού που ανιχνεύθηκαν από τους αγριόχοιρους κατατέθηκαν στην Τράπεζα Δεδομένων (GenBank) με τους ακόλουθους αριθμούς καταχώρησης (GenBank accession numbers): DQ915583 (GRE-WB1) και DQ915584 (GRE-WB2).

### **3.1.7 Σύγκριση της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων και φυλογενετική ανάλυση**

Τα στελέχη του κυκλοϊού 2 που ανιχνεύθηκαν από αγριόχοιρους ονομάστηκαν με τους κωδικούς GRE-WB1 για το νεαρό αρσενικό αγριόχοιρο και GRE-WB2 για το θηλυκό αγριόχοιρο. Η απομόνωση του GRE-WB1 έγινε από τα βουβωνικά λεμφογάγγλια, ενώ το GRE-WB2 απομονώθηκε από τη μήτρα. Στελέχη του ιού από άλλους αγριόχοιρους, καθώς και από οικόσιτους χοίρους που ήταν κατατεθειμένα στην Τράπεζα Δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων και τη φυλογενετική ανάλυση. Η φυλογενετική ανάλυση αφορούσε ολόκληρο το γένωμα των στελεχών και το ΑΑΠ2 και πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA 3.1 (Kumar και συν., 2004). Η παράμετρος Kimura 2 χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο αντικατάστασης των νουκλεοτιδίων για τη

δημιουργία των neighbor-joining φυλογενετικών δέντρων. Χίλιες ψευδο-επαναλήψεις έγιναν για να ελεγχθεί η κατάταξη των στελεχών στο φυλογενετικό δέντρο. Τέσσερα στελέχη του κυκλοϊού 1 χρησιμοποιήθηκαν για να τοποθετηθεί η ρίζα στο δέντρο.

## **3.2 Αποτελέσματα**

### **3.2.1 Ανίχνευση DNA και RNA**

Στο νεαρό αγριόχοιρο, DNA του κυκλοϊού 2 ανιχνεύθηκε στα υπογνάθια, τα βρογχικά, τα μεσεντέρια και τα επιπολής βουβωνικά λεμφογάγγλια, τους πνεύμονες, την καρδιά και το λεπτό έντερο. Στο θηλυκό αγριόχοιρο, DNA του ιού ανιχνεύθηκε στο σπλήνα, τους πνεύμονες, το ήπαρ και τη μήτρα, αλλά όχι στα δύο έμβρυα. Στους δύο αγριόχοιρους δε διαπιστώθηκε παρουσία DNA του κυκλοϊού 1 και του παρβοϊού. Στους πνεύμονες του θηλυκού αγριόχοιρου ανιχνεύθηκε RNA του ιού του ΑΑΣΧ.

### **3.2.2 Παθολογοανατομικές αλλοιώσεις**

Ο νεαρός αγριόχοιρος βρισκόταν σε κακή θρεπτική κατάσταση. Οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν ήταν μετρίου βαθμού διόγκωση των υπογνάθιων, βρογχικών, μεσεντέριων και επιπολής βουβωνικών λεμφογαγγλίων και ελαφρού βαθμού διόγκωση των πνευμόνων, οι οποίοι είχαν ελαστική σύσταση.

Κατά την ιστοπαθολογική εξέταση, στο λεμφικό ιστό διαπιστώθηκε ποικίλου βαθμού αραίωση των λεμφοκυττάρων, διήθηση από μεγάλα μακροφάγα (επιθηλιοειδή) και σε ορισμένες περιπτώσεις σχηματισμός πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων (Εικόνα 12). Οι παραπάνω αλλοιώσεις είναι χαρακτηριστικές σε εκτρεφόμενους χοίρους που εμφανίζουν ΠΣΑΑΧ. Στους πνεύμονες, διαπιστώθηκε διάμεση πνευμονία που συνοδευόταν από υπεραϊμία και οίδημα (Εικόνα 13). Στους νεφρούς, διαπιστώθηκε εστιακή, πολυεστιακή έως διάχυτη διάμεση νεφρίτιδα (Εικόνα 14). Στο ήπαρ, παρατηρήθηκε διήθηση μονοπύρηνων κυττάρων στα περιπυλαία διαστήματα, καθώς και αύξηση των ινών κολλαγόνου. Τέλος, στην καρδιά, διαπιστώθηκε ελαφρού έως μετρίου βαθμού εστιακή διάμεση μυοκαρδίτιδα η οποία χαρακτηριζόταν κυρίως από περιαγγειακή διήθηση μακροφάγων κυττάρων και λεμφοκυττάρων (Εικόνα 15).

Στο θηλυκό αγριόχοιρο, οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις δεν ήταν δυνατό να παρατηρηθούν ή και να αξιολογηθούν, λόγω του μικρού μεγέθους των τεμαχίων ιστών που προσκομίστηκαν στο εργαστήριο. Οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στο σπλήνα, τους πνεύμονες και το ήπαρ, ήταν όμοιες με εκείνες που παρατηρήθηκαν στο νεαρό αγριόχοιρο, αλλά πιο έντονου βαθμού.

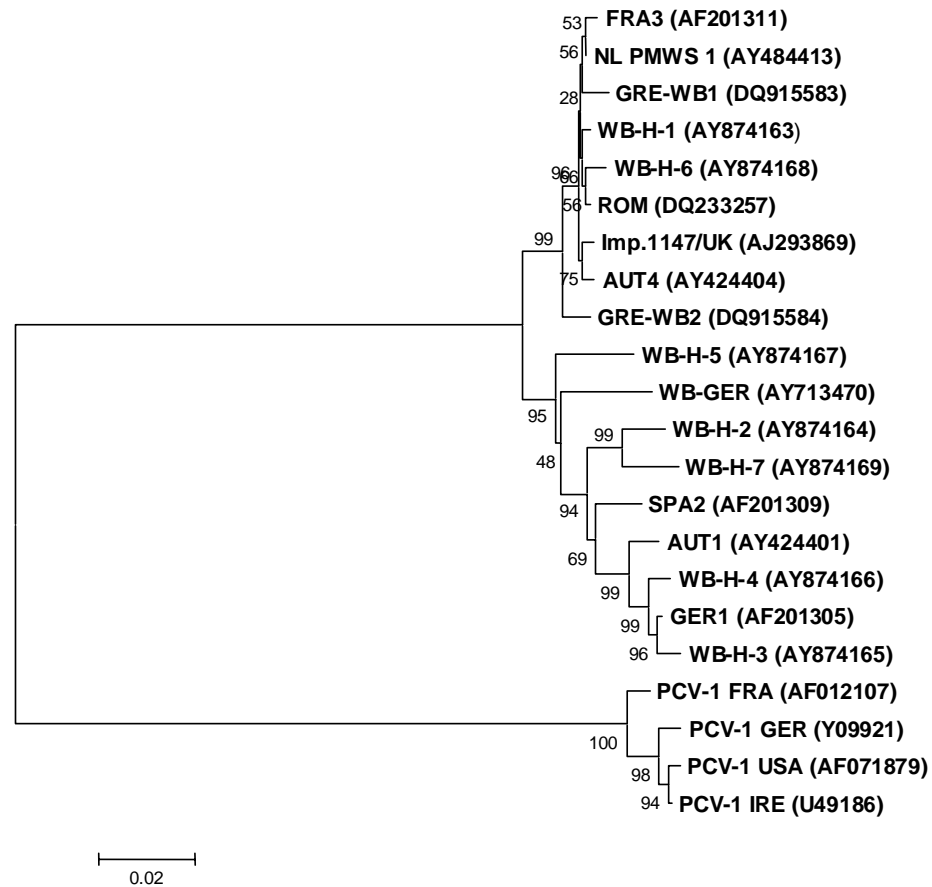
### 3.2.3 Φυλογενετική Ανάλυση

Τα Ελληνικά στελέχη του κυκλοϊού 2 που ανιχνεύθηκαν από τους αγριόχοιρους (GRE-WB1, GRE-WB2) αποτελούνταν από 1.767 βάσεις, λόγω της έλλειψης ενός νουκλεοτιδίου στη θέση 1.040-1.042, σε σχέση με τα στελέχη του ιού που απαρτίζονται από 1.768 βάσεις (Fenaux και συν., 2000).

Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 18 στελέχη του ιού που προέρχονταν από οικόσιτους και άγριους χοίρους, συμπεριλαμβανομένων των δύο Ελληνικών στελεχών από τους αγριόχοιρους, και αφορούσε ολόκληρο το γένωμα των στελεχών (Σχήμα 1). Σύμφωνα με το φυλογενετικό δέντρο, τα στελέχη σχημάτισαν δύο ομάδες. Ειδικότερα, τα Ελληνικά στελέχη από τους αγριόχοιρους εμφάνισαν 98,5% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και σχημάτισαν ομάδα μαζί με δύο στελέχη που ανιχνεύθηκαν από αγριόχοιρους στην Ουγγαρία (WB-H-1, WB-H-6), με τα οποία είχαν 98,6% έως 99,3% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Τα υπόλοιπα στελέχη από τους αγριόχοιρους σχημάτισαν ξεχωριστή ομάδα και εμφάνισαν ομοιότητα 94,8% έως 98,9 % σε επίπεδο νουκλεοτιδίων.

Η φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο γονίδιο ΑΑΠ2, οδήγησε σε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Σχήμα 1. Φυλογενετικό δέντρο σε ολόκληρο το γένωμα 18 στελεχών του κυκλοϊού 2 από άγριους και οικόσιτους χοίρους.



Στο σχήμα αναφέρονται οι κωδικοί καταχώρησης στη GenBank και η γεωγραφική προέλευση των στελεχών (AUT, Αυστρία, FRA, Γαλλία, GER, Γερμανία, GRE, Ελλάδα, H, Ουγγαρία, IRE, Ιρλανδία, NL, Ολλανδία, ROM, Ρουμανία, SPA, Ισπανία, UK, Αγγλία). Τα στελέχη από τους αγριόχοιρους έχουν την κατάληξη WB.

### 3.3 Συζήτηση

Σε προηγούμενες μελέτες έχει αναφερθεί ότι οι αγριόχοιροι νοσούν από ΠΣΑΑΧ (Schulze και συν., 2004, Vicente και συν., 2004). Από ορολογικές έρευνες προέκυψε ότι η λοίμωξη από κυκλοϊό 2 είναι λιγότερο συχνή στους αγριόχοιρους, σε σχέση με τους οικόσιτους χοίρους (Vicente και συν., 2004). Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι παράγοντες, όπως είναι οι συνθήκες διαβίωσης, η σύντομη διάρκεια της περιόδου γαλουχίας και οι εμβολιασμοί, που βοηθούν την εξάπλωση του ιού στις συστηματικές εκτροφές, δεν παρατηρούνται στους αγριόχοιρους. Στη συγκεκριμένη μελέτη αναφέρεται για πρώτη φορά το ΠΣΑΑΧ σε Ελληνικούς αγριόχοιρους, παρόλο που το σύνδρομο έχει διαπιστωθεί από το 2002 σε οικόσιτους χοίρους στη χώρα μας (Saoulidis και συν., 2002).

Σε προηγούμενες μελέτες που αφορούσαν το ΠΣΑΑΧ σε αγριόχοιρους, δε διαπιστώθηκαν κλινικά συμπτώματα, αλλά μόνο ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις (Toplak και συν., 2004, Vicente και συν., 2004). Στη δική μας μελέτη, κλινικά συμπτώματα όπως η απίσχνανση και η δύσπνοια καταγράφηκαν σε έναν αγριόχοιρο, ο οποίος είχε ηλικία μικρότερη των έξι μηνών. Οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις ήταν όμοιες με εκείνες που παρατηρούνται σε οικόσιτους και άγριους χοίρους που εμφανίζουν το νόσημα (Schulze και συν., 2004, Toplak και συν., 2004, Vicente και συν., 2004). Η διάγνωση του ΠΣΑΑΧ στο συγκεκριμένο αγριόχοιρο έγινε σύμφωνα με τα τρία κατά Sorden (2000) κριτήρια. Μέχρι σήμερα, οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται στο νόσημα έχουν διαπιστωθεί σε αγριόχοιρους μεγαλύτερης ηλικίας. Από όσο γνωρίζουμε, το ΠΣΑΑΧ δεν έχει αναφερθεί ξανά σε αγριόχοιρο ηλικίας μικρότερης των έξι μηνών. Η ηλικία του συγκεκριμένου ζώου ήταν παρόμοια με εκείνη των οικόσιτων χοίρων (2 έως 4 μηνών) που εμφανίζουν το νόσημα (Segales και Domingo, 2002). Η αναφορά του ΠΣΑΑΧ σε ένα νεαρό αγριόχοιρο υποδηλώνει ότι και τα νεαρά ζώα μπορούν να εμφανίσουν το νόσημα.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, ΠΣΑΑΧ διαπιστώθηκε και σε ενήλικο θηλυκό αγριόχοιρο. Η διάγνωση στη δική μας περίπτωση, βασίστηκε στις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις και την ανίχνευση DNA του ιού σε διάφορα όργανα. Δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί αν ο θάνατος του ζώου προκλήθηκε από το ΠΣΑΑΧ, αφού μόνο τμήματα οργάνων προσκομίστηκαν στο εργαστήριο και τα κλινικά συμπτώματα του ζώου δεν καταγράφηκαν. Οι έντονου βαθμού ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν θα μπορούσαν να είναι αποτέλεσμα της ταυτόχρονης λοίμωξης με τον κυκλοϊό 2 και τον ιό του ΑΑΣΧ. Στους οικόσιτους χοίρους, ο κυκλοϊός 2 είναι ο αιτιολογικός παράγοντας του

ΠΣΑΑΧ, αλλά ταυτόχρονη λοίμωξη από τον ιό του ΑΑΣΧ οδηγεί στην εκδήλωση σοβαρότερης μορφής νόσου (Harms και συν., 2001).

Η ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 2 σε μήτρα αγριόχοιρου που εμφάνιζε ΠΣΑΑΧ, αναφέρεται για πρώτη φορά στη συγκεκριμένη μελέτη. Η λοίμωξη από τον ιό πιθανά να προκάλεσε αιμία και διασπορά του ιού σε διάφορα όργανα συμπεριλαμβανομένης και της μήτρας. Στα έμβρυα δεν ανιχνεύθηκε DNA του ιού, αν και είναι πιθανό ότι θα μπορούσε να ανιχνευθεί σε πιο προχωρημένο στάδιο της κυοφορίας, αφού από πειραματικές μελέτες έχει προκύψει ότι τα έμβρυα μπορούν να μολυνθούν από τον κυκλοϊό 2 σε διάφορα στάδια της κυοφορίας (Park και συν., 2005, Pensaert και συν., 2004, Sanchez και συν., 2001). Από τα ευρήματά μας προέκυψε ότι ο ιός θα μπορούσε να εμπλέκεται στην πρόκληση αναπαραγωγικών προβλημάτων στους αγριόχοιρους, όπως συμβαίνει στους οικόσιτους χοίρους (O'Connor και συν., 2001).

Το πρώτο φυσικό περιστατικό του ΠΣΑΑΧ σε Ελληνικούς αγριόχοιρους το διαπιστώθηκε το 2002 και το δεύτερο το 2005. Τα δύο ζώα προέρχονταν από διαφορετικά κυνηγετικά καταφύγια, τα οποία συνόρευαν και βρίσκονταν στην ίδια περιοχή. Η μεγάλη ομοιότητα των δύο Ελληνικών στελεχών (GRE-WB1, GRE-WB2) σε επίπεδο νουκλεοτιδίων υποδηλώνει ότι η μετακίνηση των αγριόχοιρων ανάμεσα στις δύο περιοχές οδήγησε στην εξάπλωση του ιού. Η μικρή διαφορά σε επίπεδο νουκλεοτιδίων που εμφάνιζαν τα προαναφερθέντα στελέχη θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα σημειακών μεταλλάξεων.

Στη φυλογενετική ανάλυση στο γονίδιο ΑΑΠ2, καθώς και σε ολόκληρο το γένωμα, τα στελέχη από τους άγριους και τους οικόσιτους χοίρους δε σχημάτισαν διαφορετικές ομάδες, αλλά ταξινομήθηκαν μαζί, όπως έχει ήδη αναφερθεί από τους Vicente και συν. (2004). Ο ιός δεν εμφάνιζε ειδικότητα ξενιστή και τα στελέχη μεταδόθηκαν από τους οικόσιτους στους άγριους χοίρους ή και αντίστροφα. Οι αγριόχοιροι θα μπορούσαν να παίξουν το ρόλο φορέα ή να αποτελέσουν πηγή μόλυνσης των οικόσιτων χοίρων στις περιοχές που εκτροφές συνορεύουν με κυνηγετικές περιοχές.

Μέχρι τώρα δεν έχει βρεθεί η δεξαμενή του ιού που θα μπορούσε να αποτελεί πηγή μόλυνσης τόσο των οικόσιτων, όσο και των άγριων χοίρων. Από τα ευρήματά μας σε δύο αγριόχοιρους προκύπτει ότι αυτοί θα μπορούσαν να αποτελούν τη δεξαμενή του ιού. Παρόλα αυτά, περισσότερες μελέτες απαιτούνται με σκοπό να διευκρινιστούν τόσο η έκταση της λοίμωξης από τον ιό στους αγριόχοιρους, όσο και η επιδημιολογία του συγκεκριμένου νοσήματος.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

## 4. Πειραματική μόλυνση χοιριδίων με κυκλοϊό 2

### 4.1 Σχεδιασμός πειραματικής μελέτης

Στην πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 20 αρσενικά, ευνουχισμένα χοιρίδια ηλικίας 33 ημερών, τα οποία προέρχονταν από διασταύρωση των φυλών Landrace με Large White. Τα χοιρίδια απογαλακτίστηκαν στην ηλικία των τεσσάρων εβδομάδων και επιλέχθηκαν με τυχαίο τρόπο από μια εκτροφή, στην οποία δεν είχε διαγνωστεί ούτε ΠΣΑΑΧ, ούτε άλλα νοσήματα που συσχετιζόνταν με τον κυκλοϊό 2. Η εκτροφή ήταν απαλλαγμένη από παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως ο ιός της νόσου του Audjesky, ο παρβοϊός, ο ιός του ΑΑΣΧ, το *Mycoplasma hyopneumoniae* και ο *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Οι χοιρομητέρες προέρχονταν από τη Δανία, είχαν πραγματοποιήσει έναν τοκετό από την εισαγωγή τους στην εκτροφή, δεν είχαν αντισώματα έναντι του κυκλοϊού 2 και είχαν εμβολιαστεί κατά της *Escherichia coli*, του *Erysipelothrix rhusiopathiae*, του παρβοϊού και του ιού της νόσου του Audjesky. Οι κάπροι ήταν εμβολιασμένοι κατά του *Erysipelothrix rhusiopathiae*, του παρβοϊού και του ιού της νόσου του Audjesky. Τα χοιρίδια είχαν εμβολιαστεί στην ηλικία των 7 ημερών κατά του *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Η μεταφορά των χοιριδίων σε κατάλληλα διαμορφωμένο χώρο του ΕΘ.ΙΑΓ.Ε. Καρδίτσας, έγινε πέντε ημέρες μετά τον απογαλακτισμό τους. Τα χοιρίδια παρέμειναν μία εβδομάδα για να προσαρμοστούν μέχρι να ενοφθαλμιστούν με τον ιό. Την ημέρα της άφιξης των χοιριδίων (-7 ημέρα), καθώς και τρεις ημέρες πριν τον ενοφθαλμισμό τους με τον ιό (-3 ημέρα), συλλέχθηκαν δείγματα αίματος (ορός και πλάσμα), ρινικά βύσματα και βύσματα κοπράνων από κάθε χοιρίδιο. Αντισώματα έναντι του κυκλοϊού 2, καθώς και DNA του κυκλοϊού 1 και του κυκλοϊού 2 δεν ανιχνεύθηκαν στα δείγματα.

Τα χοιρίδια χωρίστηκαν με τυχαίο τρόπο σε έξι πειραματικές ομάδες (ομάδες I-VI) οι οποίες στεγάστηκαν σε ξεχωριστά κελιά στον ίδιο θάλαμο. Οι ομάδες I έως IV αποτελούνταν από τέσσερα χοιρίδια, ενώ οι ομάδες V και VI από δύο χοιρίδια. Την ημέρα που πραγματοποιήθηκε η μόλυνση (0 ημέρα), τα χοιρίδια των ομάδων I και II ενοφθαλμίστηκαν με τη χορήγηση 2 ml εναιωρήματος του ιού  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml από τη στοματο-ρινική οδό, ενώ εκείνα των ομάδων III και IV έλαβαν 2 ml εναιωρήματος ιστών  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml με τον ίδιο τρόπο χορήγησης. Στα χοιρίδια των ομάδων V και VI χορηγήθηκαν 2 ml θρεπτικού υποστρώματος (Minimum Essential Medium, MEM) κατά τον ίδιο τρόπο.

Το σιτηρέσιο που χρησιμοποιήθηκε για τη διατροφή των χοιριδίων ήταν το ίδιο με εκείνο που χορηγούνταν στην εκτροφή από την οποία προήρθαν. Στο σιτηρέσιο των ομάδων II, IV και VI προστέθηκε ανοσοενισχυτική ουσία (Alphamune, Alphafarma, 500 gr/ tn), ξεκινώντας τρεις ημέρες πριν τη μόλυνση (-3 ημέρες).

Ο σχεδιασμός της πειραματικής μελέτης αναφέρεται στον Πίνακα 1, Παράρτημα II.

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν επτά ημέρες (-7 ημέρα) και τρεις ημέρες (-3 ημέρα) πριν τον ενοφθαλμισμό των χοιριδίων με τον ιό, την ημέρα που έγινε ο ενοφθαλμισμός των χοιριδίων (0 ημέρα) και τις ημέρες 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 51 και 54 μετά τη μόλυνση.

Στα χοιρίδια, κατά τις ημέρες της δειγματοληψίας, πραγματοποιούνταν μέτρηση του βάρους, συλλογή δειγμάτων αίματος (ορός και πλάσμα), συλλογή ρινικού εκκρίματος, συλλογή κοπράνων και καταγραφή της σύστασης των κοπράνων, η οποία βαθμολογούταν με βάση την παρακάτω κλίμακα: 1 αντιστοιχούσε σε κόπρανα στερεής σύστασης, 2 σε σχηματισμένα κόπρανα μαλακής σύστασης, 3 σε μη σχηματισμένα κόπρανα μαλακής σύστασης, και 4 σε κόπρανα υδαρούς σύστασης.

Τα χοιρίδια παρατηρούνταν σε καθημερινή βάση για να εκτιμηθεί η εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων. Δύο ενοφθαλμισμένα χοιρίδια και ένας μάρτυρας από κάθε ομάδα, θανατώθηκαν την 35<sup>η</sup> ημέρα, ενώ τα υπόλοιπα την 54<sup>η</sup> ημέρα μετά τη μόλυνση.

## **4.2 Υλικά και μέθοδοι**

### **4.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων και τιτλοποίηση του ιού**

#### **4.2.1.1 Κύτταρα και θρεπτικά υλικά**

Η κυτταρική σειρά PK-15 (Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Αθηνών, Εργαστήριο Χοιροπαθολογίας) η οποία ήταν απαλλαγμένη από τον κυκλοϊό 1 και τον κυκλοϊό 2, χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό του κυκλοϊού 2. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υπόστρωμα Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco BRL), στο οποίο προσθέτονταν 100 IU/ml πενικιλίνης, 100 µg/ml στρεπτομυκίνης, 1 % earle's balanced salts και 10% ορός εμβρύου μόσχου.

Το ίδιο υλικό με 2% ορό εμβρύου μόσχου χρησιμοποιήθηκε για τη συντήρηση των αναπτυγμένων κυττάρων. Το παραπάνω υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε και ως υγρό μεταφοράς και κατεργασίας των παθολογικών υλικών, αλλά στην περίπτωση αυτή ενισχύθηκε με 150µg/ml γενταμυκίνης.

#### 4.2.1.2 Καλλιέργεια των κυττάρων

Τα κύτταρα αναπτύσσονταν αρχικά μέσα σε πλαστικές φιάλες των 250 ml (75 cm<sup>2</sup>) (Corning incorporated) στους 37°C και σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 5%. Όταν σχηματιζόταν πλήρες ταπήτιο, συνήθως 3 έως 4 ημέρες μετά τη σπορά, ακολουθούσε η διαδικασία της θρυψίνισης. Αρχικά απορριπτόταν το θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχαν οι πλαστικές φιάλες και ακολουθούσαν δύο πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Στη συνέχεια, προσθέτονταν εμπορικό σκεύασμα θρυψίνης (Trypsin-EDTA, Gibco - Invitrogen) και οι πλαστικές φιάλες επώαζονταν στους 37°C και σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 5% μέχρι να διαπιστωθεί μικροσκοπικά ότι τα κύτταρα είχαν αποκολληθεί από τον πυθμένα της φιάλης. Ακολουθούσε αραίωση με θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης στην επιθυμητή πυκνότητα, διανομή σε άλλες φιάλες των 250 ml ή πλάκες των 24 ή 96 φρεατίων και επώαση στους 37°C και σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 5%.

#### 4.2.1.3 Στέλεχος του κυκλοϊού 2 για την πειραματική μόλυνση των χοιριδίων.

Το στέλεχος του κυκλοϊού 2 με το οποίο έγινε η πειραματική μόλυνση των χοιριδίων απομονώθηκε από χοίρο που εμφάνιζε αλλοιώσεις νεκρωτικής λεμφαδενίτιδας. Η αναλυτική περιγραφή του φυσικού περιστατικού αναφέρεται στην παράγραφο 2.2.1.4.

#### 4.2.1.4 Καλλιέργεια του ιού σε κύτταρα

Ιστοτεμάχια από τα υπογνάθια, βρογχικά, μεσεντέρια και επιπολής βουβωνικά λεμφογάγγλια ομογενοποιήθηκαν σε MEM σε αναλογία 1 gr δείγματος ιστών σε 10 ml MEM. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 3.000 στροφές ανά λεπτό για 20 λεπτά και το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε και εξετάστηκε με την τεχνική της PCR για την παρουσία του κυκλοϊού 1 (Mankertz και συν., 2000), του κυκλοϊού 2 (Mankertz και συν., 2000), του παρβοϊού (Kim και συν., 2003) και του ιού του ΑΑΣΧ (Gilbert και συν., 1997). Το υπερκείμενο υγρό ήταν θετικό για DNA του κυκλοϊού 2 και τιτλοποιήθηκε (10<sup>4.5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml). Ένα μέρος του συντηρήθηκε στους -70°C για να χορηγηθεί ως είχε στα χοιρίδια, ενώ το υπόλοιπο ενοφθαλμίστηκε σε κύτταρα PK-15 τα οποία είχαν καλύψει κατά 70% τον πυθμένα της φιάλης. Ακολούθησαν οχτώ δίοδοι του ιού σε PK-15 και στη συνέχεια, οι μολυσμένες καλλιέργειες κυττάρων της 8<sup>ης</sup> διόδου τοποθετήθηκαν στους -70°C. Το περιεχόμενό τους συλλέχθηκε και υπερφυγοκεντρήθηκε στις 140.000 στροφές

ανά λεπτό για 4 ώρες. Το pellet του ιού που συλλέχθηκε, ομογενοποιήθηκε σε MEM, τιτλοποιήθηκε σε  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml και συντηρήθηκε στους -70°C.

#### **4.2.1.5 Τιτλοποίηση του ιού με την τεχνική της ανοσοπεροξειδάσης**

Η τιτλοποίηση του στελέχους του κυκλοϊού 2, που χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική μόλυνση των χοιριδίων, έγινε με την τεχνική της ανοσοπεροξειδάσης (IPMA), όπως είχε περιγραφεί από τους Ellis και συν. (1998). Χρησιμοποιήθηκε ένα μίγμα τριών μονοκλωνικών αντισωμάτων (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia E Dell'Emilia Romagna), τα οποία αναγνώριζαν διαφορετικούς επίτοπους στο ΑΑΠ2 του κυκλοϊού 2 και δεν έδιναν διασταυρούμενη αντίδραση με τον κυκλοϊό1.

#### **4.2.2 Παθολογικά υλικά**

Τα δείγματα αίματος λαμβάνονταν από τη σφαγίτιδα φλέβα των χοίρων χρησιμοποιώντας βελόνες μιας χρήσης (21G × 1 ½) που ήταν προσαρμοσμένες σε υποδοχέα φιαλιδίων κενού (venoject). Τα δείγματα φυγοκεντρούνταν στις 2500 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά για τη συλλογή του ορού. Στη συνέχεια, οι οροί μοιράζονταν σε πλαστικά φιαλίδια ανά 1 ml και διατηρούνταν στους -70°C για τη δοκιμή της ELISA. Φιαλίδια που περιείχαν EDTA για αντιπηκτικό χρησιμοποιούνταν για τη συλλογή πλάσματος και τα δείγματα διατηρούνταν στους -70°C για τη δοκιμή της PCR.

Το ρινικό έκκριμα και τα κόπρανα συλλέγονταν με τη βοήθεια βαμβακοφόρων στυλεών τα οποία τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα φιαλίδια που περιείχαν 2,5 ml υγρού μεταφοράς (MEM) με 150μg/ml γενταμυκίνη. Στο εργαστήριο, μετά την απομάκρυνση του βύσματος, τα φιαλίδια διατηρούνταν στους -70°C μέχρι να εξεταστούν με τη δοκιμή της PCR.

Δείγματα ιστών από τα υπογνάθια, βρογχικά, μεσεντέρια και επιπολής βουβωνικά λεμφογάγγλια, τους σιελογόνους αδένες, το σπλήνα, τις αμυγδαλές, το θύμο, την καρδιακή μοίρα του στομάχου, τον πυλωρό, τη νήστιδα, τον ειλεό, την καρδιά, τους πνεύμονες, το ήπαρ, το πάγκρεας, τους νεφρούς, τα επινεφρίδια, το μυελό των οστών, το δέρμα και τους μύες συλλέχθηκαν από τα πειραματόζωα, όσο το δυνατόν άσηπτα σε αποστειρωμένα φιαλίδια, τα οποία συντηρούνταν στους -70°C για να εξεταστούν με τη δοκιμή της PCR.

Για την ιστοπαθολογική εξέταση, ιστοτεμάχια από τα υπογνάθια, τα βρογχικά, τα μεσεντέρια και τα επιπολής βουβωνικά λεμφογάγγλια, καθώς και από τη νήστιδα και τον

ειλεό συλλέχθηκαν από τα χοιρίδια και τοποθετούνταν σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10%.

### **4.2.3 Τεχνικές για την εξέταση των παθολογικών υλικών**

#### **4.2.3.1 Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA**

Στα πειραματόζωα, η ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι του ιού γινόταν με τη χρήση ενός εμπορικού kit ELISA (Ingenzim circovirus IgM/IgG) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Με το συγκεκριμένο kit γινόταν διάκριση των ανοσοσφαιρινών M (IgM) από τις ανοσοσφαιρίνες G (IgG).

#### **4.2.3.2 Απομόνωση DNA από παθολογικά υλικά**

Η απομόνωση DNA από ιστοτεμάχια διαφόρων οργάνων, ρινικό έκκριμα και κόπρανα γινόταν με τη χρήση εμπορικού kit (cell and tissue isolation kit, Puregene, Gentra Systems, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Διαφορετικό εμπορικό kit (blood isolation kit, Puregene, Gentra Systems) χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση DNA από το πλάσμα.

#### **4.2.3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης**

Τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 1 και του κυκλοϊού 2 είναι τα F41/B42, CV1/CV2, CV3/CV4 και F68/B69 (Fenaux και συν., 2000, Mankertz και συν., 2000). Η ακολουθία των νουκλεοτιδίων των εκκινητών έχει ήδη περιγραφεί στην παράγραφο 2.1.2. Η περιγραφή της τεχνική της PCR και της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της σε πηκτή αγαρόζης έχουν αναφερθεί στις παραγράφους 2.1.2 και 2.1.3.

#### **4.2.3.4 Παθολογοανατομικές εξετάσεις**

Τα πειραματόζωα θανατώθηκαν και νεκροτομήθηκαν σε κατάλληλα διαμορφωμένο χώρο του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε Καρδίτσας. Κατά τη διάρκεια της νεκροτομής εκτιμήθηκαν οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις στα όργανα των πειραματόζωων.

#### 4.2.3.4.1 Ιστοπαθολογικές εξετάσεις

Τα ιστοτεμάχια που προορίζονταν για εξέταση με το φωτονικό μικροσκόπιο, τοποθετούνταν για μονιμοποίηση σε διάλυμα φορμόλης 10% σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου ( pH 7), για 48-72 ώρες. Μετά την έγκλιση τους σε παραφίνη, λαμβάνονταν τομές πάχους 4-6 μm, οι οποίες χρωματίζονταν με τη μέθοδο της αιματοξυλίνης – εωσίνης για τη μελέτη της γενικής ιστολογικής εικόνας. Η κατεργασία των δειγμάτων, καθώς και η εξέταση τους με το φωτονικό μικροσκόπιο έγινε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ).

Η εκτίμηση της έντασης των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων έγινε με βάση μια υποκειμενική κλίμακα διαβάθμισης των αλλοιώσεων αυτών, η οποία δημιουργήθηκε ειδικά για να εξυπηρετήσει το σκοπό αυτό (0: απουσία αλλοιώσεων, 1: ολιγάριθμες, 2: ελαφρού βαθμού, 3: μετρίου βαθμού και 4: εντόνου βαθμού αλλοιώσεις).

#### 4.2.3.4.2 Ανοσοϊστοχημική εξέταση

Η σήμανση του αντιγόνου του κυκλοϊού 2 του χοίρου επιτεύχθηκε με ανοσοϊστοχημική μέθοδο με τη ταυτόχρονη χρήση τριών διαφορετικών μονοκλωνικών αντισωμάτων που περιέχονταν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα ήταν ειδικό για διαφορετικό επίτοπο της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το ΑΑΠ2 του κυκλοϊού 2 και δεν εμφάνιζε διασταυρούμενη αντίδραση με πρωτεΐνες του κυκλοϊού 1.

Τομές από ιστούς των χοιριδίων που είχαν μονιμοποιηθεί σε ουδέτερη φορμόλη, αποπαραφινώθηκαν και ενυδατώθηκαν προοδευτικά. Η αποκάλυψη των επιτόπων των αντιγόνων επιτεύχθηκε μετά από ενζυμική πέψη με πρωτεάση (Protease, Cell Marque, Rocklin, CA, USA). Η ενδογενής υπεροξειδάση εξουδετερώθηκε με PeroxFree Block (Cell Marque, Rocklin, CA, USA). Οι τομές επώαστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε τα 3 διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα που προαναφέρθηκαν (διάλυση 1:100). Ως «δεύτερο αντίσωμα» χρησιμοποιήθηκε αντιορός αίγας κατά της ανοσοσφαιρίνης G μύς. Σε καθένα από τα αντισώματα που περιέχονταν στον αντιορό ήταν συνδεδεμένο ένα πολυμερές μόριο που έφερε πολυάριθμα μόρια υπεροξειδάσης (Poly-HRP goat anti-mouse IgG; Chemikon, Temecula, CA, USA). Ως χρωμογόνο χρησιμοποιήθηκε η διαμινοβενζιδίνη (DAB) και για αντίχρωση των ιστολογικών τομών η αιματοξυλίνη. Ως αρνητικοί μάρτυρες της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τομές από

ιστούς των πειραματόζωων που επώαστηκαν με μονοκλωνικά αντισώματα μύος μη ειδικά για τον κυκλοϊό 2.

Η παρουσία των κυττάρων που έφεραν το αντιγόνο του ιού, βαθμονομήθηκε στις ιστοπαθολογικές τομές που σημάνθηκαν με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο ως ακολούθως: ο βαθμός 0 καταγράφονταν όταν δεν εντοπιζόταν κανένα σεσημασμένο κύτταρο σε ολόκληρη την ιστολογική τομή, οι βαθμοί 1, 2, 3 και 4 αντιστοιχούσαν όταν ανευρίσκονταν 1 έως 5, 5 έως 10, 10 έως 15 και άνω των 15, αντίστοιχα, θετικά σεσημασμένα κύτταρα σε κάθε τριάντα πεδία (στη μεγέθυνση με τη χρήση του αντικειμενικού φακού X40) στην ιστολογική τομή.

Η ανοσοϊστοχημική εξέταση έγινε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ).

#### **4.2.4 Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για κάθε μέρα δειγματοληψίας έγινε σε τρία στάδια: (α) συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα μεταξύ των ομάδων που μολύνθηκαν με διαφορετική δόση ιού, λαμβάνοντας υπόψη το είδος του σιτηρεσίου (ομάδα I με II και ομάδα III με IV), (β) συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα μεταξύ των ομάδων που πήραν χαμηλή ή υψηλή δόση του ιού, ανεξάρτητα από το είδος του σιτηρεσίου (ομάδες I+II με III+IV) και (γ) συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα μεταξύ των μολυσμένων ομάδων που διατράφηκαν με σιτηρέσιο το οποίο είχε ή δεν είχε προστεθεί ανοσοενισχυτικό στο σιτηρέσιό τους, ανεξάρτητα από τη δόση του ιού (ομάδες I+III με II+IV).

Μελετήθηκε η επίδραση και η αλληλεπίδραση της χορήγησης του ιού και της ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο στις επόμενες μετρήσεις: (α) αύξηση του βάρους, (β) σύσταση κοπράνων, (γ) ανοσοσφαιρίνες M και G, (δ) DNA του ιού στις ρινικές εκκρίσεις, (ε) DNA του ιού στα κόπρανα, (στ) DNA του ιού στο πλάσμα του αίματος, (ζ) DNA του ιού στα όργανα, (η) ένταση ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων και (θ) ένταση του αντιγόνου του ιού.

Η μη παραμετρική στατιστική δοκιμή Kruskal-Wallis χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση της συνολικής αύξησης του βάρους των χοίρων μεταξύ των ομάδων, καθώς και για τη σύγκριση της σύστασης των κοπράνων μεταξύ των ομάδων. Η στατιστική δοκιμή Fisher's exact χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση του ποσοστού ανίχνευσης του DNA του ιού στο αίμα, τις ρινικές εκκρίσεις και τα κόπρανα των χοίρων μεταξύ των ομάδων. Επίσης, με τη στατιστική δοκιμή Fisher's exact έγινε η σύγκριση του ποσοστού των χοίρων που ήταν θετικοί στη δοκιμή της ELISA και η σύγκριση του ποσοστού

απομόνωσης του DNA του ιού σε διάφορα όργανα με την τεχνική της PCR. Η στατιστική δοκιμή Jonckheere–Terpstra χρησιμοποιήθηκε για να διερευνηθεί αν υπήρχε διαφορά στην τάση προοδευτικής αύξησης ή μείωσης τόσο της έντασης των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων, όσο και του βαθμού ανίχνευσης του αντιγόνου του ιού μεταξύ των ομάδων. Στις περιπτώσεις που διαπιστώθηκε τάση χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική στατιστική δοκιμή Kruskal-Wallis.

### **4.3 Αποτελέσματα**

#### **4.3.1 Κλινικά συμπτώματα**

Σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης εκτός από διάρροια, δεν παρατηρήθηκαν άλλα κλινικά συμπτώματα στα χοιρίδια.

#### **4.3.2 Μέτρηση του βάρους**

Το βάρος των μολυσμένων χοιριδίων και των μαρτύρων αυξανόταν με την πάροδο του χρόνου με εξαίρεση ένα χοιρίδιο της ομάδας III που το βάρος του ελαττώθηκε (353). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην αύξηση του βάρους μεταξύ των μολυσμένων ομάδων και των μαρτύρων.

#### **4.3.3 Σύσταση κοπράνων**

Όλα τα χοιρίδια πριν και κατά την ημέρα της πειραματικής μόλυνσης είχαν φυσιολογική σύσταση κοπράνων. Τα πειραματόζωα της ομάδας III που μολύνθηκαν με την υψηλή δόση του ιού, εμφάνισαν νωρίτερα κόπρανα υδαρούς σύστασης (4<sup>η</sup> ημέρα μετά τη μόλυνση). Μετά την 35<sup>η</sup> ημέρα η πλειοψηφία των μολυσμένων χοιριδίων εμφάνισε σχηματισμένα κόπρανα μαλακής σύστασης. Οι μάρτυρες κατά τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης είχαν κόπρανα στερεής σύστασης ή σχηματισμένα κόπρανα μαλακής σύστασης (Πίνακας 2, Παράρτημα II).

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη σύσταση των κοπράνων μεταξύ των μολυσμένων ομάδων.

#### **4.3.4 Ανίχνευση αντισωμάτων του κυκλοϊού 2 με ELISA**

Σε όλα τα πειραματόζωα τόσο πριν, όσο και κατά την ημέρα της πειραματικής μόλυνσης δεν ανιχνεύθηκαν αντισώματα έναντι του κυκλοϊού 2. Αντίθετα, μετά τη μόλυνση, αντισώματα έναντι του ιού ανιχνεύθηκαν στα μολυσμένα χοιρίδια για μεγάλο χρονικό διάστημα (Πίνακας 3, Παράρτημα II).

Οι ανοσοσφαιρίνες M (IgM) ανιχνεύθηκαν πριν τις ανοσοσφαιρίνες G (IgG). Η περίοδος ανίχνευσης των IgM ήταν μικρότερη στα μολυσμένα χοιρίδια που έλαβαν ανοσοενισχυτική ουσία με το σιτηρέσιο, ανεξάρτητα από τη δόση του ιού (ομάδες II και IV). Συγκεκριμένα, τα IgM ανιχνεύθηκαν 14 έως 51 ημέρες μετά τη μόλυνση στα χοιρίδια της ομάδας I, 14 έως 35 ημέρες μετά τη μόλυνση στα χοιρίδια της ομάδας II, 14 έως 42 ημέρες μετά τη μόλυνση στα χοιρίδια της ομάδας III και 14 έως 35 ημέρες μετά τη μόλυνση στα χοιρίδια της ομάδας IV.

Τα IgG ανιχνεύθηκαν την 21<sup>η</sup> ημέρα μετά τη μόλυνση και όλα τα χοιρίδια πλην ενός, ήταν οροθετικά μέχρι τον τερματισμό της πειραματικής μελέτης.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό των χοιριδίων που ήταν θετικοί στη δοκιμή ELISA μεταξύ των μολυσμένων ομάδων.

#### **4.3.5 Ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 2 στο πλάσμα του αίματος**

Σε όλα τα πειραματόζωα πριν, αλλά και κατά την ημέρα της πειραματικής μόλυνσης δεν ανιχνεύθηκε DNA του κυκλοϊού 2 στο πλάσμα του αίματος. Αντίθετα μετά τη μόλυνση, DNA του ιού ανιχνεύθηκε στα μολυσμένα χοιρίδια για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η διάρκεια της ανίχνευσης DNA του ιού στο πλάσμα του αίματος ήταν μικρότερη στα χοιρίδια που μολύνθηκαν με χαμηλή δόση του ιού και δεν έλαβαν ανοσοενισχυτική ουσία με το σιτηρέσιό (ομάδα I). Συγκεκριμένα, DNA του ιού ανιχνεύθηκε 14 έως 42 ημέρες μετά τη μόλυνση στα χοιρίδια της ομάδας I και 4 έως 54 ημέρες μετά τη μόλυνση στα χοιρίδια των ομάδων II, III και IV (Πίνακας 4, Παράρτημα II).

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανίχνευση DNA του ιού μεταξύ των μολυσμένων ομάδων.

#### **4.3.6 Ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 2 στο ρινικό έκκριμα**

Σε όλα τα πειραματόζωα πριν, αλλά και κατά την ημέρα της πειραματικής μόλυνσης δεν ανιχνεύθηκε DNA του κυκλοϊού 2 στο ρινικό έκκριμα. Αντίθετα μετά τη μόλυνση, DNA του ιού ανιχνεύθηκε στα μολυσμένα χοιρίδια για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η ανίχνευση DNA του ιού στο ρινικό έκκριμα καθυστέρησε χρονικά (7<sup>η</sup> ημέρα) στα χοιρίδια που μολύνθηκαν με την υψηλή δόση του ιού και λάμβαναν ανοσοενισχυτική ουσία με το σιτηρέσιο (ομάδα IV). Επίσης, η διάρκεια ανίχνευσης

DNA του ιού ήταν μεγαλύτερη στα χοιρίδια που μολύνθηκαν με τη χαμηλή δόση του ιού και λάμβαναν ανοσοενισχυτική ουσία με το σιτηρέσιο (ομάδα II).

Συγκεκριμένα, DNA του ιού ανιχνεύθηκε στο ρινικό έκκριμα των χοιριδίων της ομάδας I 4 έως 21 ημέρες μετά τη μόλυνση, της ομάδας II 4 έως 42 ημέρες μετά τη μόλυνση, της ομάδας III 4 έως 35 ημέρες μετά τη μόλυνση και της ομάδας IV 7 έως 35 ημέρες μετά τη μόλυνση. Η ανίχνευση DNA του ιού ήταν διαλείπουσα σε ορισμένους χοίρους και συνεχής σε άλλους (Πίνακας 5, Παράρτημα II).

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανίχνευση DNA του ιού μεταξύ των μολυσμένων ομάδων.

#### **4.3.7 Ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 2 στα κόπρανα**

Στα πειραματόζωα, DNA του κυκλοϊού 2 δεν ανιχνεύθηκε στα κόπρανα πριν, αλλά και κατά την ημέρα της πειραματικής μόλυνσης. Αντίθετα μετά τη μόλυνση, DNA του ιού ανιχνεύθηκε στα κόπρανα των μολυσμένων χοιριδίων για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η ανίχνευση DNA του ιού άρχισε νωρίτερα (4<sup>η</sup> ημέρα) στα χοιρίδια που μολύνθηκαν με την υψηλή δόση του ιού, ανεξάρτητα από τη χορήγηση ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο (ομάδες III και IV). Επίσης, η διάρκεια ανίχνευσης DNA του ιού ήταν μικρότερη στα χοιρίδια που μολύνθηκαν με την υψηλή δόση του ιού και λάμβαναν ανοσοενισχυτική ουσία με το σιτηρέσιο (ομάδα IV).

Συγκεκριμένα, DNA του ιού ανιχνεύθηκε στα κόπρανα των χοιριδίων της ομάδας I 14 έως 54 ημέρες μετά τη μόλυνση, της ομάδας II 7 έως 54 ημέρες μετά τη μόλυνση, της ομάδας III 4 έως 54 ημέρες μετά τη μόλυνση και της ομάδας IV 4 έως 28 ημέρες μετά τη μόλυνση (Πίνακας 6, Παράρτημα II).

Η στατιστική ανάλυση μεταξύ των μολυσμένων ομάδων που δεν λάμβαναν ανοσοενισχυτική ουσία με το σιτηρέσιο, έδειξε ότι την 7<sup>η</sup> ημέρα η ανίχνευση DNA του ιού στα κόπρανα ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα που μολύνθηκε με την υψηλή δόση του ιού ( $p=0.02$ ). Καμία άλλη ημέρα δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μολυσμένων ομάδων.

#### **4.3.8 Ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 2 στα όργανα**

Σε όλα τα μολυσμένα χοιρίδια, DNA του ιού ανιχνεύθηκε στους σιελογόνους αδένες, την καρδιά και τους μύες. Επίσης, DNA του ιού ανιχνεύθηκε σε δεκαπέντε

χοιρίδια στην πυλωρική μοίρα του στομάχου, σε δεκατέσσερα στους πνεύμονες, σε δεκατρία στο δέρμα, σε έντεκα στο θύμο και τα βουβονικά λεμφογάγγλια, σε εννέα στο ήπαρ, τους νεφρούς και τα βρογχικά λεμφογάγγλια, σε οχτώ στα μεσεντέρια λεμφογάγγλια, σε εφτά στο μυελό των οστών, τα επινεφρίδια και την καρδιακή μοίρα του στομάχου, σε έξι στο πάγκρεας, σε τέσσερα στα υπογνάθια λεμφογάγγλια, σε τρία στο σπλήνα, σε δύο στον ειλέο και σε ένα στις αμυγδαλές και τη νήστιδα (Πίνακας 7, Παράρτημα II).

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι DNA του ιού ανιχνεύθηκε σε περισσότερα όργανα στα μολυσμένα χοιρίδια που θανατώθηκαν την 35<sup>η</sup> ημέρα. Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι DNA του ιού ανιχνεύθηκε με μεγαλύτερη συχνότητα στα βουβονικά λεμφογάγγλια των μολυσμένων χοιριδίων που λάμβαναν ανοσοενισχυτική ουσία με το σιτηρέσιο ανεξάρτητα από τη δόση του ιού ( $p=0.03$ ) (ομάδες II και IV).

Στους μάρτυρες, δεν ανιχνεύθηκε DNA του κυκλοϊού 2 στα όργανα.

#### **4.3.9 Μακροσκοπικές αλλοιώσεις**

Εντερίτιδα, η οποία εντοπίστηκε στη νήστιδα και τον ειλέο και διόγκωση των λεμφογαγγλίων παρατηρήθηκαν σε όλα τα μολυσμένα χοιρίδια ανεξάρτητα από την ομάδα στην οποία ανήκαν. Στην πλειοψηφία των μολυσμένων χοίρων διαπιστώθηκαν γαστρίτιδα, διόγκωση των πλακών του Peyer και παρουσία αυξημένου περικαρδιακού υγρού (Πίνακας 8, Παράρτημα II). Στους μάρτυρες δεν παρατηρήθηκαν μακροσκοπικές αλλοιώσεις.

#### **4.3.10 Ιστοπαθολογικά ευρήματα**

Οι ιστοί από τα χοιρίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες του πειραματισμού δεν εμφάνιζαν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. Αντίθετα, η νήστιδα κι ο ειλέος των χοιριδίων που μολύνθηκαν με τον ιό, έφεραν πολυεστιακά αλλοιώσεις νεκρωτικής εντερίτιδας κυμαινόμενου βαθμού έντασης (Πίνακας 9, Παράρτημα II). Παρατηρήθηκε πηκτική νέκρωση του άνω τμήματος του εντερικού βλεννογόνου η οποία επεκτεινόταν, κατά περίπτωση, σε διαφορετικό βάθος στο βλεννογόνο. Η νέκρωση του άνω μισού του βλεννογόνου πάντως ήταν η πλέον συνήθης εμφάνιση. Κατά εστίες, βέβαια, παρατηρήθηκε και νέκρωση που καταλάμβανε ολόκληρο το πάχος του βλεννογόνου. Στην ηπιότερη μορφή της, η νέκρωση εντοπιζόταν στο επιθήλιο της επιφάνειας, όπου η αποφολίδωση επιθηλιακών κυττάρων οδηγούσε στο σχηματισμό διαβρώσεων ή

σπανιότερα ελκών. Η καταστροφή των λαχνών συνοδευόταν σταθερά από αύξηση του ύψους των κρυπτών. Οι κρύπτες συχνά διχάζονταν δημιουργώντας διακλαδώσεις. Το επιθήλιο των κρυπτών ήταν υπερπλαστικό κι εμφάνιζε ψευδοστιβάδωση. Στο χόριο του βλεννογόνου συναθροίζονταν σε μεγάλους αριθμούς φλεγμονικά κύτταρα. Από αυτά τα περισσότερα ήταν λεμφοκύτταρα, πλασμοκύτταρα και μακροφάγα. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν με ιδιαίτερα μεγάλη συχνότητα κι ορισμένα φλεγμονικά κύτταρα με ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Τα προαναφερθέντα κύτταρα ήταν σχετικά ευμεγέθη, είχαν στρογγυλό πυρήνα και άφθονα, ευμεγέθη, εωσινόφιλα κυταροπλασματικά κοκκία. Τα κοκκία αυτά δε χρωματίστηκαν με την ειδική χρώση του κυανού της τολουιδίνης, η οποία χρωματίζει τα κοκκία των σιτευτικών και των βασεόφιλων κυττάρων. Επομένως, αποδείχτηκε, με βάση τη χαρακτηριστική μορφολογία τους και τις ιδιότητες των κοκκίων τους σε σχέση με την καθήλωση των χρωστικών, ότι τα κύτταρα αυτά είναι σφαιριδιολευκοκύτταρα. Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι η παρουσία ενδοεπιθηλιακών λεμφοκυττάρων ήταν ιδιαίτερα συχνή. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι δεν ανευρέθηκαν μακροφάγα και γιγαντοκύτταρα με τα χαρακτηριστικά ευμεγέθη έγκλειστα του ιού στο κυτταρόπλασμά τους (Εικόνα 16, Παράρτημα I).

Κατά κανόνα, ο λεμφικός ιστός στις πλάκες του Peyer δεν εμφάνιζε αλλοιώσεις. Όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις εντοπίστηκαν μικρές εστίες νέκρωσης με αραίωση των λεμφοκυττάρων και παρουσία γιγαντοκυττάρων και μακροφάγων (Εικόνα 16, Παράρτημα I). Τα τελευταία έφεραν στο κυτταρόπλασμά τους ράκη πυρήνων, τα οποία προφανώς φαγοκυτταρώθηκαν, μετά το θάνατο λεμφοκυττάρων στην περιοχή. Η στατιστική ανάλυση της βαθμονόμησης των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων αποκάλυψε ότι ούτε η μολύνουσα δόση, ούτε η χορήγηση ανοσοενισχυτικού με το σιτηρέσιο, είχαν στατιστικά σημαντική επίδραση στην ένταση της νέκρωσης του βλεννογόνου της νήστιδας και του ειλεού και στην ένταση της φλεγμονής στη νήστιδα. Ωστόσο, αποδείχτηκε ότι η ένταση της φλεγμονής στον ειλέο ήταν μεγαλύτερη στις ομάδες που μολύνθηκαν με υψηλή δόση του ιού (ομάδες III και IV), ανεξάρτητα από τη χορήγηση του ανοσοενισχυτικού ( $p=0.01$ ).

Σε μικρό αριθμό περιπτώσεων, τα λεμφογάγγλια των χοιριδίων που μολύνθηκαν έφεραν αλλοιώσεις εστιακής νέκρωσης με ταυτόχρονη παρουσία κοκκιωματώδους φλεγμονής και αραίωση των λεμφοκυττάρων στα βλαστικά κέντρα των λεμφοζιδίων (Εικόνα 16, Παράρτημα I, Πίνακας 9, Παράρτημα II). Στις περιπτώσεις αυτές, η παρουσία μακροφάγων, γιγαντοκυττάρων, αλλά και ουδετερόφιλων στις περιοχές της

νέκρωσης ήταν χαρακτηριστική. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η ένταση των ιστολογικών αλλοιώσεων στα βουβωνικά λεμφογάγγλια ήταν μεγαλύτερη στις μολυσμένες ομάδες που έλαβαν ανοσοενισχυτικό (ομάδες II και IV) ανεξάρτητα από τη δόση του ιού ( $p=0.01$ ). Καμία άλλη στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε.

#### **4.3.11 Σήμανση των αντιγόνων του κυκλοϊού 2 με ανοσοϊστοχημική μέθοδο**

Στο βλεννογόνο της νήστιδας και του ειλεού τα αντιγόνα του κυκλοϊού 2 εντοπίστηκαν κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και σπανιότερα σε διάσπαρτα μακροφάγα (Πίνακας 10, Παράρτημα II). Σε λίγες μόνο περιπτώσεις η παρουσία του ιού εντοπίστηκε σε ινοβλάστες στο χόριο του βλεννογόνου. Στις πλάκες του Peyer και στα λεμφογάγγλια τα αντιγόνα του ιού εντοπίστηκαν κυρίως στα λεμφοκύτταρα. Ωστόσο, σπανιότερα, ανευρέθηκαν και σε κύτταρα των οποίων η μορφολογία ήταν συμβατή με μακροφάγα ή, πιθανά, με δικτυωτά (αστεροειδή) κύτταρα ή δενδριτικά κύτταρα. Στη συντριπτική πλειοψηφία τα αντιγόνα του ιού εντοπίζονταν στον πυρήνα των κυττάρων. Ένα πολύ μικρό ποσοστό μακροφάγων στον εντερικό βλεννογόνο και στα λεμφογάγγλια εμφάνιζε θετικό σήμα για την παρουσία αντιγόνων του ιού στο κυτταρόπλασμα (Πίνακας 10, Παράρτημα II). Η ένταση του σήματος της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου στους πυρήνες των κυττάρων κυμαινόταν. Οι λιγιστές εναποθέσεις αντιγόνου του ιού χρωματιζόταν αχνά με κατανομή λεπτοκοκκώδη ή νηματιοειδή. Η παρουσία μεγάλης ποσότητας αντιγόνων του ιού εμφανιζόταν ως ομοιογενής έντονος χρωματισμός ολόκληρου του πυρήνα (Εικόνα 17, Παράρτημα I).

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι ο βαθμός ανίχνευσης του αντιγόνου του ιού ήταν εντονότερος: α) στα υπογνάθια λεμφογάγγλια των χοιριδίων που μολύνθηκαν με χαμηλή δόση του ιού (ομάδες I και II), ανεξάρτητα από τη χορήγηση του ανοσοενισχυτικής ουσίας ( $p=0.01$ ) και β) στα μεσεντέρια και στα βουβωνικά λεμφογάγγλια των μολυσμένων χοιριδίων που έλαβαν ανοσοενισχυτική ουσία (ομάδες II και IV) ανεξάρτητα από τη δόση του ιού ( $p=0.03$ ,  $p=0.04$ ). Δε διαπιστώθηκε άλλη στατιστικά σημαντική διαφορά.

#### **4.4 Συζήτηση**

Στόχος της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη της παθογόνου δράσης ενός Ελληνικού στελέχους του κυκλοϊού 2 του χοίρου, το οποίο απομονώθηκε από ένα χοίρο που εμφάνιζε διάρροια και είχε νεκρωτικές αλλοιώσεις στα υπογνάθια, βρογχικά, μεσεντέρια και επιπολής βουβωνικά λεμφογάγγλια. Για το σκοπό αυτό, χοιρίδια που

προήρθαν από συμβατική εκτροφή και δεν είχαν αντισώματα έναντι του κυκλοϊού 2, ενοφθαλμίστηκαν με το στέλεχος από τη στοματορρινική οδό, για την προσομοίωση του φυσικού τρόπου μόλυνσης. Στη συνέχεια δείγματα αίματος συλλέχθηκαν για τον προσδιορισμό των αντισωμάτων και διερευνήθηκε το χρονικό διάστημα της ανίχνευσης DNA του ιού στο πλάσμα του αίματος, τα κόπρανα και το ρινικό έκκριμα, στοιχεία σημαντικά για τη διασπορά του ιού στο περιβάλλον. Διερευνήθηκαν η κατανομή του DNA και του αντιγόνου του ιού σε διάφορα όργανα και οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που προκλήθηκαν από το συγκεκριμένο στέλεχος. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε η επίδραση που είχαν η δόση του ιού (χαμηλή ή υψηλή) και η χορήγηση ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο στους παραπάνω παράγοντες.

Τα χοιρίδια μολύνθηκαν με χαμηλή ή υψηλή δόση του ιού. Ο τίτλος του ιού που προήρθε από την καλλιέργεια κυττάρων ήταν  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml και αντιστοιχούσε στη χαμηλή δόση (ομάδες I και II), ενώ εναιώρημα ιστών με τίτλο  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml χρησιμοποιήθηκε ως υψηλή δόση (ομάδες III και IV). Το εναιώρημα ιστών χρησιμοποιήθηκε, λόγω της δυσκολίας του ιού να πολλαπλασιαστεί με υψηλό τίτλο σε καλλιέργειες κυττάρων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο ιός δε διαθέτει δική του πολυμεράση, με αποτέλεσμα ο πολλαπλασιασμός του στα κύτταρα να εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα που υπάρχει σε κυτταρικά ένζυμα (πολυμεράσες), τα οποία βρίσκονται στον πυρήνα και εκφράζονται κατά την S φάση της μίτωσης (Tischer και συν., 1987). Ο ιός εισέρχεται στον πυρήνα του θυγατρικού κυττάρου στο τέλος της μίτωσης, με συνέπεια να μολύνονται λίγα κύτταρα (Tischer και συν., 1987). Η D-γλυκοζαμίνη χρησιμοποιείται κατά τον ενοφθαλμισμό του ιού σε καλλιέργειες κυττάρων, γιατί αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων που μολύνονται από τον ιό (Tischer και συν., 1987). Είναι όμως γνωστό από τους Tischer και συν. (1987) ότι η παραπάνω ουσία έχει και τοξικό αποτέλεσμα στα κύτταρα, όπως παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη.

Οι Krakowka και συν. (2001) και Ladekjaer-Mikkelsen και συν. (2002) μελέτησαν την επίδραση που είχε η ενέσιμη χορήγηση ανοσοενισχυτικής ουσίας σε χοιρίδια που μολύνθηκαν με κυκλοϊό 2. Στην παρούσα μελέτη, ανοσοενισχυτική ουσία που περιείχε β-γλυκάνες και μαννάνες, χορηγήθηκε με το σιτηρέσιο στα μολυσμένα χοιρίδια των ομάδων II και IV και στους μάρτυρες της ομάδας VI. Η συγκεκριμένη ανοσοενισχυτική ουσία επιλέχθηκε, διότι οι β-γλυκάνες έχουν αντιμικροβιακή δράση (Hetland και συν., 2000) και επιδρούν ευεργετικά στην ανάπτυξη των χοιριδίων κατά τη γαλουχία (Mowat, 1987, Stokes και συν., 1987), γιατί διεγείρουν την ειδική ανοσία και αυξάνουν τη μη ειδική ανοσία έναντι αντιγόνων που εισέρχονται στον οργανισμό μέσω

της κατάποσης. Οι ολιγοσακχαρίτες μαννανών δεσμεύονται στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων και τα εμποδίζουν να προσκολληθούν στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Spring και συν., 2000). Επίσης, ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα των χοίρων προκαλώντας άμεση παραγωγή αντισωμάτων (Newman και Newman, 2001, O'Quinn και συν., 2001). Η προσθήκη μαννανών στο σιτηρέσιο των χοιριδίων κατά τη διάρκεια της γαλουχίας βελτιώνει το ρυθμό ανάπτυξής τους (Davis και συν., 2002, Dvorak και Jacques, 1998).

Στη συγκεκριμένη έρευνα, δε διαπιστώθηκε διαφορά στην αύξηση του σωματικού βάρους ανάμεσα στα μολυσμένα χοιρίδια και τους μάρτυρες, με εξαίρεση ένα πειραματόζωο (353, ομάδα III) στο οποίο παρατηρήθηκε μείωση του βάρους. Τα μολυσμένα χοιρίδια δεν εμφάνισαν καθυστέρηση στην ανάπτυξη, όπως παρατηρείται σε χοίρους με ΠΣΑΑΧ, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στο χαμηλό τίτλο του ιού που χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό, τη μικρή ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων που είχε το στέλεχος του ιού σε σχέση με στελέχη που είναι κατατεθειμένα στην Τράπεζα δεδομένων, τις σωστές και ελεγχόμενες συνθήκες εκτροφής και την απουσία δευτερογενών λοιμώξεων που επιβαρύνουν την κλινική εικόνα του νοσήματος. Η ανοσοενισχυτική ουσία δε βελτίωσε το ρυθμό αύξησης του βάρους των μαρτύρων και των μολυσμένων χοιριδίων, παρόλο που χρησιμοποιείται σε εκτροφές για το συγκεκριμένο σκοπό (Davis και συν., 2002, Dvorak και Jacques, 1998).

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης, οι μάρτυρες είχαν κόπρανα στερεής σύστασης ή σχηματισμένα μαλακής σύστασης, πιθανά λόγω της σύστασης του σιτηρεσίου. Στα μολυσμένα χοιρίδια διαπιστώθηκαν και μη σχηματισμένα κόπρανα μαλακής σύστασης ή / και κόπρανα υδαρούς σύστασης. Τα παραπάνω ευρήματα θα μπορούσαν να αποδοθούν στη δράση του ιού, αφού παρατηρήθηκαν σε μολυσμένα πειραματόζωα τα οποία ενοφθαλμίστηκαν με ιό που απομονώθηκε από χοίρο που εμφάνιζε διάρροια. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη σύσταση των κοπράνων μεταξύ των μολυσμένων ομάδων. Παρόλα αυτά, τα χοιρίδια της ομάδα III που μολύνθηκαν με την υψηλή δόση του ιού και δε λάμβαναν ανοσοενισχυτική ουσία με το σιτηρέσιο, εμφάνισαν κόπρανα υδαρούς σύστασης την 4<sup>η</sup> ημέρα μετά τη μόλυνση. Πιθανά ο ιός μέσω του πεπτικού σωλήνα έφτασε στο έντερο και πολλαπλασιάστηκε με πιο γρήγορο ρυθμό, με αποτέλεσμα να εμφανιστεί νωρίτερα διάρροια. Αντίθετα, η προσθήκη ανοσοενισχυτικής ουσίας στο σιτηρέσιο των χοιριδίων της ομάδας IV που μολύνθηκαν με την υψηλή δόση του ιού φαίνεται ότι προστάτευε τα πειραματόζωα από την εμφάνιση διάρροιας.

Τα μολυσμένα χοιρίδια εμφάνισαν αντισώματα έναντι του κυκλοϊού 2 μεταξύ της 14<sup>ης</sup> και 28<sup>ης</sup> ημέρας και παρέμειναν οροθετικά μέχρι τον τερματισμό της πειραματικής μελέτης. Οι ομάδες I και III, που μολύνθηκαν με χαμηλή ή υψηλή δόση του ιού και δε λάμβαναν ανοσοενισχυτική ουσία με το σιτηρέσιο, εμφάνισαν αντισώματα την ίδια χρονική περίοδο, υποδηλώνοντας ότι η δόση του ιού δεν επηρέασε την ταχύτητα της ανοσολογικής απάντησης. Τα περισσότερα χοιρίδια των ομάδων II και IV, που λάμβαναν ανοσοενισχυτική ουσία έγιναν οροθετικά νωρίτερα. Η ανοσοενισχυτική ουσία προκάλεσε διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος και ταχύτερη ανταπόκριση στην παραγωγή αντισωμάτων. Ειδικότερα, τα χοιρίδια της ομάδας IV έγιναν οροθετικά γρηγορότερα από αυτά των υπόλοιπων ομάδων. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της υψηλής δόσης του ιού και της ανοσοενισχυτικής ουσίας πιθανά ενεργοποίησε νωρίτερα το ανοσοποιητικό σύστημα των χοιριδίων για παραγωγή αντισωμάτων. Παρόλα αυτά, από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανίχνευση των αντισωμάτων μεταξύ των διαφορετικών ομάδων των μολυσμένων χοιριδίων.

Διαπιστώθηκαν διαφορές στο ανοσολογικό προφίλ των μολυσμένων χοιριδίων. Θα περιμέναμε οι IgM να εμφανιστούν μεταξύ της 7<sup>ης</sup> και 10<sup>ης</sup> ημέρας μετά τη μόλυνση και να ανιχνευτούν για 50 έως 60 ημέρες, ενώ οι IgG να εμφανιστούν μεταξύ της 12<sup>ης</sup> και 15<sup>ης</sup> ημέρας και να ανιχνεύονται για χρόνια (Ingenzim circovirus IgM/IgG). Παρόλα αυτά, η ανίχνευση των IgM άρχισε τη 14<sup>η</sup> ημέρα και είχε διάρκεια από μία έως τέσσερις εβδομάδες, ενώ οι IgG ανιχνεύθηκαν μέχρι τον τερματισμό της πειραματικής μελέτης. Επίσης, τέσσερις χοίροι των ομάδων I, II και III έγιναν οροθετικοί ταυτόχρονα για τις IgM και IgG. Στην παρούσα μελέτη οι IgM ανιχνεύθηκαν για μικρό χρονικό διάστημα και σε ορισμένες περιπτώσεις ταυτόχρονα με τις IgG. Οι παρατηρούμενες διαφορές στο ανοσολογικό προφίλ των χοιριδίων θα μπορούσαν να αποδοθούν στο ότι ο ιός που χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική μόλυνση ήταν αντιγονικά διαφορετικός σε σχέση με στελέχη που απομονώθηκαν από φυσικά περιστατικά ΠΣΑΑΧ. Επίσης, τα χοιρίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική μελέτη, προήρθαν από διασταύρωση των φυλών Landrace με Large White και πιθανά να είχαν διαφορετική ανοσολογική απάντηση στη μόλυνση από τον ιό, αφού σύμφωνα με τους Opriessnig και συν. (2006), οι χοίροι της φυλής Landrace εμφανίζουν προδιάθεση στο ΠΣΑΑΧ.

Η ανίχνευση DNA του ιού στο πλάσμα του αίματος προηγήθηκε της έναρξης ανίχνευσης των αντισωμάτων και συνεχίστηκε για όσο διάστημα τα πειραματόζωα ήταν οροθετικά.. Η διάρκεια της ανίχνευσης DNA του ιού ήταν μεγαλύτερη από τρεις

εβδομάδες, γεγονός που συμφωνεί με τους Opriessnig και συν. (2003). Οι διαφορετικές δόσεις του ιού και η χορήγηση της ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο δεν επηρέασαν τη διάρκεια ανίχνευσης DNA του ιού στο πλάσμα.

Στα μολυσμένα χοιρίδια, DNA του ιού ανιχνεύθηκε στις ρινικές εκκρίσεις όπως ανέφεραν οι Sibila και συν. (2004). Το αναμενόμενο αποτέλεσμα θα ήταν η ανίχνευση DNA του ιού στις ρινικές εκκρίσεις να είναι συνεχής και να διαρκεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στα χοιρίδια που ενοφθαλμίστηκαν με την υψηλή δόση. Παρόλα αυτά, η ανίχνευση DNA του ιού ήταν διαλείπουσα στις ομάδες που μολύνθηκαν με την υψηλή δόση. Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι η δόση του ιού δεν επηρέασε τη διάρκεια ανίχνευσης DNA του ιού στις ρινικές εκκρίσεις. Η προσθήκη ανοσοενισχυτικής ουσίας στο σιτηρέσιο δε φάνηκε να επηρεάζει την παρουσία DNA του ιού στις ρινικές εκκρίσεις, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης.

Νουκλεϊκό οξύ του ιού ανιχνεύθηκε στα κόπρανα των μολυσμένων χοιριδίων, όπως ανέφεραν οι Bolin και συν. (2001) και Shibata και συν. (2003). Η ανίχνευση DNA του ιού άρχισε διαφορετικές ημέρες στα μολυσμένα χοιρίδια ανάλογα με την ομάδα και διάρκεσε για τουλάχιστον τρεις εβδομάδες. Το DNA του ιού ανιχνεύθηκε νωρίτερα στα κόπρανα των χοιριδίων που έλαβαν υψηλή δόση του ιού ανεξάρτητα από τη χορήγηση ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο (ομάδες III και IV). Η έναρξη της ανίχνευσης DNA του ιού στα κόπρανα φαίνεται ότι επηρεάστηκε από τη δόση του, πιθανά γιατί ο ιός πολλαπλασιάστηκε με πιο γρήγορο ρυθμό στα χοιρίδια που μολύνθηκαν με την υψηλή δόση, με αποτέλεσμα η απέκκρισή του να αρχίσει νωρίτερα. Επίσης, η ανίχνευση DNA του ιού διάρκεσε μέχρι τον τερματισμό της πειραματικής μελέτης στα πειραματόζωα της ομάδας III, παρόλο που η προσθήκη ανοσοενισχυτικής ουσίας στο σιτηρέσιο της ομάδας IV φαίνεται ότι εμπόδισε την απέκκριση του. Στις ομάδες που μολύνθηκαν με τη χαμηλή δόση του ιού, η προσθήκη ανοσοενισχυτικής ουσίας στο σιτηρέσιο δεν επηρέασε την ανίχνευση DNA του ιού.

Το DNA του ιού ανιχνεύθηκε στους σιελογόνους αδένες, την καρδιά και τους μύες όλων των μολυσμένων χοιριδίων, καθώς και στην πυλωρική μοίρα του στομάχου σε όλα τα μολυσμένα πειραματόζωα πλην ενός. Η παρουσία DNA του ιού στα προαναφερθέντα όργανα αποτέλεσε σταθερό εύρημα και δεν επηρεάστηκε από την ημερομηνία θανάτωσης των πειραματόζωων, τη δόση του ιού και τη χορήγηση ή μη ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο. Τα παραπάνω ευρήματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι σιελογόνοι αδένες, η καρδιά, οι μύες και η πυλωρική μοίρα του

στομάχου πιθανά να αποτελούν όργανα - στόχο για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Η ανίχνευση DNA του ιού στους σιελογόνους αδένες θα μπορούσε να αποδοθεί και στον τρόπο μόλυνσης των χοιριδίων . Η χορήγηση του ιού από τη στοματορρινική οδό πιθανά να οδήγησε στη μεταφορά του ιού στους σιελογόνους αδένες, όπου πολλαπλασιάστηκε και παρέμεινε για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι σιελογόνοι αδένες άλλωστε, αποτελούνται από επιθηλιακά κύτταρα στα οποία έχει διαπιστωθεί ότι πολλαπλασιάζεται ο ιός (Kennedy και συν., 2000). Επίσης, ο ιός είχε τροπισμό στα μυϊκά κύτταρα, αφού DNA του ανιχνεύθηκε στην καρδιά και τους μύες σε όλα τα μολυσμένα πειραματόζωα. Οι Kennedy και συν. (2000) ανίχνευσαν αντιγόνο του ιού στις καρδιακές μυϊκές ίνες και τις λείες μυϊκές ίνες του πεπτικού συστήματος.

Η ανίχνευση DNA του ιού στα λεμφογάγγλια των μολυσμένων χοιριδίων δεν αποτέλεσε σταθερό εύρημα και θα μπορούσε να συσχετιστεί με το μικρό αριθμό πειραματόζωων που εμφάνισαν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στα λεμφογάγγλια. Οι Segales και Domingo (2002) ανέφεραν ότι οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται στο λεμφικό ιστό συνδέονται με την παρουσία DNA ή / και αντιγόνου του ιού σε αυτόν. Ειδικότερα, DNA του ιού ανιχνεύθηκε στα βουβωνικά λεμφογάγγλια των μολυσμένων χοιριδίων που λάμβαναν ανοσοενισχυτική ουσία με το σιτηρέσιο ανεξάρτητα από τη δόση του ιού (ομάδες II και IV), στα οποία διαπιστώθηκαν μεγάλης έντασης ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. Το στέλεχος του ιού που χρησιμοποιήθηκε δεν εντοπίστηκε στα λεμφογάγγλια, όπως συμβαίνει στους χοίρους που νοσούν από ΠΣΑΑΧ.

Στη νήστιδα και τον ειλεό, DNA του ιού ανιχνεύθηκε σε δύο μολυσμένα χοιρίδια, αν και ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις, όπως είναι η νέκρωση και η φλεγμονή, διαπιστώθηκαν σε όλα τα πειραματόζωα. Θα περιμέναμε DNA του ιού να ανιχνευθεί στη νήστιδα και τον ειλεό σε περισσότερα ή και σε όλα τα μολυσμένα χοιρίδια. Τα παραπάνω ευρήματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι DNA του ιού ανιχνεύεται δύσκολα στα όργανα που εμφανίζουν νεκρώσεις, αφού φαίνεται ότι ο ιός συντελεί στη δημιουργία των νεκρώσεων, αλλά δεν παραμένει στα νεκρωμένα κύτταρα γιατί δεν υπάρχουν τα απαραίτητα ένζυμα για τον πολλαπλασιασμό του.

Σε όλα τα μολυσμένα χοιρίδια που θανατώθηκαν την 35<sup>η</sup> ημέρα ανιχνεύθηκε DNA του ιού στο ήπαρ. Επίσης, DNA του ιού ανιχνεύθηκε σε περισσότερα όργανα στα χοιρίδια που θανατώθηκαν την 35<sup>η</sup> ημέρα, ενώ μετά την 35<sup>η</sup> ημέρα ανευρέθηκε σε μικρό αριθμό οργάνων. Τα παραπάνω ευρήματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ιαιμία που διαπιστώνεται κατά τα αρχικά στάδια της λοίμωξης, προκαλεί διασπορά του ιού σε διάφορα όργανα, και κυρίως στο ήπαρ. Ο ιός πολλαπλασιάζεται και παραμένει σε αυτά

για σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ μετά την 35<sup>η</sup> ημέρα εντοπίζεται στα όργανα – στόχο για τον πολλαπλασιασμό του. Στους μάρτυρες, DNA του ιού δεν ανιχνεύθηκε στα όργανα τόσο την 35<sup>η</sup>, όσο και την 54<sup>η</sup> ημέρα θανάτωσής τους.

Στα μολυσμένα χοιρίδια παρατηρήθηκαν μακροσκοπικές αλλοιώσεις, κυρίως στο γαστρεντερικό σωλήνα, αλλά και στο λεμφικό ιστό. Επίσης, πνευμονικό οίδημα, αυξημένο περικαρδιακό υγρό και ασκίτης διαπιστώθηκαν σε ορισμένα πειραματοζώα. Οι παραπάνω αλλοιώσεις παρατηρούνται σε χοίρους που νοσούν από ΠΣΑΑΧ (Segales και Domingo, 2002). Από την αξιολόγηση του είδους των μακροσκοπικών αλλοιώσεων που εμφάνισαν τα χοιρίδια στη συγκεκριμένη μελέτη προέκυψε ότι το στέλεχος του ιού που χρησιμοποιήθηκε για τη μόλυνση, εμφάνιζε ιδιαίτερο τροπισμό στο γαστρεντερικό σωλήνα.

Στα μολυσμένα χοιρίδια μελετήθηκε η ιστοπαθολογική εικόνα που εμφάνιζαν τα λεμφογάγγλια, η νήστιδα και ο ειλεός, καθώς και η διασπορά του αντιγόνου του ιού στα κύτταρα αυτών. Τα παραπάνω όργανα επιλέχθηκαν για ιστοπαθολογική εξέταση, γιατί το στέλεχος του ιού που χρησιμοποιήθηκε για τη μόλυνση, απομονώθηκε από ένα χοίρο που εμφάνιζε διάρροια και είχε νεκρώσεις στα υπογνάθια, βρογχικά, μεσεντέρια και επιπολής βουβωνικά λεμφογάγγλια. Αραίωση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων και αλλοιώσεις εστιακής νέκρωσης διαπιστώθηκαν στα λεμφογάγγλια σε μικρό αριθμό των μολυσμένων χοιριδίων. Στα βουβωνικά λεμφογάγγλια, η ένταση των αλλοιώσεων ήταν μεγαλύτερη στα πειραματόζωα που λάμβαναν ανοσοενισχυτική ουσία με το σιτηρέσιο (ομάδες II και IV) ανεξάρτητα από τη δόση του ιού. Έχει ήδη αναφερθεί ότι DNA του ιού ανιχνεύθηκε στα βουβωνικά λεμφογάγγλια όλων των μολυσμένων χοιριδίων των ομάδων II και IV. Από τα παραπάνω ευρήματα προέκυψε ότι η παρουσία του ιού στα βουβωνικά λεμφογάγγλια οδήγησε στην πρόκληση των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων. Θα περιμέναμε οι προαναφερθείσες αλλοιώσεις να διαπιστωθούν σε περισσότερα πειραματόζωα, λαμβάνοντας υπόψη ότι η αραίωση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων αποτελεί τη χαρακτηριστική ιστοπαθολογική αλλοίωση που παρατηρείται σε χοίρους που νοσούν από ΠΣΑΑΧ. Επίσης, πολυεστιακή πηκτική νέκρωση στα λεμφογάγγλια έχει διαπιστωθεί σε φυσικά περιστατικά ΠΣΑΑΧ (Segales και συν., 2002γ). Ωστόσο στην παρούσα μελέτη, η πρόκληση ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων στα λεμφογάγγλια σε μικρό αριθμό πειραματόζωων θα μπορούσε να οφείλεται στη μικρή ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων που είχε το στέλεχος του ιού το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη μόλυνση σε σχέση με άλλα στελέχη που είναι κατατεθειμένα στην Τράπεζα Δεδομένων.

Στη νήστιδα και τον ειλέο των μολυσμένων χοιριδίων διαπιστώθηκαν πολυεστιακά αλλοιώσεις νεκρωτικής εντερίτιδας κυμαινόμενου βαθμού έντασης. Αν και ο κυκλοϊός 2 έχει συσχετιστεί με φυσικά περιστατικά εντερίτιδας (Chae, 2004), στην παρούσα μελέτη αναφέρεται για πρώτη φορά πολυεστιακή νεκρωτική εντερίτιδα στη νήστιδα και τον ειλέο σε χοιρίδια που μολύνθηκαν με πειραματικό τρόπο. Η ένταση της φλεγμονής στη νήστιδα δεν επηρεάστηκε από τη δόση του ιού και από τη χορήγηση ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση. Ωστόσο, η αξιολόγηση των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων έδειξε ότι τα χοιρίδια που μολύνθηκαν με την υψηλή δόση του ιού και λάμβαναν ανοσοενισχυτική ουσία με το σιτηρέσιο (ομάδα IV) εμφάνισαν πιο έντονη φλεγμονή στη νήστιδα. Πιθανά αν ο αριθμός των χοιριδίων κάθε ομάδας ήταν μεγαλύτερος, να μπορούσε να διαπιστωθεί στατιστικά σημαντική διαφορά στην ένταση της φλεγμονής στη νήστιδα στην ομάδα IV. Επίσης, όσα πειραματόζωα μολύνθηκαν με την υψηλή δόση του ιού, ανεξάρτητα από τη χορήγηση ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο (ομάδες III και IV), εμφάνισαν πιο έντονη φλεγμονή στον ειλέο. Η υψηλή δόση επηρέασε με διαφορετικό τρόπο την ένταση της φλεγμονής στη νήστιδα και τον ειλέο. Υπάρχουν διαφορές στην ιστολογική δομή στα δύο τμήματα του εντέρου, όπως οι πλάκες Peyer που βρίσκονται στον ειλέο. Ο ιός έχει τροπισμό στο λεμφικό ιστό και προκαλεί χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. Επιπλέον, η μόλυνση με την υψηλή δόση οδήγησε σε γρήγορο πολλαπλασιασμό του ιού και πρόκληση έντονης φλεγμονής στον ειλέο. Η ένταση των νεκρωτικών αλλοιώσεων στη νήστιδα και τον ειλέο δεν επηρεάστηκε από τη δόση του ιού και τη χορήγηση ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο. Οι νεκρώσεις ήταν αποτέλεσμα της μόλυνσης με τον ιό, αφού δεν παρατηρήθηκαν στους μάρτυρες. Επίσης, το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική μελέτη προήρθε από χοίρο που εμφάνιζε νεκρώσεις στα λεμφογάγγλια. Η μόλυνση των χοίρων με υψηλότερο τίτλο ιού, θα μπορούσε να οδηγήσει στη δημιουργία πιο έντονων αλλοιώσεων. Το είδος των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων πιθανά να συσχετίζεται με τη διακύμανση σε επίπεδο νουκλεοτιδίων που έχει το στέλεχος του ιού της πειραματικής μόλυνσης.

Αντιγόνο του ιού ανιχνεύθηκε σε λεμφοκύτταρα των πλακών του Peyer και των λεμφογαγγλίων, σε επιθηλιακά κύτταρα και σπανιότερα σε διάσπαρτα μακροφάγα κύτταρα του βλεννογόνου της νήστιδας και του ειλεού και σε ορισμένες περιπτώσεις σε ινοβλάστες στο χόριο του βλεννογόνου του εντέρου. Τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και τα λεμφοκύτταρα των πλακών του Peyer και των λεμφογαγγλίων αποτέλεσαν κύτταρα - στόχο για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Η ανίχνευση αντιγόνου στα

λεμφοκύτταρα των πλακών του Peyer ήταν αναμενόμενη, γιατί ο ιός έχει τροπισμό στο λεμφικό ιστό στον οποίο προκαλεί χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. Επίσης, οι πλάκες του Peyer αποτελούν φραγμό στην εισβολή βακτηρίων ή ιών και σε αυτές υπάρχουν τα κύτταρα M, τα οποία φαγοκυτταρώνουν τα αντιγόνα που βρίσκονται στον αυλό του εντέρου, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες ιογενείς μολύνσεις (Vlemmas και συν., 2000). Σε αντίθεση με τους Kennedy και συν. (2000) που διαπίστωσαν αντιγόνο του ιού στο κυτταρόπλασμα των λείων μυϊκών ινών του πεπτικού συστήματος, στην παρούσα μελέτη αντιγόνου του ιού ανιχνεύθηκε κατά κύριο λόγο στο επιθήλιο. Ο ιός δεν εισχώρησε στους έσω χιτώνες του εντέρου, πιθανά γιατί έφτασε στο έντερο μέσω του πεπτικού σωλήνα (στοματορινική οδός μόλυνσης) και όχι μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας. Αντιγόνο του ιού εντοπίστηκε κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων, πιθανά γιατί ο πολλαπλασιασμός του λαμβάνει χώρα στον πυρήνα (Tischer και συν., 1987).

Περισσότερα κύτταρα των υπογναθίων λεμφογαγγλίων έφεραν αντιγόνο του ιού στα χοιρίδια που μολύνθηκαν με χαμηλή δόση ανεξάρτητα από τη χορήγηση ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο (ομάδες I και II). Επίσης, περισσότερα κύτταρα των μεσεντερίων και επιπολής βουβωνικών λεμφογαγγλίων έφεραν αντιγόνο του ιού στα μολυσμένα χοιρίδια που λάμβαναν ανοσοενισχυτική ουσία με το σιτηρέσιο (ομάδες II και IV). Η παρουσία μεγαλύτερου αριθμού κυττάρων που έφεραν το αντιγόνο του ιού στα υπογνάθια λεμφογάγγλια των ομάδων I και II και τα μεσεντέρια λεμφογάγγλια των ομάδων II και IV, δε συσχετίστηκε με την ένταση των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων. Ωστόσο, στα βουβωνικά λεμφογάγγλια των ομάδων II και IV, ανιχνεύθηκε DNA του ιού και διαπιστώθηκαν έντονες ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις, γεγονός που συσχετίστηκε με την ανίχνευση μεγαλύτερου αριθμού κυττάρων που έφεραν το αντιγόνο του ιού. Η δόση του ιού και η χορήγηση ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο δεν επηρέασαν τον αριθμό των κυττάρων που ήταν θετικά για το αντιγόνο του ιού στη νήστιδα και τον ειλέο.

Από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης προέκυψε ότι τα πειραματόζωα δεν εμφάνισαν την τυπική μορφή του ΠΣΑΑΧ, αφού διαπιστώθηκαν νεκρώσεις στα λεμφογάγγλια και το έντερο ή νεκρωτική εντερίτιδα και λεμφαδενίτιδα, αφού παρατηρήθηκε αραίωση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων σε ορισμένα λεμφογάγγλια. Τα μολυσμένα χοιρίδια εμφάνισαν ΠΣΑΑΧ το οποίο χαρακτηρίστηκε κυρίως από νεκρωτικές αλλοιώσεις στο πεπτικό σύστημα. Λαμβάνοντας υπόψη τη διάγνωση του ΠΣΑΑΧ, όπως αυτή ορίστηκε από το Sorden (2000), ένας χοίρος νόσησε με κλινικά συμπτώματα (διάρροια και απώλεια βάρους), δεκατρείς χοίροι νόσησαν

ελαφρά (διάρροια) και δύο χοίροι είχαν υποκλινική λοίμωξη, αφού δε διαπιστώθηκαν κλινικά συμπτώματα.

Στην παρούσα μελέτη έγινε πειραματική αναπαραγωγή των νεκρωτικών αλλοιώσεων και προκλήθηκε κλινική νόσος σε χοιρίδια που μολύνθηκαν με κυκλοϊό 2. Η δόση του ιού και η χορήγηση ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο δεν επηρέασαν την κλινική εικόνα. Πιστεύουμε ότι περισσότερες πειραματικές μελέτες με στελέχη του ιού που ανιχνεύθηκαν από χοίρους οι οποίοι εμφάνιζαν διαφορετικά κλινικά σύνδρομα και ειδικότερα διαφορετικού είδους ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις, θα βοηθήσουν στην κατανόηση της παθογένειας του ιού.

## ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο κυκλοϊός 2 αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα του ΠΣΑΑΧ (Ellis και συν., 1999, Kennedy και συν., 2000). Ο ιός ανιχνεύθηκε σε οικόσιτους χοίρους που νοσούσαν από διαφορετικά κλινικά σύνδρομα, όπως είναι το Σύνδρομο Δερματίτιδας και Νεφροπάθειας των χοίρων (Allan και Ellis, 2000, Gresham και συν., 2001, Meehan και συν., 2001), τα αναπαραγωγικά προβλήματα (Josephson και Charbonneau, 2001, Ladekjaer-Mikkelsen και συν., 2001, O'Connor και συν., 2001, West και συν., 1999), η κοκκιωματώδης εντερίτιδα (Chae, 2004), η νεκρωτική λεμφαδενίτιδα (Chae, 2004) και η εξιδρωματική επιδερμίτιδα (Wattrang και συν., 2002). ΠΣΑΑΧ έχει αναφερθεί και σε αγριόχοιρους (*Sus scrofa*) (Csagola και συν., 2006, Knell και συν., 2005, Schulze και συν., 2004, Toplak και συν., 2004, Vicente και συν., 2004).

Από τα παραπάνω προέκυψε το ερώτημα αν στη χώρα μας ο ιός συσχετίζεται με κλινικά σύνδρομα στους οικόσιτους χοίρους, εκτός από το ΠΣΑΑΧ και το ΣΔΝΧ και αν απαντάται ΠΣΑΑΧ στους αγριόχοιρους. Με σκοπό να διερευνηθεί αν ο ιός αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα διαφορετικών κλινικών συνδρόμων, στέλεχος του ιού απομονώθηκε από φυσικό περιστατικό νεκρωτικής λεμφαδενίτιδας και ακολούθησε πειραματική μόλυνση χοιριδίων με αυτό.

Στην παρούσα μελέτη ο κυκλοϊός 2 συσχετίστηκε με φυσικά περιστατικά εξιδρωματικής επιδερμίτιδας, νεκρωτικής λεμφαδενίτιδας και κοκκιωματώδους εντερίτιδας. Προσδιορίστηκε η ακολουθία των νουκλεοτιδίων στελεχών που ανιχνεύθηκαν από τα παραπάνω κλινικά σύνδρομα, καθώς και στελεχών από ΠΣΑΑΧ και ΣΔΝΧ. Η φυλογενετική ανάλυση σε ολόκληρο το γένωμα έδειξε ότι τα Ελληνικά στελέχη δεν ήταν μονοφυλετικά και σχημάτισαν ομάδα μαζί με στελέχη από τη Γαλλία, τη Γερμανία και την Αυστρία. Η ομοιότητα των Ελληνικών στελεχών με στελέχη από άλλες Ευρωπαϊκές χώρες μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο ιός πιθανά να εισήρθε στη χώρα μας με την εισαγωγή γεννητόρων από το εξωτερικό. Από τη φυλογενετική στο ΑΑΠ2, προέκυψε ότι το συγκεκριμένο γονίδιο δε καθορίζει τη λοιμογόνο δύναμη των στελεχών, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Η φυλογενετική ανάλυση στο ΑΑΠ3 έδειξε ότι υπάρχει συσχετισμός ανάμεσα στα Ελληνικά στελέχη και το είδος των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων που διαπιστώθηκαν στα φυσικά περιστατικά από τα οποία ανιχνεύθηκαν. Το στέλεχος που ανιχνεύθηκε από το χοίρο που εμφάνιζε νεκρωτική λεμφαδενίτιδα είχε τη μεγαλύτερη διακύμανση σε επίπεδο νουκλεοτιδίων.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης, ΠΣΑΑΧ διαγνώστηκε σε αγριόχοιρο μικρότερο των έξι μηνών. Η διάγνωση βασίστηκε στα κλινικά συμπτώματα (απίσχυση και

διάρροια), τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις (όμοιες με εκείνες που παρατηρούνται σε οικόσιτους χοίρους με ΠΣΑΑΧ) και την ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 2 σε διάφορα όργανα. ΠΣΑΑΧ διαπιστώθηκε και σε ενήλικο θηλυκό αγριόχοιρο. Στην περίπτωση αυτή η διάγνωση έγινε με βάση τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις (όμοιες με εκείνες που παρατηρούνται σε οικόσιτους χοίρους με ΠΣΑΑΧ) και την ανίχνευση DNA του ιού σε διάφορα όργανα συμπεριλαμβανομένης και της μήτρας. Οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις ήταν έντονου βαθμού και θα μπορούσαν να είναι αποτέλεσμα της ταυτόχρονης λοίμωξης με τον κυκλοϊό 2 και τον ιό του ΑΑΣΧ. Η ανίχνευση DNA του ιού στη μήτρα έδειξε ότι ο ιός θα μπορούσε να εμπλέκεται στην πρόκληση αναπαραγωγικών προβλημάτων στους αγριόχοιρους. Ένα στέλεχος του ιού ανιχνεύθηκε από κάθε αγριόχοιρο και προσδιορίστηκε η ακολουθία των νουκλεοτιδίων τους. Τα στελέχη εμφάνιζαν μεγάλη ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Ο ιός δεν είχε ειδικότητα ξενιστή, δηλαδή τα στελέχη μεταδίδονται από τους οικόσιτους στους άγριους χοίρους ή και αντίστροφα.

Στο τρίτο μέρος της μελέτης χοιρίδια που προήρθαν από συμβατική εκτροφή ενοφθαλμίστηκαν με στέλεχος του ιού το οποίο απομονώθηκε από φυσικό περιστατικό νεκρωτικής λεμφαδενίτιδας. Στα μολυσμένα χοιρίδια DNA του ιού ανιχνεύθηκε στο πλάσμα του αίματος (>3 εβδομάδες) πριν την έναρξη ανίχνευσης των αντισωμάτων, τις ρινικές εκκρίσεις και τα κόπρανα. Τα μολυσμένα χοιρίδια εμφάνισαν αντισώματα από τη 14η έως 28η ημέρα και παρέμειναν οροθετικά μέχρι τον τερματισμό της πειραματικής μελέτης. Σε ένα μολυσμένο χοιρίδιο παρατηρήθηκε μείωση του βάρους (10, ομάδα III), ενώ στα περισσότερα μολυσμένα χοιρίδια διαπιστώθηκαν μη σχηματισμένα κόπρανα μαλακής σύστασης ή / και υδαρούς σύστασης. Οι σιελογόνοι αδένες, η καρδιά, οι μύες και η πυλωρική μοίρα του στομάχου πιθανά αποτέλεσαν όργανα - στόχο για τον πολλαπλασιασμό του ιού, αφού DNA του ανιχνεύθηκε σε όλα τα μολυσμένα χοιρίδια. Η ανίχνευση DNA του ιού στα λεμφογάγγλια δεν αποτέλεσε σταθερό εύρημα και DNA του ανιχνεύθηκε μόνο σε δύο μολυσμένα χοιρίδια στη νήστιδα και τον ειλεό. Νουκλεϊκό οξύ του ιού ανιχνεύθηκε σε περισσότερα όργανα στα χοιρίδια που θανατώθηκαν την 35η ημέρα. Μακροσκοπικές αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν στο γαστρεντερικό σωλήνα και στο λεμφικό ιστό. Στη νήστιδα και τον ειλεό διαπιστώθηκαν αλλοιώσεις νεκρωτικής εντερίτιδας κυμαινόμενου βαθμού έντασης. Στα λεμφογάγγλια διαπιστώθηκαν αραίωση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων και αλλοιώσεις εστιακής νέκρωσης σε μικρό αριθμό των μολυσμένων χοιριδίων. Αντιγόνο του ιού εντοπίστηκε κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων. Οι μολυσμένοι χοίροι δεν εμφάνισαν ούτε την τυπική μορφή του ΠΣΑΑΧ ούτε νεκρωτική εντερίτιδα και λεμφαδενίτιδα. Συμπερασματικά, οι μολυσμένοι

χοίροι εμφάνισαν ΠΣΑΑΧ το οποίο χαρακτηρίστηκε από νεκρωτικές αλλοιώσεις κυρίως στο πεπτικό σύστημα. Στην παρούσα μελέτη έγινε για πρώτη φορά πειραματική αναπαραγωγή των νεκρωτικών αλλοιώσεων και προκλήθηκε κλινική νόσος σε χοιρίδια που μολύνθηκαν με κυκλοϊό 2. Η δόση του ιού και η χορήγηση ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο δε διαδραμάτισαν ιδιαίτερο ρόλο.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

### **Κεφάλαιο 1**

Στο πρώτο μέρος της διατριβής γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με την ταξινόμηση, το ιστορικό, τις φυσικοχημικές ιδιότητες, τη γεωγραφική εξάπλωση, την οργάνωση του γενώματος και τον πολλαπλασιασμό του κυκλοϊού 2 του χοίρου. Στη συνέχεια περιγράφεται η σύγκριση της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων μεταξύ των στελεχών του ιού. Ακολουθεί η περιγραφή του Πολυσυστηματικού Συνδρόμου Απίσχυασης των Απογαλακτισμένων Χοιριδίων (ΠΣΑΑΧ), καθώς και άλλων κλινικών συνδρόμων που έχουν συσχετιστεί με τον ιό. Τέλος, περιγράφονται οι πειραματικές μελέτες οι οποίες συνδέονται με τη δική μας έρευνα.

### **Κεφάλαιο 2**

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διαπιστωθεί αν τα Ελληνικά στελέχη του κυκλοϊού 2 του χοίρου απαντώνται σε κλινικά περιστατικά εκτός του Πολυσυστηματικού Συνδρόμου Απίσχυασης των Απογαλακτισμένων Χοιριδίων (ΠΣΑΑΧ) και του Συνδρόμου Δερματίτιδας και Νεφροπάθειας των Χοίρων (ΣΔΝΧ). Δείγματα οργάνων συλλέχθηκαν από χοίρους που εμφάνιζαν ποικίλα κλινικά συμπτώματα και στη συνέχεια έγιναν ιολογικές και ιστοπαθολογικές εξετάσεις. Σε τέσσερις εκτροφές διαγνώστηκε ΠΣΑΑΧ και σε άλλες δύο ΣΔΝΧ. Ο ιός συσχετίστηκε με κλινικά περιστατικά εξιδρωματικής επιδερμίτιδας, νεκρωτικής λεμφαδενίτιδας και κοκκιωματώδους εντερίτιδας σε τρεις εκτροφές. Ο συσχετισμός των παραπάνω νοσημάτων με τον ιό στη χώρα μας αναφέρεται για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων ενός στελέχους του ιού από κάθε εκτροφή και ακολούθησε φυλογενετική ανάλυση. Τα Ελληνικά στελέχη δεν ήταν μονοφυλετικά και σχημάτισαν ομάδα με στελέχη από τη Γαλλία, τη Γερμανία και την Αυστρία, γεγονός που έδειξε ότι ο ιός πιθανά να εισήλθε στη χώρα μας με την εισαγωγή γεννητόρων από το εξωτερικό. Τα στελέχη δε σχημάτισαν ομάδες στο φυλογενετικό δέντρο με βάση τα κλινικά σύνδρομα από τα οποία ανιχνεύθηκαν. Το ΑΑΠ2 δε φάνηκε να καθορίζει τη λοιμογόνο δύναμη των στελεχών. Ωστόσο, από τη φυλογενετική ανάλυση στο ΑΑΠ3 προέκυψε ότι υπάρχει συσχετισμός ανάμεσα στα στελέχη και το είδος των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων που παρατηρήθηκαν, στα φυσικά περιστατικά από τα οποία ανιχνεύθηκαν. Το στέλεχος του ιού που ανιχνεύθηκε από το φυσικό περιστατικό της νεκρωτικής λεμφαδενίτιδας, είχε τη μεγαλύτερη διακύμανση σε επίπεδο νουκλεοτιδίων σε σχέση με τα υπόλοιπα Ελληνικά στελέχη.

### Κεφάλαιο 3

Το Πολυσυστηματικό Σύνδρομο Απίσχυσης των Απογαλακτισμένων Χοιριδίων (ΠΣΑΑΧ) διαγνώστηκε σε ένα θηλυκό αγριόχοιρο (*Sus scrofa*) το 2002 στη χώρα μας. Η διάγνωση βασίστηκε στην ανίχνευση του DNA του κυκλοϊού 2 του χοίρου σε διάφορα όργανα συμπεριλαμβανομένου της μήτρας και τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. Σύμφωνα με τα μέχρι στιγμής βιβλιογραφικά δεδομένα, σε αυτή τη μελέτη αναφέρεται για πρώτη φορά η ανίχνευση DNA του ιού σε μήτρα αγριόχοιρου. Τρία χρόνια αργότερα (2005), ένας αρσενικός αγριόχοιρος ηλικίας μικρότερης των έξι έως οχτώ μηνών βρέθηκε σε ημιθανή κατάσταση. Ο αγριόχοιρος εμφάνιζε δύσπνοια και βρισκόταν σε κακή θρεπτική κατάσταση. Σε ιστοτεμάχια από διάφορα όργανα ανιχνεύθηκε DNA του κυκλοϊού 2 και διαπιστώθηκαν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που απαντώνται στο ΠΣΑΑΧ. Οι δύο αγριόχοιροι προέρχονταν από γειτονικά κυνηγετικά καταφύγια της κεντρικής Ελλάδας. Δύο στελέχη του ιού ανιχνεύθηκαν στους αγριόχοιρους και προσδιορίστηκε η ακολουθία των νουκλεοτιδίων τους. Ακολούθησε φυλογενετική ανάλυση ανάμεσα σε στελέχη του ιού που απομονώθηκαν από άγριους και οικόσιτους χοίρους. Τα δύο Ελληνικά στελέχη εμφάνισαν υψηλή ομοιότητα μεταξύ τους σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και σχημάτισαν ομάδα με δύο στελέχη που απομονώθηκαν από αγριόχοιρους στην Ουγγαρία. Η μεγάλη ομοιότητα των Ελληνικών στελεχών σε επίπεδο νουκλεοτιδίων έδειξε ότι η μετακίνηση των αγριόχοιρων ανάμεσα στις δύο περιοχές οδήγησε στην εξάπλωση του ιού. Από τη φυλογενετική ανάλυση προέκυψε ότι ο ιός δεν εμφανίζει ειδικότητα ξενιστή και ότι τα στελέχη μεταδίδονται από τους οικόσιτους στους άγριους χοίρους ή και αντίστροφα.

### Κεφάλαιο 4

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η παθογόνος δράση ενός Ελληνικού στελέχους του κυκλοϊού 2 του χοίρου το οποίο απομονώθηκε από ένα χοίρο που εμφάνιζε διάρροια και είχε νεκρωτικές αλλοιώσεις στα λεμφογάγγλια. Για το σκοπό αυτό, χοιρίδια που προήρθαν από συμβατική εκτροφή και δεν είχαν αντισώματα έναντι του ιού, μολύνθηκαν από τη στοματορινική οδό με το παραπάνω στέλεχος. Ταυτόχρονα μελετήθηκε η επίδραση που είχαν η δόση του ιού (χαμηλή ή υψηλή) και η χορήγηση ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο στην πορεία της λοίμωξης. Τα μισά μολυσμένα χοιρίδια θανατώθηκαν την 35<sup>η</sup> ημέρα μετά τη μόλυνση και τα υπόλοιπα την 54<sup>η</sup> ημέρα. Τα μολυσμένα χοιρίδια δεν εμφάνισαν κλινικά συμπτώματα, με εξαίρεση την απώλεια βάρους σε έναν χοίρο και τη

διάρροια που διαπιστώθηκε συγκεκριμένες ημέρες της πειραματικής μελέτης. Η ιαμμία προηγήθηκε της έναρξης ανίχνευσης των αντισωμάτων και συνεχίστηκε για όσο διάστημα τα πειραματόζωα ήταν οροθετικά. Ο ιός ανιχνεύθηκε στο ρινικό έκκριμα και τα κόπρανα. Στα μολυσμένα χοιρίδια DNA του ιού δε διαπιστώθηκε σε όλα τα λεμφογάγγλια. Σε δύο μολυσμένα χοιρίδια DNA του ιού ανιχνεύθηκε στη νήστιδα και τον ειλεό. Μακροσκοπικές αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν κυρίως στο πεπτικό σύστημα, καθώς και στο λεμφικό ιστό των μολυσμένων χοιριδίων. Στα λεμφογάγγλια διαπιστώθηκαν μείωση του αριθμού των λεμφοκυττάρων και αλλοιώσεις εστιακής νέκρωσης σε μικρό αριθμό των μολυσμένων χοιριδίων. Στη νήστιδα και τον ειλεό διαπιστώθηκαν πολυεστιακά αλλοιώσεις νεκρωτικής εντερίτιδας κυμαινόμενου βαθμού έντασης. Το αντιγόνο του ιού ανιχνεύθηκε στα λεμφογάγγλια και το έντερο των μολυσμένων χοιριδίων. Η δόση του ιού και η χορήγηση ανοσοενισχυτικής ουσίας με το σιτηρέσιο δεν είχαν σημαντική επίδραση στην πορεία της λοίμωξης. Από τα προηγούμενα ευρήματα προέκυψε ότι τα μολυσμένα χοιρίδια εμφάνισαν διαφοροποιημένο ΠΣΑΑΧ το οποίο χαρακτηρίστηκε από τις νεκρωτικές αλλοιώσεις στο πεπτικό σύστημα.

## **ABSTRACT**

### **Chapter 1**

The first chapter refers to introductory data about taxonomy, biological properties, geographical distribution, genome organization and replication of porcine circovirus 2 (PCV2), and nucleotide sequence alignments between PCV2 isolates. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and other PCV2-associated diseases are described, as well as experimental studies using PCV2 isolates that comprised the base of our research.

### **Chapter 2**

Tissue samples were collected from pigs presenting various clinical signs and tested by PCR for PCV2 DNA and histopathology for PCV2 associated lesions. PMWS was diagnosed in four farms and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) in two. PCV2 was also associated with clinical cases of exudative epidermitis, necrotizing lymphadenitis and granulomatous enteritis in three farms for the first time in Greece. A virus strain was isolated from each farm. Greek PCV2 strains were clustered with strains from France, Germany and Austria, suggesting that the virus entered into Greece through the international trade of breeders. The PCV2 sequences were not clustered according to the clinical syndrome that they were isolated from. Open Reading Frame 2 (ORF2) was not a determinant of viral virulence. Phylogenetic analysis in ORF3 gene showed a correlation between virus strains and type of histopathological lesions.

The strain isolated from the clinical case of necrotizing lymphadenitis showed the greatest nucleotide variation.

### **Chapter 3**

In 2002, PMWS was diagnosed in a European female wild boar (*Sus scrofa*), based on the detection of PCV2 DNA in various organs, including the uterus, and on histopathological lesions. This is the first detection of PCV2 DNA in the uterus of a wild boar. Three years later (2005), a wild boar less than six to eight months of age was found moribund. It presented wasting and dyspnoea and finally died. PCV2 DNA was detected in tissue samples, and histopathological lesions consistent with PMWS were observed. Both wild boars were from neighbouring hunting areas in central Greece. The PCV2 sequences from the wild boars in this study were closely related to each other and were grouped with two isolates from wild boars from Hungary. The phylogenetic analysis

revealed that the virus might be transmitted between hunting areas. In addition, PCV2 may spread from domestic pigs to wild boars and vice versa.

#### **Chapter 4**

Conventional piglets with no antibodies against PCV2 were inoculated by the oronasal route with high or low dose of a PCV2 virus strain isolated from a pig with diarrhea and necrotizing lesions in lymph nodes. Immune enhancers were also supplemented in halves inoculated pig's diet. Infected pigs were euthanized at 35 and 54 days post infection and presented diarrhea in certain sampling days. Viremia was detected before seroconversion and co-existed with the antibodies against the virus. The virus was excreted with nasal secretions and feces. PCV2 DNA was not detected in all lymph nodes, and was present in jejunum and ileum of two pigs. Gross lesions were observed in gastrointestinal tract as well as in lymphoid tissue (lymph nodes, peyer patches). Lymphocyte depletion and focal necrotizing lesions were present in lymph nodes of few pigs. Multifocal necrotizing lesions of variable severity were seen in jejunum and ileum. PCV2 antigen was detected in lymph nodes and intestine of infected pigs. The different virus doses and the addition of immune enhancers in pig's diet did not have any significant effect on the progress of the infection. The previous findings suggested that infected pigs suffered from a different type of PMWS that was mainly characterized from necrotizing lesions in lymph nodes, jejunum and ileum.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΕΣ

ALBINA, E., TRUONG, C., HUTET, E., BLANCHARD, P., CARIOLET, R., L'HOSPITALIER, R., MAHÉ, D., ALLÉE, C., MORVAN, H., AMENNA, N., LE DIMNA, M., MADEC, F. and JESTIN A., 2001. An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *Journal of Comparative Pathology*, 125, pp.292-303.

ALLAN, G.M., PHENIX, K.V., TODD, D. and MCNULTY, M.S., 1994. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Zentralbl Veterinarmed B*, 41, pp.17-26.

ALLAN, G.M., MCNEILLY, F., CASSIDY, J.P., REILLY, G.A., ADAIR, B., ELLIS, W.A. and MCNULTY, M.S., 1995. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrums deprived piglets and examination of pig foetal material. *Veterinary Microbiology*, 44, pp.49-64.

ALLAN, G.M., MEEHAN, B., TODD, D., KENNEDY, S., MCNEILLY, F., ELLIS, J., CLARK, E.G., HARDING, J., ESPUNA, E., BOTNER, A. and CHARREYRE, C., 1998. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Veterinary Record*, 142, pp.467-468.

ALLAN, G.M., MCNEILLY, F., KENNEDY, S., DAFT, B., CLARKE, E.G., ELLIS, J.A., HAINES, D.M., MEEHAN, B.M. and ADAIR, B.M., 1998b. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10, pp.3-10.

ALLAN, G.M., MC NEILLY, F., MEEHAN, B.M., KENNEDY, S., MACKIE, D.P., ELLIS, J.A., CLARK, E.G., ESPUNA, E., SAUBI, N., RIERA, P., BØTNER, A. and CHARREYRE, C.E., 1999. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Veterinary Microbiology*, 66, pp.115-123.

ALLAN, G.M. and ELLIS, J.A., 2000. Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12, pp.3-14.

ALLAN, G.M., MCNEILLY, F., MCNAIR, I., CURRAN, M.D., WALKER, I., ELLIS, J., KONOBY, C., KENNEDY, S. and MEEHAN, B., 2000. Absence of evidence for porcine circovirus type 2 in cattle and humans, and lack of seroconversion or lesions in experimentally infected sheep. *Archives of Virology*, 145, pp.853-857.

ALLAN, G.M., MCNEILLY, F., ELLIS, J., KRAKOWKA, S., MEEHAN, B., MCNAIR, I., WALKER, I. and KENNEDY, S., 2000b. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2(PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Archives of Virology*, 145, pp.2421-2429.

- BALASCH, M., SEGALÉS, J., ROSELL, C., DOMINGO, M., MANKERTZ, A., URNIZA, A. and PLANA-DURÁN, J., 1999. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Comparative Pathology*, 121, pp.139-148.
- BLANCHARD, P., MAHÉ, D., CARIOLET, R., KERANFLECH, A., BAUDOARD, M.A., CORDIOLI, P., ALBINA, E. and JESTIN A., 2003. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine*, 21, pp.4565-4575.
- BOGDAN, J., WEST, K., CLARK, E., KONOBY, C., HAINES, D., ALLAN, G., MCNEILLY, F., MEEHAN, B., KRAKOWKA, S. and ELLIS, J.A., 2001. Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995-1998. *Canadian Veterinary Journal*, 42, pp.548-550.
- BOITANI, L. and MATTEI, L., 1992. Aging wild boar by tooth eruption. *Ongules/Ungulates*, 91, pp.419-421.
- BOLIN, S.R., STOFFREGEN, W.C., NAYAR, G.P. and HAMEL, A.L., 2001. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13, pp.185-194.
- CELER, J.V. and CARASOVA, P., 2002. First evidence of porcine circovirus type 2 (PCV-2) infection of pigs in the Czech Republic by semi-nested PCR. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Disease and Veterinary Public Health*, 49, pp.155-159.
- CHAE, C., 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *The Veterinary Journal*, 169, pp. 326-336.
- CHEUNG, A.K., 2003 $\alpha$ . Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Virology*, 305, pp.168-180.
- CHEUNG, A.K., 2003 $\beta$ . The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology*, 313, pp.452-459.
- CHEUNG, A.K., 2004. Identification of the essential and non-essential transcription units for protein synthesis, DNA replication and infectious virus production of Porcine circovirus type 1. *Archives of Virology*, 149, pp.975-988.
- CLARK, E.G., 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: Proceedings of the American Association of Swine Practitioners, pp.499-502.
- CORREGE, I., PIROUELLE, D., GAUDRE, D. and LETIRAN, M.H., 2001. La maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP): Influence de differents parametres zootechniques sur son incidence dans un élevage experimental. *J Rech Porcine Fr*, 33, pp.283-290.

- CSAGOLA, A., KECSKEMETI, S., KARDOS, G., KISS, I. and TUBOLY, T., 2006. Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Archives of Virology*, 151, pp.495-507.
- DAVIS, M. E., MAXWELL, C.V., BROWN, D.C., DE RODAS, B.Z., JOHNSON, Z.B., KEGLEY, E.B., HELFWIG, D.H. and DVORAK, R.A., 2002. Effect of dietary mannan oligosaccharide and(or) pharmacological additions of supplemental copper on growth performance and immunocompetence of weanling and growing/finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 80, pp.2887–2894.
- DE BOISSÉSON, C., BÉVEN, V., BIGARRÉ, L., THIÉRY, R., ROSE, N., EVENO, E., MADEC, F. and JESTIN, A., 2004. Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *Journal of General Virology*, 85, pp.293-304.
- DREW, T.W., GRIERSON, S.S., KING, D.P., HICKS, D., DONE, S., NESER, J.A., EVANS, D.P., GRIMBEE, P. and BANKS, M. 2004. Genetic similarity between porcine circovirus type 2 isolated from the first reported case of PMWS in South Africa and North American isolates. *Veterinary Record*, 155, pp.149-151.
- DROLET, R., THIBAUT, S., D'ALLAIRE, S., et al., 1999. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): An overview of the disease. *Swine Health of Production*, 6, pp.283-285.
- DVORAK, R., and JACQUES, K.A., 1998. Mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide, and Carbadox for pigs days 0-21 post-weaning. *Journal of Animal Science*, 76, pp.64.
- ELLIS, J., HASSARD, L., CLARK, E., HARDING, J., ALLAN, G., WILLSON, P., STROKAPPE, J., MARTIN, K., MCNEILLY, F., MEEHAN, B., TODD, D. and HAINES, D., 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Veterinary Journal*, 39, pp.44-51.
- ELLIS, J., KRAKOWKA, S., LAIRMORE, M., HAINES, D., BRATANICH, A., CLARK, E., ALLAN, G., KONOBY, C., HASSARD, L., MEEHAN, B., MARTIN, K., HARDING, J., KENNEDY, S. and MCNEILLY, F., 1999. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, pp.3-14.
- FENAUX, M., HALBUR, P.G., GILL, M., TOTH, T.E., and MENG, X.J., 2000. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, pp.2494- 2503.
- FINSTERBUSCH, T., STEINFELDT, T., CALISKAN, R. and MANKERTZ, A., 2005. Analysis of the subcellular localization of the proteins Rep, Rep' and Cap of porcine circovirus type 1. *Virology*, 343, pp.36-46.

- GRESHAM, A., JACKSON, G., GILES, N., ALLAN, G., MCNEILLY, F. and KENNEDY, S., 2000. PMWS and porcine dermatitis nephropathy syndrome in Great Britain. *Veterinary Record*, 146, pp.143.
- GILBERT, S.A., LAROCHELLE, R., MAGAR, R., CHO, H.J. and DEREGT, D., 1997. Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses by a multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, pp.264-267.
- GRESHAM, A., ALLAN, G., MCNEILLY, F. and KENNEDY, S., 2001. Links between post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *The Pig Journal*, 47, pp.155-159.
- GRIERSON, S.S., KING, D.P., SANDVIK, T., HICKS, D., SPENCER, Y., DREW, T.W. and BANKS, M., 2004. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. *Archives of Virology*, 149, pp.1171-1183.
- GUILMOTO, H. and WESSEL-ROBERT, S., 2000. Control of PMWS in Britain: A mainly zootechnical approach. In: *Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS): A New Emerging Disease of Swine - PMWS Symposium at the International Pig Veterinary Society Congress*, pp. 45-55.
- HALBUR, P.G., 1998. Porcine respiratory disease. Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress, 15, pp.1-10.
- HAMEL, A.L., LIN, L.L. and NAYAR, G.P., 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology*, 72, pp.5262-5267.
- HAMEL, A.L., LIN, L.L., SACHVIE, C., GRUDESKI, E. and NAYAR, G.P., 2000. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 64, pp.44-52.
- HARDING, J.C., 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) preliminary epidemiology and clinical presentation. In: *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*, pp.503-504.
- HARDING, J.C. and CLARK, E.G., 1997. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Swine Health and Production*, 5, pp.201-203.
- HARDING, J.C., 1996. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: Preliminary epidemiology and clinical findings. In: *Proceedings of the Western Canadian Association of Swine Practitioners*, pp.21.
- HATTERMANN, K., SCHMITT, C., SOIKE, D. and MANKERTZ, A., 2003. Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV). *Archives of Virology*, 148, pp.2471-2480.

- HARMS, P.A., SORDEN, S.D., HALBUR, P.G., BOLIN, S.R., LAGER, K.M., MOROZOV, I. and PAUL, P.S., 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Pathology* 38, pp.528-539.
- HARMS, P., HALBUR, P., and SORDEN, S., 2002. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *Journal of Swine Health and Production*, 10, pp.27-30.
- HÉLIE, P., DROLET, R., GERMAIN, M.C. and BOURGAULT A., 1995. Systemic necrotizing vasculitis and glomerulonephritis in grower pigs in southwestern Quebec. *Canadian Veterinary Journal*, 36, 150-154.
- JEMERSIĆ, L., CVETNIĆ, Z., TOPLAK, I., SPICIĆ, S., GROM, J., BARLIC-MAGANJA, D., TERZIĆ, S., HOSTNIK, P., LOJKIĆ, M., HUMSKI, A., HABRUN, B. and KRT, B., 2004. Detection and genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from Croatia. *Research in Veterinary Science*, 77, pp.171-175.
- JOSEPHSON, G. and CHARBONNEAU, G., 2001. Case report of reproductive problems in a new startup operation. *Journal of Swine Health and Production*, 9, pp.258-259.
- KATO, A., FUJINO, M., NAKAMURA, T., ISHIHABA, A. and OTAKI, Y., 1995. Gene organization of chicken anemia virus. *Virology*, 209, pp. 480-488.
- KAWASHIMA, K., TSUNEMITSU, H., HORINO, R., KATSUDA, K., ONODERA, T., SHOJI, T., KUBO, M., HARITANI, M. and MURAKAMI, Y., 2003. Effects of dexamethasone on the pathogenesis of porcine circovirus type 2 infection in piglets. *Journal of Comparative Pathology*, 129, pp.294-302.
- KENNEDY, S., MOFFETT, D., MCNEILLY, F., MEEHAN, B., ELLIS, J., KRAKOWKA, S. and ALLAN, G.M., 2000. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, 122, pp.9-24.
- KIATIPATTANASAKUL-BANLUNARA, W., TANTILERTCHAROEN, R., SUZUKI, K., ALBARENQUE, S.M., THANAWONGNUWECH, R., NAKAYAMA, H. and DOI, K., 2002. Detection of porcine circovirus 2 (PCV-2) DNA by nested PCR from formalin-fixed tissues of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) pigs in Thailand. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64, pp.449-452.
- KIM, J., HAN, D.U., CHOI, C. and CHAE C., 2001. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 98, pp.25-31.
- KIM, J., CHUNG H., and CHAE, C., 2003. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary Journal* 166, pp.251-256.

KIM, J., HAN, D.U., CHOI, C. and CHAE, C., 2003b. Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65, pp.741-744.

KIM, J., JUNG, K. and CHAE, C., 2004. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Veterinary Record*, 155, pp.489-492.

KIM, J. and CHAE, C., 2004b. Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs. *The Veterinary Journal*, 167, pp.104-106.

KNELL, S., WILLEMS, H., HERTRAMPF, B. and REINER, G., 2005. Comparative genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 samples from German wild boar populations. *Veterinary Microbiology*, 109, pp.169-77.

KRAKOWKA, S., ELLIS, J.A., MCNEILLY, F., RINGLER, S., RINGS, D.M. and ALLAN, G., 2001. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Veterinary Pathology*, 38, pp.31-42.

KUMAR, S., TAMURA, K. and NEI, M., 2004. MEGA 3.1: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5, pp.150-163.

KYRIAKIS, S.C., SAOULIDIS, K., LEKKAS, S., MILIOTIS, CH.C., PAPOUTSIS, P.A. and KENNEDY, S., 2002. The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Comparative Pathology*, 126, pp.38-46.

LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S., NIELSEN, J., STORGAARD, T., BOTNER, A., ALLAN, G. and MCNEILLY, F., 2001. Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. *Veterinary Record*, 148, pp.759-760.

LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S., NIELSEN, J., STADEJEK, T., STORGAARD, T., KRAKOWKA, S., ELLIS, J., MCNEILLY, F., ALLAN, G. and BØTNER A., 2002. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary Microbiology*, 89, pp.97-114.

LAROCHELLE, R., BIELANSKI, A., MÜLLER, P. and MAGAR, R., 2000. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, pp.4629-4632.

LAROCHELLE, R., MAGAR, R. and D'ALLAIRE, S., 2002. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Research*, 90, pp.101-112.

LAROCHELLE, R., MAGAR, R. and D'ALLAIRE S., 2003. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 67, pp.114-20.

LIU, J., CHEN, I., and KWANG, J., 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *Journal of Virology*, 79, pp.8262-8274.

LIU, J., CHEN, I., DU, Q., CHUA, H. and KWANG, J., 2006. The ORF3 protein of porcine circovirus 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *Journal of Virology*, 80, pp.5065-5073.

LOPEZ-SORIA, S., SEGALES, J., ROSE, N., VINAS, M.J., BLANCHARD, P., MADEC, F., JESTIN, A., CASAL, J. and DOMINGO, M., 2005. An exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 69, pp.97-107.

MADEC, F., EVENO, E., MORVAN, P., et al., 2000. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in France: Clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock Production Science*, 63, pp.223-233.

MAHÉ, D., BLANCHARD, P., TRUONG, C., ARNAULD, C., LE CANN, P., CARIOLET, R., MADEC, F., ALBINA, E. and JESTIN, A., 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *Journal of General Virology*, 81, pp.1815-1824.

MALDONADO, J., SÉGALES, J., CALSAMIGLIA, M., LLOPART, D., SIBILA, M., LAPUS, Z., RIERA, P. and ARTIGAS, C., 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the Philippines: porcine circovirus type 2 (PCV2) detection and characterization. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66, pp.533-537.

MANKERTZ, A., PERSSON, F., MANKERTZ, J., BLAESS, G. and BUHK, H.J., 1997. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *Journal of Virology*, 71, pp.2562-2566.

MANKERTZ, A., DOMINGO M., FOLCH, J.M., LECANN, P., JESTIN, A., SEGALES, J., CHMIELEWICZ, B., PLANA-DURAN, J. and SOIKE, D., 2000. Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Research*, 66, pp.65-77.

MANKERTZ, A. and HILLENBRAND, B., 2001. Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. *Virology*, 279, pp.429-438.

MANKERTZ, A., MUELLER, B., STEINFELDT, T., SCHMITT, C. and FINSTERBUSCH, T., 2003. New reporter gene-based replication assay reveals

exchangeability of replication factors of porcine circovirus types 1 and 2. *Journal of Virology*, 77, pp.9885-9893.

MANKERTZ, J., BUHK, H.J., BLAESS, G. and MANKERTZ, A., 1998. Transcription analysis of porcine circovirus (PCV). *Virus Genes*, 16, pp.267-276.

MCNEILLY, F., KENNEDY, S., MOFFETT, D., MEEHAN, B.M., FOSTER, J.C., CLARKE, E.G., ELLIS, J.A., HAINES, D.M., ADAIR, B.M. and ALLAN, G.M., 1999. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Virological Methods*, 80, pp.123-128.

MEEHAN, B.M., MCNEILLY, F., TODD, D., KENNEDY, S., JEWHRST, V.A., ELLIS, J.A., HASSARD, L.E., CLARK, E.G., HAINES, D.M. and ALLAN, G.M., 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology*, 79, pp.2171-2179.

MEEHAN, B., MCNEILLY F., MCNAIR I., WALKER I., ELLIS J., KRAKOWKA S., and ALLAN G., 2001. Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Archives of Virology*, 146, pp.835-842.

MEERTS, P., MISINZO, G., LEFEBVRE, D., NIELSEN, J., BØTNER, A., KRISTENSEN, C.S. and NAUWYNCK, H.J., 2006. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Veterinary Research*, 2, pp.6.

MESU, A.P., LABARQUE, G.G., NAUWYNCK, H J. and PENZAERT, M.B., 2000. Seroprevalence of porcine circovirus types 1 and 2 in the Belgian pig population. *Veterinary Quarterly*, 22, pp.234-236.

MISINZO, G., MEERTS, P., BUBLLOT, M., MAST, J., WEINGARTL, H.M. and NAUWYNCK, H.J., 2005. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31 *Journal of General Virology*, 86, pp.2057-2068.

MISINZO, G., DELPUTTE, P.L., MEERTS, P., LEFEBVRE, D.J. and NAUWYNCK, H.J., 2006. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *Journal of Virology*, 80, pp.3487-3494.

MORI, M., SATO, K., AKACHI, S., ASAHI, S., TANIGUCHI, S. and NARITA, M., 2000. Retrospective study of porcine circovirus 2 infection in Japan: seven cases in 1989. *Veterinary Pathology*, 37, pp.667-669.

- MORILLA, A., YOON, K.J. and JIMMERMAN J.J., ed., 2002. *Trends in emerging viral diseases of swine*. Blackwell: Iowa State Press.
- MOROZOV, I., SIRINARUMITR, T., SORDEN, S.D., HALBUR, P.G., MORGAN, M.K., YOON, K.J. and PAUL, P.S., 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, pp.2535-2541.
- MOTOVSKI, A. and SEGALÉS, J., 2004. First report of PCV-2 associated diseases in Bulgaria. *Veterinary Record*, 154, pp.311-312.
- MOWAT, A.M., 1987. The regulation of immune responses to dietary protein antigens. *Immunology*, 8, pp.93-98.
- NAWAGITGUL, P., MOROZOV, I., BOLIN, S.R., HARMS, P.A., SORDEN, S.D. and PAUL, P.S., 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology*, 81, pp.2281-2287.
- NAWAGITGUL, P., HARMS, P.A., MOROZOV, I., THACKER, B.J., SORDEN, S.D., LEKCHAROENSUK, C. and PAUL, P.S., 2002. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 9, pp.33-40.
- NAYAR, G.P., HAMEL, A.L., LIN, L., SACHVIE, C., GRUDESKI, E. and SPEARMAN, G., 1999. Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. *Canadian Veterinary Journal*, 40, pp.277-278.
- NEWMAN, K.E., and NEWMAN, M.C., 2001. Evaluation of mannan oligosaccharide on the microflora and immunoglobulin status of sows and piglet performance. *Journal of Animal Science*, 79, pp.189.
- NIELSEN, J., VINCENT, I.E., BØTNER, A., LADEKAER-MIKKELSEN, A.S., ALLAN, G., SUMMERFIELD, A. and MCCULLOUGH, K.C., 2003 Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 92, pp.97-111.
- O'CONNOR, B., GAUVREAU, H., WEST, K., BOGDAN, J., AYROUD, M., CLARK, E.G., KONOBY, C., ALLAN, G. and ELLIS, J.A., 2001. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Canadian Veterinary Journal*, 42, pp.551-553.
- OHNO, N., KURACHI, K. and YADOMAE, T., 1987. Anti-tumor activity of highly branched (1→3) beta-D-glucan, SSG, obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395. *Journal of Pharmacobiodyn*, 10, pp.478-486.
- ONUKE, A., ABE, K., TOGASHI, K., KAWASHIMA, K., TANEICHI, A. and TSUNEMITSU, H., 1999. Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61, pp.1119-1123.

O'QUINN, P.R., FUNDERBURKE, D.W., and TIBETTS, G.W., 2001. Effects of dietary supplementation with mannan oligosaccharides on sow and litter performance in a commercial production system. *Journal of Animal Science*, 79, pp.212.

OPRIESSNIG, T., YU, S., GALLUP, J.M., EVANS, R.B., FENAUX, M., PALLARES, F., THACKER, E.L., BROCKUS, C.W., ACKERMANN, M.R., THOMAS, P., MENG, X.J. and HALBUR, P.G., 2003. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Veterinary Pathology*, 40, pp.521-529.

OPRIESSNIG, T., FENAUX, M., THOMAS, P., HOOGLAND, M.J., ROTHSCHILD, M.F., MENG, X.J. and HALBUR, P.G., 2006. Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2 associated disease and lesions. *Veterinary Pathology*, 43, pp. 281-293.

PARK, J.S., KIM, J., HA, Y., JUNG, K., CHOI, C., LIM, J.K., KIM, S.H., and CHAE, C., 2005. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *Journal of Comparative Pathology*, 132, pp.139-144.

PENSAERT, M.B., SANCHEZ, R.E., LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S., ALLAN, G.M. and NAUWYNCK, H.J., 2004. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Veterinary Microbiology*, 98, pp.175-183.

PHENIX, K.V., WESTON, J.H., YPELAAR, I., LAVAZZA, A., SMYTH, J.A., TODD, D., WILCOX, G.E. and RAIDAL, S.R., 2001. Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus Circovirus of the family Circoviridae. *Journal of General Virology*, 82, pp.2805-2809

POGRANICHNIY, R.M., YOON, K.J., HARMS, P.A., SORDEN, S.D. and DANIELS M., 2002. Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14, pp.449-456.

PRINGLE, C.R., 1999. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia. *Archives of Virology*, 144, pp.2065-2070.

RITCHIE, B.W., NIAGRO, F.D., LUKERT, P.D., STEFENS, W.L. and LATIMER, K.S., 1989. Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virology*, 171, pp.83-88.

QUINTANA, J., SEGALÉS, J., ROSELL, C., CALSAMIGLIA, M., RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.M., CHIANINI, F., FOLCH, J.M., MALDONADO, J., CANAL, M., PLANA-DURÁN, J. and DOMINGO, M., 2001. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Record*, 149, pp.357-361.

RESENDES, A., SEGALÉS, J., BALASCH, M., CALSAMIGLIA, M., SIBILA, M., ELLERBROK, H., MATEU, E., PLANA-DURAN, J., MANKERTZ, A. and DOMINGO, M., 2004. Lack of an effect of a commercial vaccine adjuvant on the

development of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in porcine circovirus type 2 (PCV2) experimentally infected conventional pigs. *Veterinary Research*, 35, pp.83-90.

REYNAUD, G., BESEME, S., BRUN, A., CHARREYRE, C., DESGOUILLES, S., JEANNIN, P. and REHBEIN, S., 2004 $\alpha$ . Safety of a high dose administration of an inactivated adjuvanted PCV2 vaccine in conventional gilts. In: *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress*, pp.87.

REYNAUD, G., BRUN, A., CHARREYRE, C., DESGOUILLES, S. and JEANNIN, P., 2004 $\beta$ . Safety of repeated overdose on an inactivated adjuvanted PCV2 vaccine in conventional pregnant gilts and sows. In: *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress*, pp.88.

RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.M., SEGALÉS, J., ROSELL, C., ROVIRA, A., PUJOLS, J., PLANA-DURÁN, J. and DOMINGO, M. 2003. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Disease and Veterinary Public Health*, 50, pp.99-101.

ROSE, N., LAROUB, G., LE DIGUERHER, G., EVENO, E., JOLLY, J.P., BLANCHARD, P., OGER, A., LE DIMNA, M., JESTIN, A. and MADEC, F., 2003. Risk factors for porcine multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 61, pp.209-225.

ROSELL, C., SEGALÉS, J., PLANA-DURÁN, J., BALASCH, M., RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.M., KENNEDY, S., ALLAN, G.M., MCNEILLY, F., LATIMER, K.S. and DOMINGO, M., 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *Journal of Comparative Pathology*, 120, pp.59-78.

ROSELL, C., SEGALÉS, J., RAMOS-VARA, J.A., FOLCH, J.M., RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.M., DURAN, C.O., BALASCH, M., PLANA-DURÁN, J. and DOMINGO M., 2000. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Veterinary Record*, 146, pp.40-43.

ROYER, R., NAWAGITGUL, P., PAUL, P.S. and HALBUR, P.G., 2000. Susceptibility of porcine circovirus to several commercial and laboratory disinfectants. In: *Proceeding of the American Association of Swine Practitioners*, pp 45.

SALEMI, M. and VANDAMME A.M., ed., 2003. *The phylogenetic handbook. A practical approach to DNA and protein phylogeny*. 3<sup>th</sup> ed. Cambridge University Press.

SANCHEZ, R.E., NAUWYNCK, H.J., MCNEILLY, F., ALLAN, G.M. and PENSART M.B., 2001. Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. *Veterinary Microbiology*, 83, pp.169-176.

- SAOULIDIS, K., KYRIAKIS, S.C., KENNEDY, S., LEKKAS, S., MILIOTIS, C.C., ALLAN, G., BALKAMOS, G.C. and PAPOUTSIS, P.A., 2002. First report of postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome in pigs in Greece. *Journal of Veterinary Medicine*, B 49, pp.202-205.
- SARRADELL, J., PEREZ, A.M., ANDRADA, M., RODRIGUEZ, F., FERNÁNDEZ, A. and SEGALÉS, J., 2002. PMWS in Argentina. *Veterinary Record*, 150, pp.323.
- SCHULZE, C., SEGALES, J., NEUMANN, G., HLINAK, A., CALSAMIGLIA, M. and DOMINGO, M., 2004. Identification of postweaning multisystemic wasting syndrome in European wild boar (*Sus Scrofa*). *Veterinary Record*, 154, pp.694-696.
- SEGALÉS, J., PIELLA, J., MARCO, E., MATEU-DE-ANTONIO, E.M., ESPUÑA, E. and DOMINGO, M., 1998. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Veterinary Record*, 142, pp.483-486.
- SEGALES, J., FERNANDEZ-SALGUERO, J., FRUCTUOSO, G., QUINTANA, J., ROSELL, C., POZO, J., DE ARRIBA, M., RUBIO, P. and DOMINGO, M., 2001. Granulomatous Enteritis and Lymphadenitis in Iberian pigs naturally infected with *Lawsonia intracellularis*. *Veterinary Pathology*, 38, pp. 343-346.
- SEGALES, J. and DOMINGO, M., 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *Veterinary Quarterly*, 24, pp.109-124.
- SEGALES, J., ROCELL, C., RODRIGUEZ-ARRIOJA, G. and DOMINGO, M., 2000β. Patología de la circovirus porcina. *Porci*, 56, pp.41-54.
- SEGALES, J., PASTOR, J., CUENCA, R. and DOMINGO, M., 2002γ. Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *The Veterinary Record*, 146, pp.675-676.
- SEGALÉS, J., CALSAMIGLIA, M., OLVERA, A., SIBILA, M., BADIELLA, L. and DOMINGO, M., 2005. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Microbiology*, 111, pp.223-229.
- SHIBATA, I., OKUDA, Y., YAZAWA, S., ONO, M., SASAKI, T., ITAGAKI, M., NAKAJIMA, N., OKABE, Y. and HIDEJIMA, I., 2003. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65, pp.405-408.
- SIBILA, M., CALSAMIGLIA, M., SEGALÉS, J., BLANCHARD, P., BADIELLA, L., LE DIMNA, M., JESTIN, A. and DOMINGO, M., 2004. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *American Journal of Veterinary Research*, 65, pp.88-92.

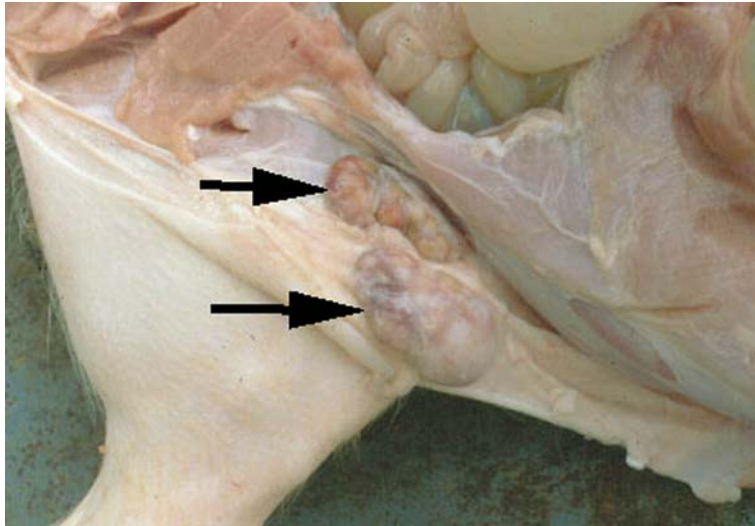
- SMITH W.J., THOMSON J.R. and DONE, S., 1993. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Veterinary Record*, 132, pp.47.
- SORDEN, S.D., 2000. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Swine Health and Production*, 8, pp.133-136.
- SPILLANE, P., KENNEDY, S., MEEHAN, B. and ALLAN, G., 1998. Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. *Veterinary Record*, 143, pp.511-512
- SPRING, P., WENK, C., DAWSON, K.A. and NEWMAN, K.E., 2000. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. *Poultry Science*, 79, pp.205-211.
- STAEBLER, S., SYDLER, T., BUERGI, E., MCCULLOUGH, K., MCNEILLY, F., ALLAN, G. and POSPISCHIL, A., 2005. PMWS: an emerging disease identified in archived porcine tissues. *Veterinary Journal*, 170, pp.132-134.
- STEINFELDT, T., FINSTERBUSCH, T. and MANKERTZ, A., 2001. Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. *Virology*, 291, pp.152-160.
- STEVENSON, G., KIUPEL, M., MITTAL, S., CHOI, J., LATIMER, K. and KANITZ, C., 2001. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13, pp.57-62.
- STOKES, C.R., MILLER, B.G., BAILEY, M., WILSON, A.D. and BOURNE, F.J., 1987. The immune response to dietary antigens and its influence on disease susceptibility in farm animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 17, pp.413-423.
- THACKER, E.L., 2001. Porcine respiratory disease complex – what is it and why does it remain a problem? *The Pig Journal*, 48, pp.66-70.
- THIBAUT, S., DROLET, R., GERMAIN, M.C., D'ALLAIRE, S., LAROCHELLE, R. and MAGAR, R., 1998. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Veterinary Pathology*, 35, pp.108-116.
- TISCHER, I., RASCH, R. and TOCHTERMANN, G., 1974. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 226, pp.153-167.
- TISCHER, I., GELDERBLUM, H., VETTERMANN, W. and KOCH, M.A., 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 295, pp.64-66.
- TISHER, I., MIELDS, W., WOLFF, D., VAGT, M. and GRIEM, W., 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Archives of Virology*, 91, pp.271-276.

- TISCHER, I., PETERS, D., RASCH, R. and POCIULI, S., 1987. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Archives of Virology*, 96, pp.39-57.
- TODD, D., WESTON, J.H., SOIKE, D. and SMYTH, J.A., 2001. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology*, 286, pp.354-362.
- TOPLAK, I., GROM, J., HOSTNIK, P. and BARLIC-MAGANJA, D., 2004. Phylogenetic analysis of type 2 porcine circoviruses identified in wild boar in Slovenia. *Veterinary Record*, 155, pp.178-180.
- TRUONG, C., MAHE, D., BLANCHARD, P., LE DIMNA, M., MADEC, F., JESTIN, A. and ALBINA, E., 2001. Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Archives of Virology*, 146, pp.1197-1211.
- VICENTE, J., SEGALES, J., HOFLE, U., BALASCH, M., PLANA-DURAN, J., DOMINGO, M. and GORTAZAR, C., 2004. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Veterinary Research*, 35, pp.243-253.
- VLEMMAS, J., BILLINIS, C., PSYCHAS, V., PAPAIOANNOU, N., PASCHALERI-PAPADOPOULOU, E., LEONTIDES, S. and PAPADOPOULOS, O., 2000. Immunohistochemical detection of encephalomyocarditis virus (EMCV) antigen in the heart of experimentally infected piglets. *Journal of Comparative Pathology*, 122, pp.235-240.
- WALKER, I.W., KONOBY, C.A., JEWURST, V.A., MCNAIR, I., MCNEILLY, F., MEEHAN, B.M., COTTRELL, T.S., ELLIS, J.A. and ALLAN, G.M., 2000. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12, pp.400-405.
- WALLGREN, P., HASSLUNG, F., BERGSTRÖM, G., LINDER, A., BELAK, K., HÅRD AF SEGERSTAD, C., STAMPE, M., MOLANDER, B., BJÖRNBERG KALLAY, T., NÖRREGÅRD, E., EHLORSSON, C.J., TÖRNQUIST, M., FOSSUM, C., ALLAN, G.M. and ROBERTSSON, J.A., 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome--PMWS the first year with the disease in Sweden. *Veterinary Quarterly*, 26, pp.170-187.
- WATTRANG, E., MCNEILLY, F., ALLAN, G., GREKO, C., FOSSUM, C. and WALLGREN, P., 2002. Exudative epidermitis and porcine circovirus-2 infection in a Swedish SPF-herd. *Veterinary Microbiology*, 86, pp.281-293.
- WELLENBERG, G., PESCH, S., BERNDSEN, F., STEVERINK, P., HUNNEMAN, W., VAN DER VORST, T., PEPPERKAMP, N., OHLINGER, V., SCHIPPERS, R., VAN OIRSCHOT, J. and DE JONG, M., 2000. Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in The Netherlands. *Veterinary Quarterly*, 22, pp.167-172.

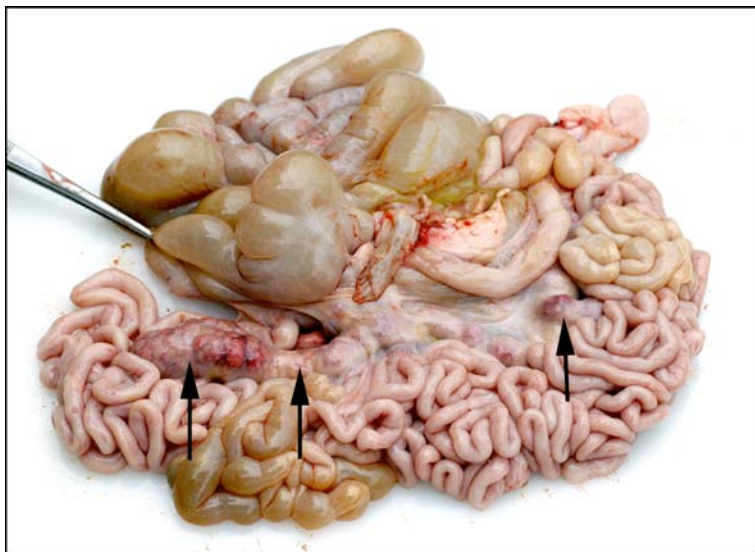
WEN, L., GUO, X. and YANG, H., 2005. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. *Veterinary Microbiology*, 110, pp.141-146.

WEST, K.H., BYSTROM, J.M., WOJNAROWICZ, C., SHANTZ, N., JACOBSON, M., ALLAN, G.M., HAINES, D.M., CLARK, E.G., KRAKOWKA, S., MCNEILLY, F., KONOBY, C., MARTIN, K. and ELLIS, J.A., 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, pp.530-532.

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι**



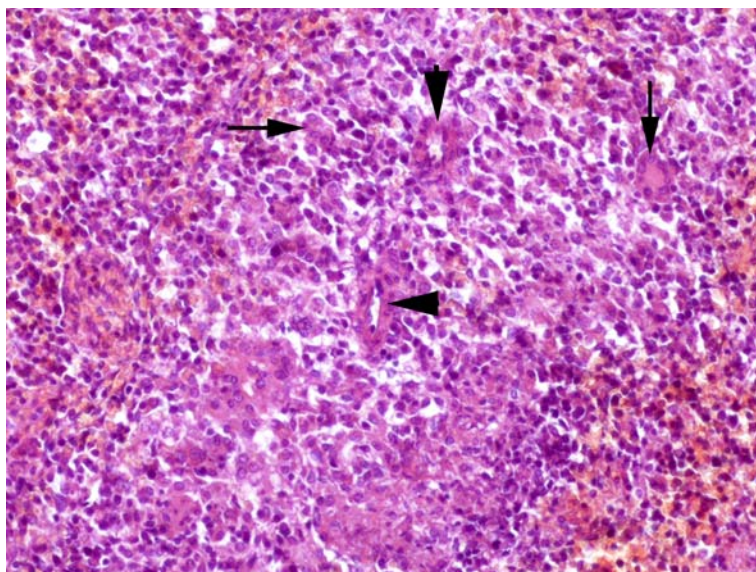
Εικ. 1. Χοίρος, ηλικίας 55 ημερών, φυσικά προσβλημένος από κυκλοϊό 2 (ΠΣΑΑΧ). Τα βουβονικά λεμφογάγγλια (βέλη) είναι έντονα διογκωμένα, ενώ δεν παρατηρείται υπεραιμία.



Εικ. 2. Έντερα χοίρου, ηλικίας 2 μηνών, φυσικά προσβλημένου από κυκλοϊό 2 (ΠΣΑΑΧ). Παρατηρείται έντονη διόγκωση των μεσεντέριων λεμφογαγγλίων (βέλη). Διαπιστώνεται, επίσης, υπεραιμία των λεμφογαγγλίων κατά εστίες. Το έντερο δεν εμφανίζει αξιόλογες αλλοιώσεις.



Εικ. 3. Πνεύμονες χοίρου, ηλικίας 55 ημερών, φυσικά προσβλημένου από κυκλοϊό 2 (ΠΣΑΑΧ). Οι πνεύμονες είναι διογκωμένοι στο σύνολό τους. Χαρακτηριστική είναι η ποικιλοχρωμία που παρουσιάζουν, ενώ κατά την ψηλάφηση ήταν ελαστικής σύστασης.



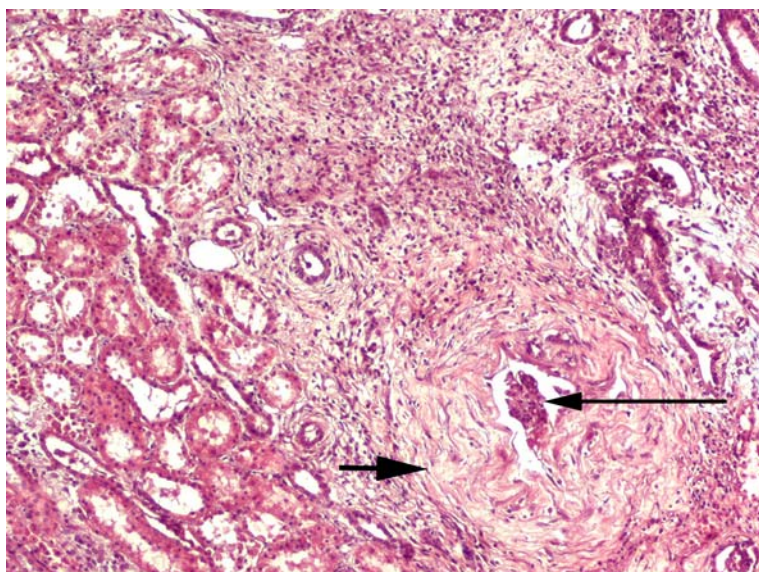
Εικ. 4. Ιστολογική τομή σπλήνα χοίρου, ηλικίας 55 ημερών, φυσικά προσβλημένου από κυκλοϊό 2 (ΠΣΑΑΧ). Διαπιστώνεται αξιοσημείωτη αραιώση των λεμφοκυττάρων των λεμφοζιδίων, παρουσία επιθηλιοειδών κυττάρων και σχηματισμός γιγαντοκυττάρων (βέλη), ενώ τα αρτηρίδια καθίστανται εμφανή (κεφαλές βελών), Αιματοξυλίνη – εωσίνη Χ40.



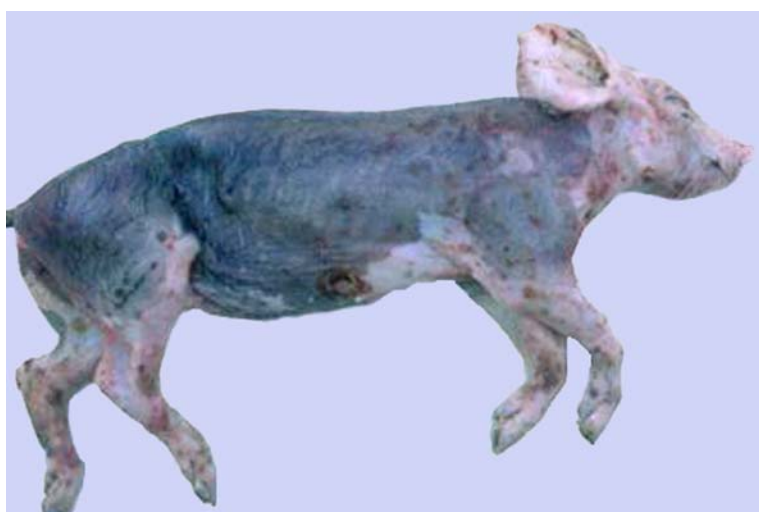
Εικ. 5. Χοίρος, ηλικίας 75 ημερών, φυσικά προσβλημένος από κυκλοϊό 2 (ΣΔΝΧ). Στο δέρμα του κορμού και ιδιαίτερα στην περινεϊκή χώρα παρατηρούνται κηλίδες ερυθρού, ερυθροϊώδους ή ιώδους χρώματος, οι οποίες κατά εστίες τείνουν να συνενωθούν.



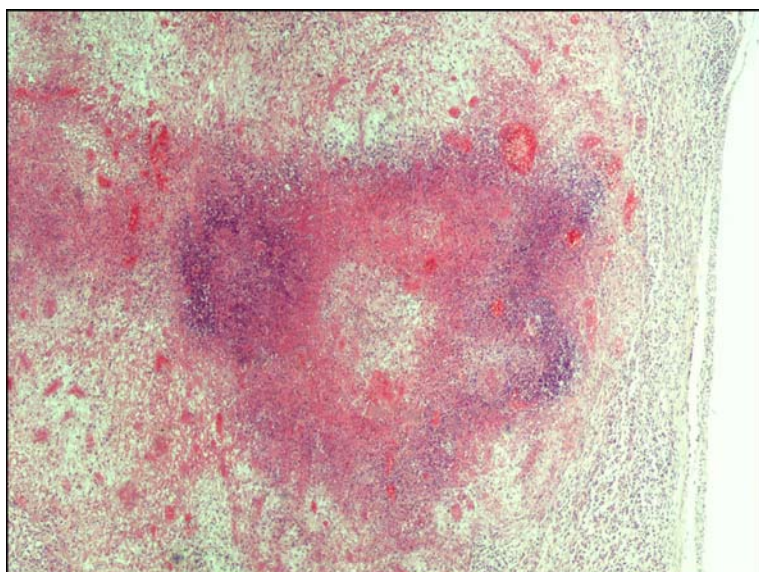
Εικ. 6. Νεφρός χοίρου, ηλικίας 75 ημερών, φυσικά προσβλημένου από κυκλοϊό 2 (ΣΔΝΧ). Παρατηρείται έντονη διόγκωση του νεφρού (μήκος περίπου 15 cm). Στην επιφάνειά του διακρίνονται πολυάριθμες υπόλευκες εστίες, προφανώς λόγω φλεγμονής των αγγειωδών σπειραμάτων του νεφρού.



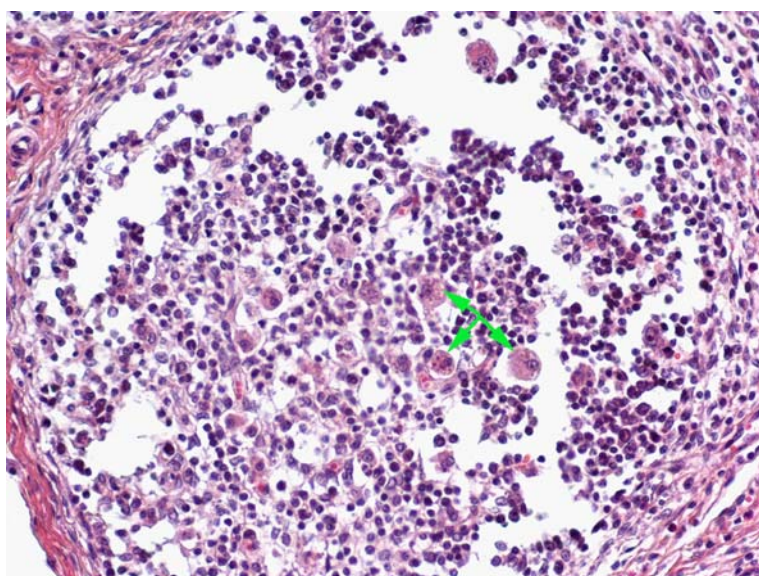
Εικ. 7. Ιστολογική τομή νεφρού χοίρου, ηλικίας 75 ημερών, φυσικά προσβλημένου από κυκλοϊό 2 (ΣΔΝΧ). Διαπιστώνεται παρουσία διάμεσης νεφρίτιδας και σπειραματονεφρίτιδας. Στο άνω μέρος της εικόνας παρατηρείται διήθηση του διάμεσου ιστού από μονοπύρρηνα κύτταρα, ενώ στο κάτω μέρος διαπιστώνεται έντονη πάχυνση του ελύτρου του Bowman (μικρό βέλος) και συρρίκνωση – ατροφία του αγγειώδους σπειράματος, Αιματοξυλίνη – εωσίνη X40.



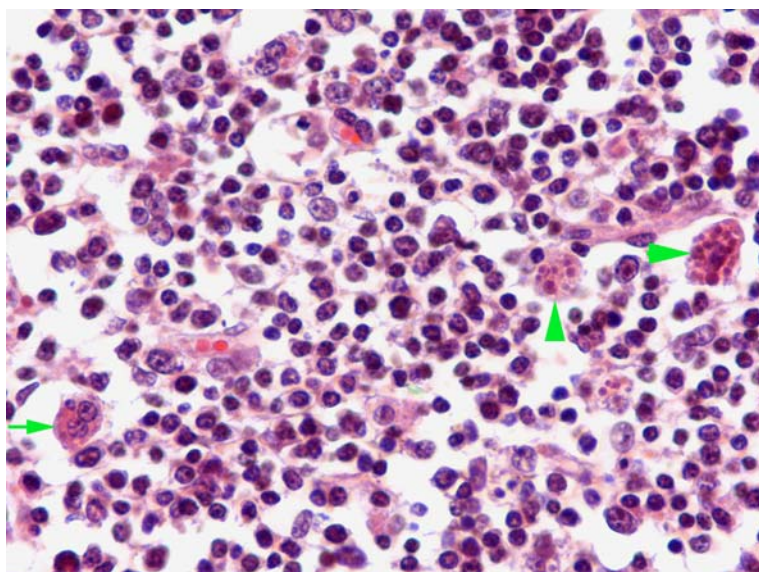
Εικ. 8. Χοίρος, ηλικίας 56 ημερών, φυσικά προσβλημένος από κυκλοϊό 2 (Εξιδρωματική επιδερμίτιδα). Όλη σχεδόν η επιφάνεια του δέρματος καλύπτεται από ερυθρομελανές ή καστανομέλανες κρούστες.



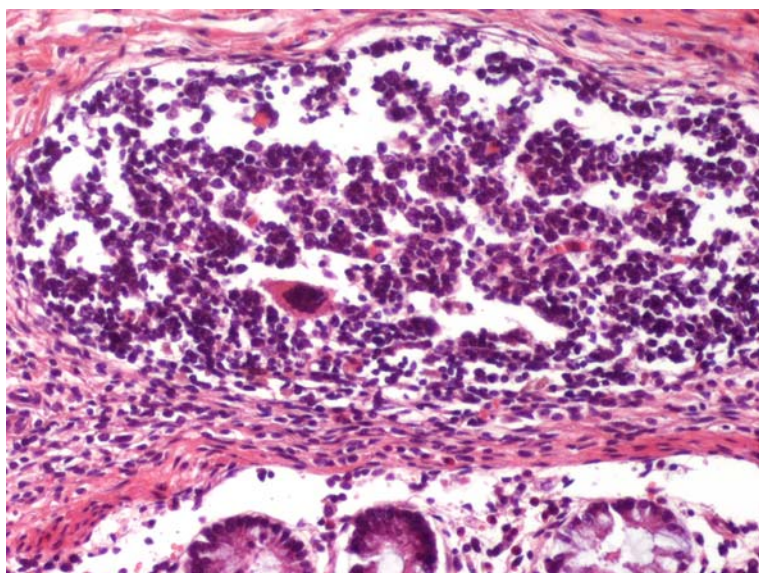
Εικ. 9. Ιστολογική τομή λεμφογαγγλίου χοίρου, ηλικίας 49 ημερών, φυσικά προσβλημένου από κυκλοϊό 2 (νεκρωτική λεμφαδενίτιδα). Εκτεταμένη εστιακή νέκρωση του λεμφογαγγλίου, Αιματοξυλίνη – εωσίνη X10.



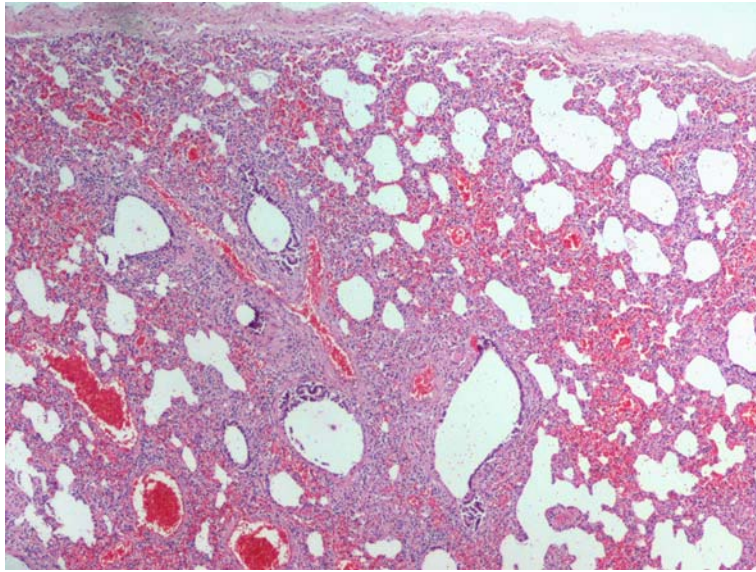
Εικ. 10. Ιστολογική τομή λεπτού εντέρου χοίρου, ηλικίας 42 ημερών, φυσικά προσβλημένου από κυκλοϊό 2 (κοκκιοματώδης εντερίτιδα). Στην τομή παρουσιάζεται λεμφικός ιστός πλάκας του Peyer. Παρατηρείται αραίωση των λεμφοκυττάρων και επιθηλιοειδή κύτταρα (βέλη), μέσα στα οποία διαπιστώνονται έγκλειστα του ιού, Αιματοξυλίνη – εωσίνη X20.



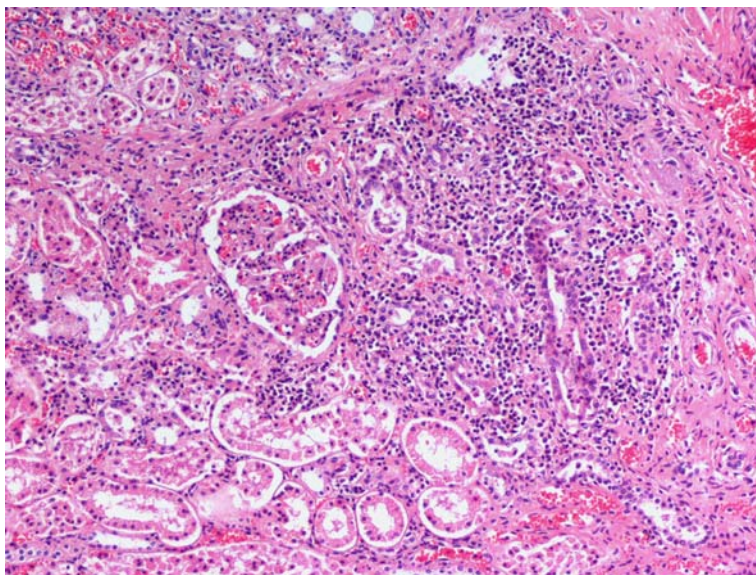
Εικ. 11. Ιστολογική τομή λεπτού εντέρου χοίρου, ηλικίας 42 ημερών, φυσικά προσβλημένου από κυκλοϊό 2 (κοκκιωματώδης εντερίτιδα). Στην τομή παρουσιάζεται λεμφικός ιστός πλάκας του Peyer. Παρατηρείται αραίωση των λεμφοκυττάρων και διήθηση από επιθηλιοειδή κύτταρα (κεφαλές βελών) και γιγαντοκύτταρα (βέλη), μέσα στα οποία διαπιστώνονται αμφίφιλα έγκλειστα του ιού, Αιματοξυλίνη – εωσίνη X40.



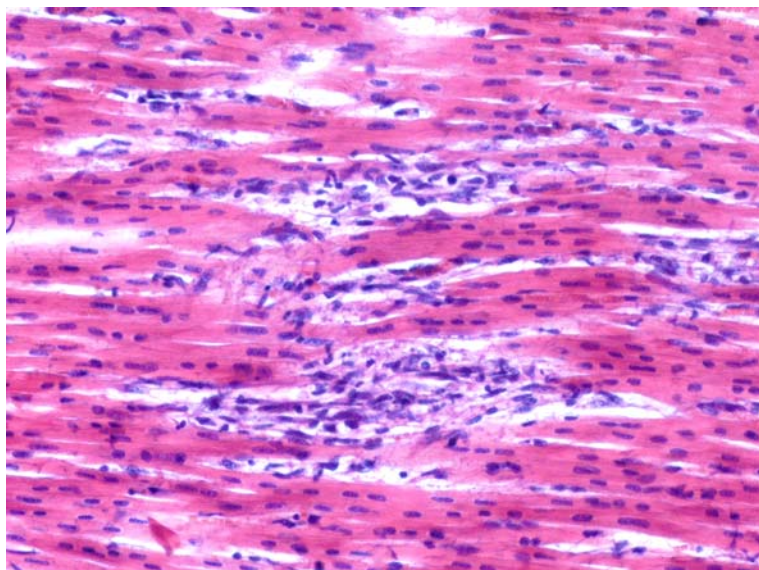
Εικ. 12. Ιστολογική τομή λεπτού εντέρου αγριόχοιρου, ηλικίας μικρότερης των 6 μηνών, φυσικά προσβλημένου από κυκλοϊό 2 (ΠΣΑΑΧ). Στην τομή παρουσιάζεται λεμφικός ιστός πλάκας του Peyer. Παρατηρείται αραίωση των λεμφοκυττάρων και διήθηση από επιθηλιοειδή κύτταρα , καθώς και γιγαντοκύτταρο (βέλος), Αιματοξυλίνη – εωσίνη X20



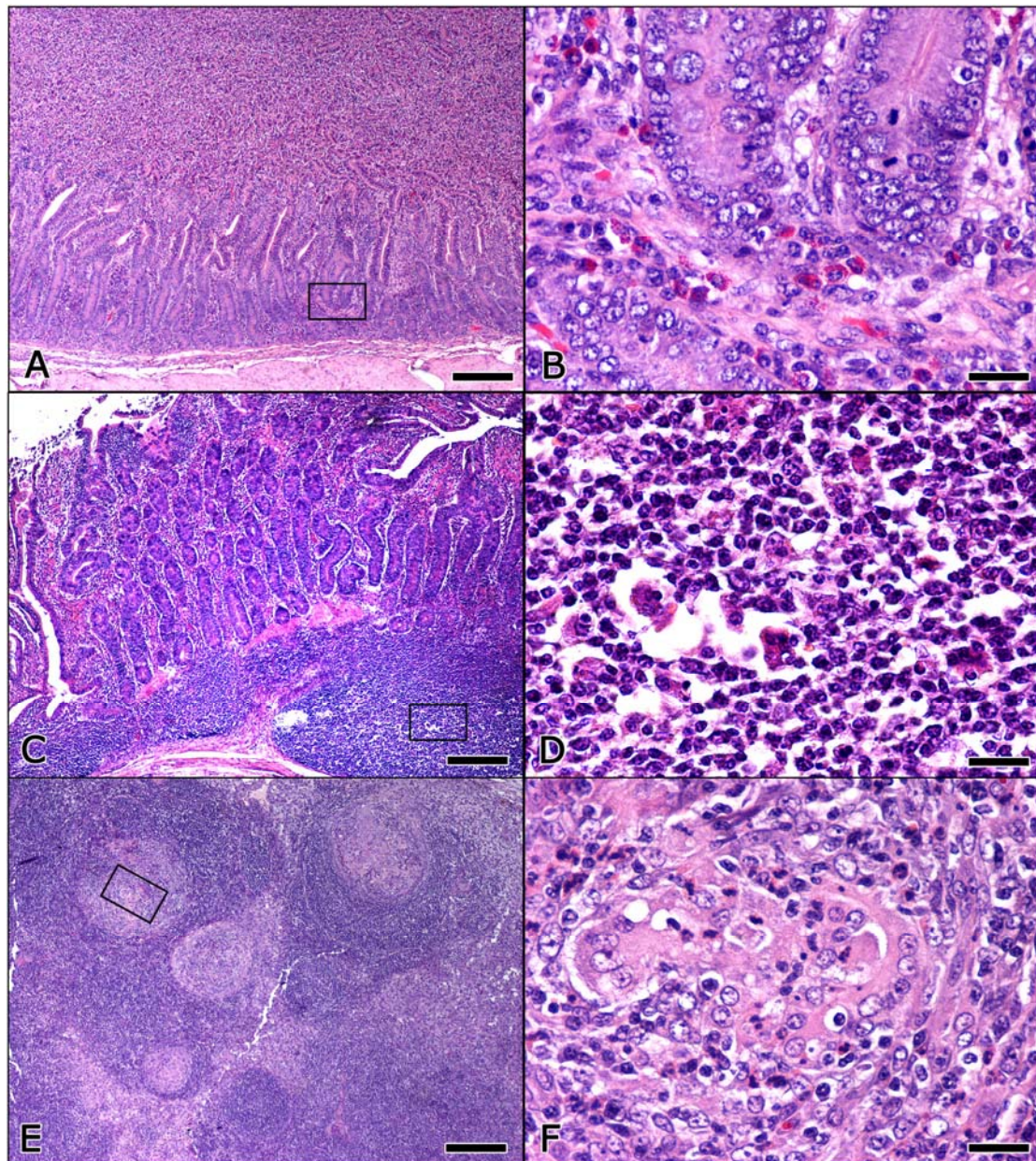
Εικ. 13. Ιστολογική τομή πεύμονα αγριόχοιρου, ηλικίας μικρότερης των 6 μηνών, φυσικά προσβλημένου από κυκλοϊό 2 (ΠΣΑΑΧ). Πολυεστιακή έως διάχυτη διάμεση πνευμονία, συνοδευόμενη από υπεραιμία και οίδημα, Αιματοξυλίνη – εωσίνη X4.



Εικ. 14. Ιστολογική τομή νεφρού αγριόχοιρου, ηλικίας μικρότερης των 6 μηνών, φυσικά προσβλημένου από κυκλοϊό 2 (ΠΣΑΑΧ). Πολυεστιακή έως διάχυτη, υποξείας μορφής διάμεση νεφρίτιδα, Αιματοξυλίνη – εωσίνη X10.



Εικ. 15. Ιστολογική τομή μυοκαρδίου αγριόχοιρου, ηλικίας μικρότερης των 6 μηνών, φυσικά προσβλημένου από κυκλοϊό 2 (ΠΣΑΑΧ). Πολυεστιακή, μη πυώδης διάμεση μυοκαρδίτιδα, Αιματοξυλίνη – εωσίνη X20.



Εικόνα 16. Χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στα πειραματόζωα που μολύνθηκαν με τον κυκλοϊό 2. Α και Β: νήστιδα, C και D: ειλεός, Ε και F: τραχηλικό λεμφογάγγλιο. Οι εικόνες Β, Ε και F παρουσιάζουν σε μεγαλύτερη μεγέθυνση τα πεδία που περιέχονται στα παραλληλόγραμμα σχήματα των εικόνων Α, C και D αντίστοιχα.

(Α) Νεκρωτική εντερίτιδα. Πηκτική νέκρωση του επιθηλίου της επιφάνειας και απώλεια του μεγαλύτερου τμήματος των λαχνών. Οι υπερπλαστικές κρύπτες παρουσιάζονται με αυξημένο ύψος και διακλαδώσεις .

(Β) Υπερπλασία του επιθηλίου των κρυπτών και συνάθροιση φλεγμονικών κυττάρων στο χόριο του βλεννογόνου. Αναγνωρίζονται λεμφοκύτταρα, πλασμοκύτταρα, μακροφάγα, αλλά και μεγάλος αριθμός σφαιριδιολευκοκυττάρων.

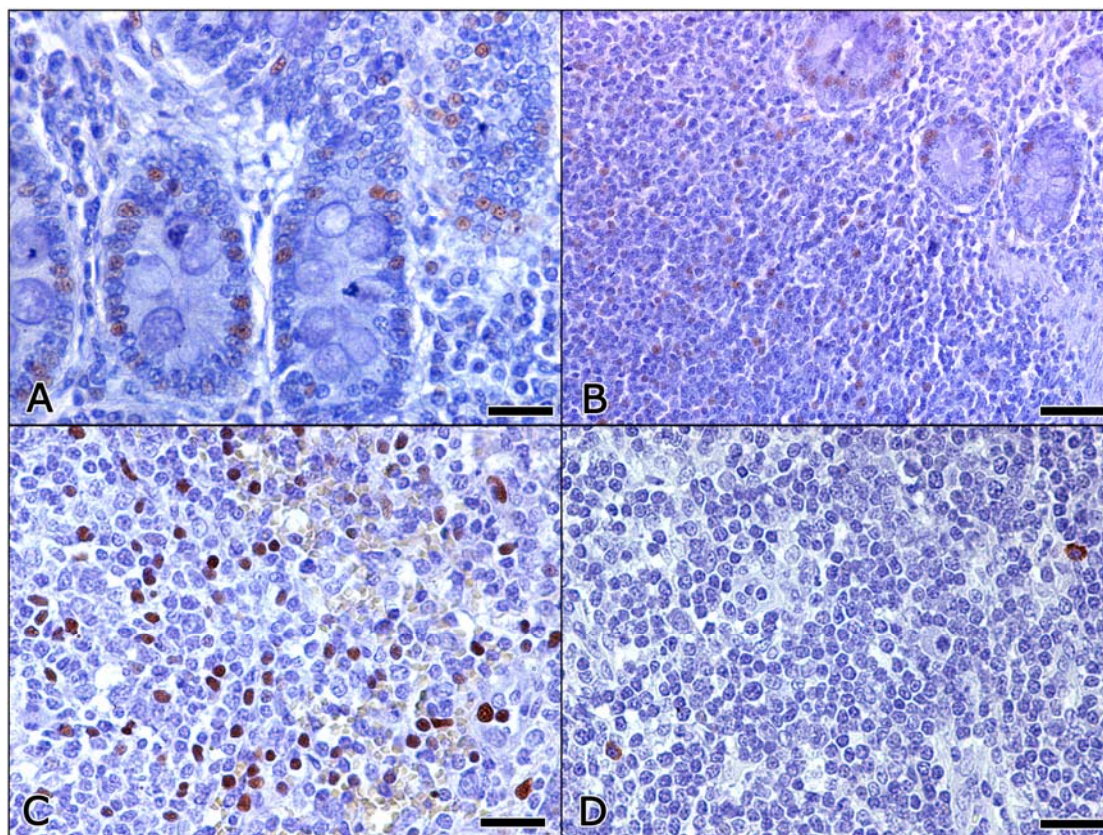
(C) Απώλεια των λαχνών, υπερπλασία των κρυπτών και συνάθροιση μεγάλου αριθμού φλεγμονικών κυττάρων στο χόριο. Η νέκρωση του επιθηλίου της επιφάνειας και η αποφολίδωση επιθηλιακών κυττάρων και ολόκληρων τμημάτων του επιθηλίου οδηγεί στο σχηματισμό διαβρώσεων. Ο λεμφικός ιστός στις πλάκες του Peyer εμφανίζει εστιακά μικρού βαθμού αραίωση.

(D) Περιοχή αραίωσης του λεμφικού ιστού με παρουσία γιγαντοκυττάρων και μακροφάγων. Τα τελευταία φέρουν στο κυτόπλάσμα τους ράκη, τα οποία πιθανότατα αποτελούν κατακερματισμένα τμήματα πυρήνων νεκρών λεμφοκυττάρων που φαγοκυτταρώθηκαν.

(E) Εστίες κοκκιωματώδους φλεγμονής στα βλαστικά κέντρα των λεμφοζιδίων.

(F) Απώλεια του φυσιολογικού ιστού του λεμφοζιδίου, εξαιτίας κοκκιωματώδους φλεγμονής που χαρακτηρίζεται από την παρουσία επιθηλιοειδών μακροφάγων και γιγαντοκυττάρων. Παρατηρούνται επίσης και ουδετερόφιλα.

Χρώση αιματοξυλίνης και εωσίνης. Bars: (A, C και E)= 250  $\mu\text{m}$ , (B, D και F)= 25  $\mu\text{m}$ .



Εικόνα 17. Σήμανση των αντιγόνων του κυκλοϊού 2 με ανοσοϊστοχημική μέθοδο. Α: νήστιδα, Β: ειλεός, C και D: τραχειοβρογχικό λεμφογάγγλιο.

Τα αντιγόνα του ιού εντοπίζονταν κυρίως στους πυρήνες των κυττάρων του επιθηλίου των αδένων στο λεπτό έντερο (Α και Β) και στους πυρήνες των λεμφοκυττάρων στις πλάκες του Peyer (Β) και στα λεμφογάγγλια (C). Ωστόσο, στο λεμφικό ιστό αντιγόνα του κυκλοϊού 2 ανιχνεύτηκαν όχι μόνο στα λεμφοκύτταρα, αλλά επιπλέον και σε πυρήνες κυττάρων των οποίων η μορφολογία δεν ήταν συμβατή με αυτή των λεμφοκυττάρων (C). Τα τελευταία πιθανά ήταν δικτυωτά (αστεροειδή) κύτταρα ή δενδριτικά κύτταρα. Σπανιότερα, αντιγόνα του ιού εντοπίστηκαν στο κυτόπλασμα μακροφάγων (D).

Χρώση αιματοξυλίνης και εωσίνης. Bars: (A, C και D)= 25  $\mu\text{m}$ , (B)= 50  $\mu\text{m}$ .

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ**

Πίνακας 1. Σχεδιασμός πειραματικής μελέτης

<b>Πειραματικές ομάδες</b>	<b>Αριθμός χοίρων</b>	<b>Μόλυνση<sup>1</sup></b>	<b>Δόση<sup>2</sup></b>	<b>Διατροφή<sup>3</sup></b>
I	4	+	Χαμηλή	Κανονική
II	4	+	Χαμηλή	Ανοσοενισχυτικό
III	4	+	Υψηλή	Κανονική
IV	4	+	Υψηλή	Ανοσοενισχυτικό
V	2	-	-	Κανονική
VI	2	-	-	Ανοσοενισχυτικό

<sup>1</sup>Μόλυνση: + = χοιρίδια μολυσμένα με κυκλοϊό 2, - = χοιρίδια που έλαβαν MEM

<sup>2</sup>Δόση: Χαμηλή = 2 ml of  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml, Υψηλή = 2 ml of  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml

<sup>3</sup>Διατροφή: Κανονική = διατροφή χωρίς την προσθήκη αυξητικών παραγόντων, Ανοσοενισχυτικό= διατροφή με την προσθήκη ανοσοενισχυτικής ουσίας

Πίνακας 2. Καταγραφή της σύστασης των κοπράνων στα μολυσμένα χοιρίδια και τους μάρτυρες ανά ημέρα δειγματοληψίας.

Ημέρα	Πειραματικές ομάδες																			
	Ομάδα I				Ομάδα II				Ομάδα III				Ομάδα IV				Ομάδα V		Ομάδα VI	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
4	2	3	2	3	4	2	1	4	4	4	4	4	2	2	2	1	1	2	1	2
7	2	3	3	3	4	3	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
14	2	2	2	2	3	1	2	3	3	3	3	3	2	2	2	1	2	2	2	2
21	2	2	1	3	2	3	2	3	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2
28	2	2	2	3	3	2	3	3	3	3	2	3	2	3	3	2	2	2	2	2
35	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	3	3	2	1	1	2	2	2	2	2
42	*	2	*	3	*	*	2	2	*	*	2	3	*	*	2	1	*	2	2	*
51	*	2	*	2	*	*	2	2	*	*	2	2	*	*	2	2	*	2	2	*
54	*	2	*	2	*	*	2	2	*	*	2	2	*	*	2	2	*	2	2	*

Με \* είναι οι μετρήσεις που δεν έγιναν λόγω της θανάτωσης των χοίρων την 35<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής μελέτης

Πίνακας 3. Ανίχνευση ανοσοσφαιρινών Μ και G ανά ημέρα δειγματοληψίας στα χοιρίδια που μολύνθηκαν με κυκλοϊό 2.

Ημέρα	Αντισώματα IgM / IgG															
	Ομάδα I				Ομάδα II				Ομάδα III				Ομάδα IV			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
-3	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
0	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
4	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
7	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
14	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-
21	+/+	-/-	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	+/-	+/+	+/+	+/-	+/+
28	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+
35	+/+	+/-	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+
42	*	+/+	*	+/+	*	*	-/+	-/+	*	*	-/+	+/+	*	*	-/+	-/+
51	*	+/+	*	+/+	*	*	-/+	-/+	*	*	-/+	-/+	*	*	-/+	-/+
54	*	-/+	*	-/+	*	*	-/+	-/+	*	*	-/+	-/+	*	*	-/+	-/+

Με \* είναι οι μετρήσεις που δεν έγιναν λόγω της θανάτωσης των χοίρων την 35<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής μελέτης

Πίνακας 4. Ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 2 ανά ημέρα δειγματοληψίας στο πλάσμα του αίματος των χοιριδίων που μολύνθηκαν με κυκλοϊό 2.

Ημέρα	Πειραματικές ομάδες															
	Ομάδα I				Ομάδα II				Ομάδα III				Ομάδα IV			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42	*	+	*	+	*	*	+	+	*	*	+	+	*	*	+	+
51	*	-	*	-	*	*	+	+	*	*	+	+	*	*	+	+
54	*	-	*	-	*	*	+	+	*	*	+	+	*	*	+	+

Με \* είναι οι μετρήσεις που δεν έγιναν λόγω της θανάτωσης των χοίρων την 35<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής μελέτης

Πίνακας 5. Ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 2 ανά ημέρα δειγματοληψίας στο ρινικό έκκριμα των χοιριδίων που μολύνθηκαν με κυκλοϊό 2.

Ημέρα	Πειραματικές ομάδες															
	Ομάδα I				Ομάδα II				Ομάδα III				Ομάδα IV			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
21	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
35	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
42	*	-	*	-	*	*	-	+	*	*	-	-	*	*	-	-
51	*	-	*	-	*	*	-	-	*	*	-	-	*	*	-	-
54	*	-	*	-	*	*	-	-	*	*	-	-	*	*	-	-

Με \* είναι οι μετρήσεις που δεν έγιναν λόγω της θανάτωσης των χοίρων την 35<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής μελέτης

Πίνακας 6. Ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 2 ανά ημέρα δειγματοληψίας στα κόπρανα των χοιριδίων που μολύνθηκαν με κυκλοϊό 2

Ημέρα	Πειραματικές ομάδες															
	Ομάδα I				Ομάδα II				Ομάδα III				Ομάδα IV			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
7	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
14	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
21	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
42	*	+	*	+	*	*	+	+	*	*	+	+	*	*	-	-
51	*	+	*	+	*	*	-	+	*	*	+	-	*	*	-	-
54	*	+	*	+	*	*	-	+	*	*	+	-	*	*	-	-

Με \* είναι οι μετρήσεις που δεν έγιναν λόγω της θανάτωσης των χοίρων την 35<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής μελέτης

Πίνακας 7. Ανίχνευση DNA του κυκλοϊού 2 σε διάφορα όργανα στα χοιρίδια που μολύνθηκαν με κυκλοϊό 2

Όργανα	Πειραματικές ομάδες															
	Ομάδα I				Ομάδα II				Ομάδα III				Ομάδα IV			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	16	17	18
Θύμος	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Αμυγδαλές	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Σιελογόνοι	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Υπογνάθια	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Βρογχικά	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Μεσεντέρια	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Βουβονικά	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Πάγκρεας	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Σπλήνας	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Στόμαχος	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
Πυλωρός	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Νήστιδα	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Είλεός	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Καρδιά	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Πνεύμονες	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Ήπαρ	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Μυελός οστών	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Νεφροί	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
Επινεφρίδια	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Δέρμα	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Μύες	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Πίνακας 8. Μακροσκοπικές αλλοιώσεις στα χοιρίδια που μολύνθηκαν με κυκλοϊό 2

Μακροσκοπικές αλλοιώσεις	Πειραματικές Ομάδες															
	Ομάδα I				Ομάδα II				Ομάδα III				Ομάδα IV			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Διόγκωση λεμφογαγγλίων	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Διόγκωση των πλακών του peyer	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
Γαστρίτιδα	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Φλεγμονή νήστιδας	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ειλεΐτιδα	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Πνευμονικό οίδημα	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Αλλοιώσεις στους νεφρούς	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Αλλοιώσεις στο δέρμα	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Αυξημένο περικαρδιακό υγρό	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Ασκίτης	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+

Πίνακας 9. Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στα χοιρίδια που μολύνθηκαν με κυκλοϊό 2

Όργανα	Πειραματικές Ομάδες															
	Ομάδα I				Ομάδα II				Ομάδα III				Ομάδα IV			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<b>Νέκρωση</b>																
Υπογνάθια λ/γ	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	2	1	2	1	3
Βρογχικά λ/γ	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1
Μεσεντέρια λ/γ	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	0	1	1
Βουβωνικά λ/γ	1	0	1	1	1	1	3	0	1	1	1	1	2	2	2	2
Νήστιδα	2	4	2	2	4	3	3	1	4	3	3	4	3	2	4	4
Ειλεός	1	0	2	3	1	1	4	3	1	1	3	3	1	2	4	4
<b>Φλεγμονή</b>																
Νήστιδα	3	2	2	3	3	3	4	1	4	3	2	3	4	3	4	4
Ειλεός	3	3	3	4	2	2	4	3	4	3	4	4	4	4	4	4

Στον πίνακα η ένταση των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων συμβολίζεται ως εξής: 0 = απουσία αλλοιώσεων, 1 = ολιγάριθμες αλλοιώσεις, 2 = ελαφρού βαθμού αλλοιώσεις, 3 = μετρίου βαθμού αλλοιώσεις, 4 = εντόνου βαθμού αλλοιώσεις

Πίνακας 10. Ανίχνευση αντιγόνου του κυκλοϊού 2 σε διάφορα όργανα στα χοιρίδια που μολύνθηκαν με κυκλοϊό 2

Όργανα	Πειραματικές ομάδες															
	Ομάδα I				Ομάδα II				Ομάδα III				Ομάδα IV			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Υπογνάθια λ/γ	1	1	ΜΔ	ΜΔ	3	1	3	1	0	1	0	1	0	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ
Βρογχικά λ/γ	ΜΔ	0	1	4	1	0	3	1	1	1	0	1	1	1	2	1
Μεσεντέρια λ/γ	1	1	0	0	2	1	3	1	1	2	1	0	2	1	3	1
Βουβονικά λ/γ	1	1	0	0	1	1	ΜΔ	2	0	1	0	3	2	1	2	1
Νήστιδα επιθηλιακά κύτταρα	1	1	1	1	1	3	1	0	3	1	2	4	2	1	1	1
Νήστιδα μη επιθηλιακά κύτταρα	2	1	1	1	1	3	1	0	3	1	1	3	2	1	1	1
Ειλεός επιθηλιακά κύτταρα	1	2	ΜΔ	ΜΔ	2	1	1	0	4	0	1	1	2	1	ΜΔ	0
Ειλεός μη επιθηλιακά κύτταρα	1	1	ΜΔ	ΜΔ	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	ΜΔ	0

Η παρουσία των κυττάρων που έφεραν αντιγόνο του ιού συμβολίζεται ως εξής: 0 = απουσία αντιγόνου, 1 = 1-5 κύτταρα έφεραν το αντιγόνο του ιού, 2 = 5-10 κύτταρα έφεραν το αντιγόνο του ιού, 3 = 10-15 κύτταρα έφεραν το αντιγόνο του ιού, 4 = πάνω από 15 κύτταρα έφεραν το αντιγόνο του ιού. Το σύμβολο ΜΔ = μη διαθέσιμες τομές ιστών .

