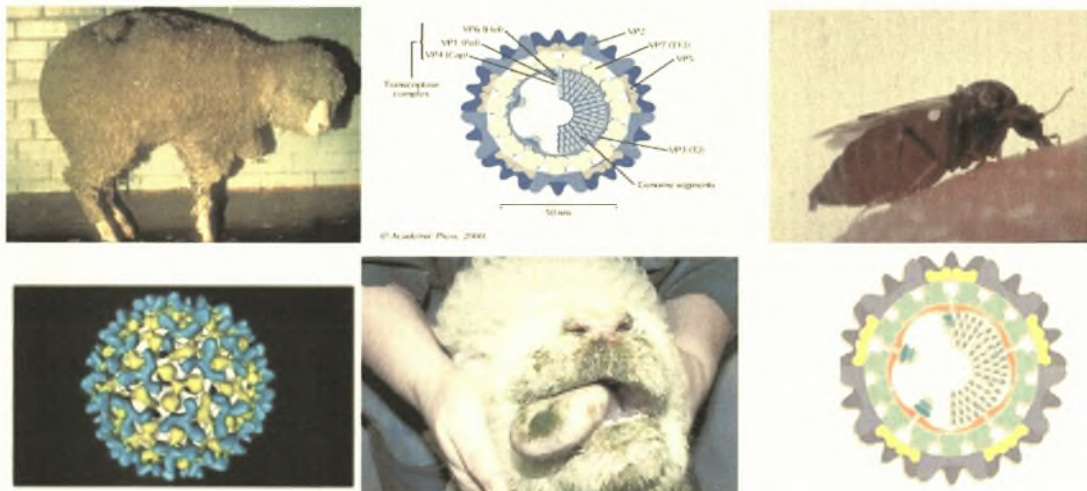


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΞΗΡΟΓΙΑΝΝΗ ΑΘΑΝΑΣΙΑ

ΤΑΧΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΤΑΡΡΟΪΚΟΥ ΠΥΡΕΤΟΥ ΜΕ  
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)



Επιβλέπων καθηγητής Π. Μαρκουλάτος

ΛΑΡΙΣΑ 2005



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 4649/1  
Ημερ. Εισ.: 10-03-2006  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2005  
ΞΗΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087831

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ:** ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-  
ΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ:** ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ  
ΖΩΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Κ. ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ:** ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ  
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με το τμήμα Ιολογίας του Ινστιτούτου Λοιμωδών και Παρασιτικών Νοσημάτων (ΙΛΟΙΠΑΝ) του Κέντρου Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Αθηνών (ΚΚΙΑ), από το Μάρτιο ως τον Ιούλιο του 2005.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διευθύντρια του ΙΛΟΙΠΑΝ κα Όλγα Μαγγανά για την άδεια πραγματοποίησης μέρους της εργασίας στο τμήμα Ιολογίας και την παραχώρηση στοιχείων και δειγμάτων του εργαστηρίου. Πολύ περισσότερο, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για το ιδιαίτερο ενδιαφέρον της σε θέματα σχετικά με την εργασία και την ολοκλήρωση αυτής, καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κτηνίατρο κα Κυριακή Νομικού, για τη βοήθειά της, την απαραίτητη συμβολή της στην ολοκλήρωση της εργασίας και την άφογη και εποικοδομητική συνεργασία μας.

Ευχαριστώ θερμά το προσωπικό του τμήματος Ιολογίας για τη συνεργασία μας και την ιδιαίτερα φιλική ατμόσφαιρα στο χώρο του εργαστηρίου.

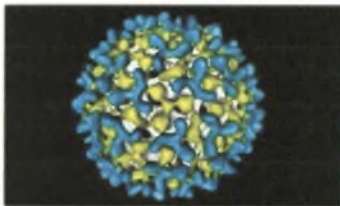
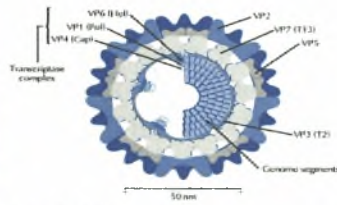
Πολλές ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα κα Χριστίνα Κοτταρίδη με την οποία είχαμε στενή συνεργασία σε κλίμα ιδιαίτερος φιλικό, για την πολύτιμη καθοδήγηση της κατά την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους, το αληθινό ενδιαφέρον, την κατανόηση και την υπομονή της. Η εμπειρία της και οι συμβουλές τις ήταν για μένα απαραίτητες.

Και φυσικά, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο που ήταν υπεύθυνος για την επίβλεψη και τη βασική καθοδήγησή μου, γιατί με εμπιστεύθηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργασθώ μαζί του και να επεξεργαστώ το συγκεκριμένο θέμα, ενώ συγχρόνως με παρέπεμψε στους ειδικούς στο θέμα εκλεκτούς συνεργάτες του.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΞΗΡΟΓΙΑΝΝΗ ΑΘΑΝΑΣΙΑ

ΤΑΧΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΤΑΡΡΟΪΚΟΥ ΠΥΡΕΤΟΥ ΜΕ  
ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)



Επιβλέπων καθηγητής Π. Μαρκουλάτος

ΛΑΡΙΣΑ 2005



## Καταρροϊκός πυρετός του προβάτου (ή νόσος bluetongue)

Ο καταρροϊκός πυρετός ή νόσος bluetongue είναι μια ιογενής, λοιμώδης νόσος των μηρυκαστικών, που μεταδίδεται με έντομα του γένους *Culicoides*.

Προσβάλλονται όλα τα είδη των μηρυκαστικών. Η κλινική εκδήλωση της ασθένειας χαρακτηρίζεται από φλεγμονή του στοματικού βλεννογόνου και πυρετό. Η νόσος είναι βαρύτερη στα πρόβατα κάθε ηλικίας (κυρίως αυτά που ανήκουν στις ευρωπαϊκές φυλές fine wool και mutton) και μερικά είδη ελαφιού (υπεροξεία, θανατηφόρος αιμορραγική νόσος) ενώ τα βοοειδή, οι αίγες και τα άγρια μηρυκαστικά παρουσιάζουν ελαφρά συμπτώματα γι' αυτό είναι δυνατό να δρουν ως ασυμπτωματικοί φορείς του ιού [1,2].

Ο ιός αντιγράφεται αρχικά στα αιμοποιητικά όργανα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων, γρήγορα όμως διασπείρεται και σε πολλούς άλλους ιστούς του σώματος. Επίσης συνδέεται σε μεγάλο βαθμό και με τα ερυθρά αιμοσφαίρια, γεγονός που ευνοεί τη μακρόχρονη παραμονή του στον οργανισμό του ζώου και τη μετάδοση μέσω των εντόμων.

Η περίοδος επώασης είναι 5-10 ημέρες. Το στάδιο της ιαιμίας στα πρόβατα είναι σύντομο, στις αίγες και τα βοοειδή μακροχρόνιο, τουλάχιστον 1-2 μήνες. Το πρώτο



Εικόνα 1. Υπεραιμία της στοματικής κοιλότητας και των βλεννογόνων που οδηγεί σε οίδημα των χειλιών, της γλώσσας και του προσώπου.

σύμπτωμα είναι συνήθως αύξηση της θερμοκρασίας. Ακολουθεί υπεραιμία της στοματικής κοιλότητας και των βλεννογόνων που οδηγεί σε οίδημα των χειλιών, της γλώσσας και του προσώπου (Εικ.1). Παραδόξως, η κυάνωση της γλώσσας (bluetongue) απ' όπου πήρε το όνομά της η ασθένεια είναι σπάνιο φαινόμενο. Η υπεραιμία επεκτείνεται και σε άλλες περιοχές του σώματος, κυρίως τη βουβωνική χώρα και το περίνεο ενώ οι φλεγμονές που δημιουργούνται στις οπλές των ποδιών δυσκολεύουν την κίνηση του ζώου. Συχνά τα ζώα υποφέρουν από ανορεξία, ενώ είναι ακόμα δυνατό να προκληθούν

αιμορραγίες, πνευμονικό οίδημα, μυϊκές βλάβες και πτώση του μαλλιού λόγω δερματίτιδας. Τόσο στις κλινικά εκδηλωμένες, όσο και στις ασυμπτωματικές μορφές είναι δυνατό να παρατηρηθούν στα έγκυα ζώα αποβολές ή γέννηση απογόνων με ανωμαλίες [1,2]. Στα αρσενικά παρουσιάζεται παροδική μείωση της γονιμότητας και παρουσία του ιού στο σπέρμα (δυνατότητα μετάδοσης και με τη γεννητική οδό).

Η τυπική μορφή της ασθένειας έχει διάρκεια 1-4 εβδομάδες. Συχνά επέρχεται τελικά θάνατος, σε μικρό ποσοστό κατά την οξεία φάση, σε μεγαλύτερο ποσοστό έπειτα από 2-3 εβδομάδες εξαιτίας της αδυναμίας πρόσληψης τροφής και των επιπλοκών. Στα ζώα που επιζούν η ανάρρωση είναι μακροχρόνια.

Η λανθασμένη διάγνωση είναι συχνό φαινόμενο, καθώς τα συμπτώματα παραπέμπουν σε αφθώδη πυρετό, φυσαλιδώδη στοματίτιδα, λοιμώδες έκθυμα, ευλογιά, Rift valley fever,



Εικόνα 2. Εξασθενημένο πρόβατο λόγω καταρροϊκού πυρετού. Το ζώο δεν μπορεί να στηριχθεί καλά στα πόδια του και καμπουριάζει.

πανώλη των μικρών μηρυκαστικών, φωτοευαισθησία ή πνευμονία με αποτέλεσμα τη σύγχυση [1].

### Μετάδοση

Η ασθένεια μεταδίδεται με έντομα του γένους *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) (Εικ. 3). Όταν το έντομο τσιμπήσει ένα ζώο μολυσμένο με τον υπεύθυνο για την ασθένεια



Εικόνα 3. *Culicoides imicola* (1.5 mm μήκος).

ιό, που βρίσκεται σε στάδιο ιαιμίας, αρχίζει μια περίοδος επώασης στον οργανισμό του εντόμου που διαρκεί 4-20 ημέρες. Ο ιός εισάγεται στο έντερο, από εκεί περνάει στο αιμόκοιλο και καταλήγει στους σιαλογόνους αδένες. Αν το έντομο τσιμπήσει ένα δεκτικό για τον ιό ζώο, θα το μολύνει. Το ζώο θα είναι μολυσματικό για τα επόμενα έντομα που θα το τσιμπήσουν, 2-4 μέρες μετά τη μόλυνση που θα βρεθεί στο στάδιο ιαιμίας [3, 4].

Λιγότερα από 1% από τα 1400 περίπου είδη *Culicoides* εμπλέκονται με τη μετάδοση του ιού. Έτσι, η ασθένεια

περιορίζεται σε χρονικές εποχές και περιοχές όπου ζουν τα συγκεκριμένα είδη των εντόμων-φορέων και η εξάπλωσή της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό, εκτός από την ύπαρξη δεκτικών ξενιστών και από τις κλιματολογικές συνθήκες.

Τα *Culicoides*-φορείς ζευγαρώνουν σε μέρη με υγρασία (αρδευτικά κανάλια, αποχετεύσεις, κοπριά). Η υγρασία σε συνδυασμό με υψηλές θερμοκρασίες περιβάλλοντος παίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του εντόμου. Η βιωσιμότητα των ενήλικων φορέων ευνοείται από υψηλές θερμοκρασίες. Οι υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν επίσης το ρυθμό γένεσης των ικών σωματιδίων στο σώμα των εντόμων. Υπό αυτές τις προϋποθέσεις ο καταρροϊκός πυρετός εμφανίζεται το καλοκαίρι και το φθινόπωρο, εποχές με υψηλές θερμοκρασίες και βροχοπτώσεις αντίστοιχα, οπότε και ευνοείται η βιωσιμότητα των φορέων [4].

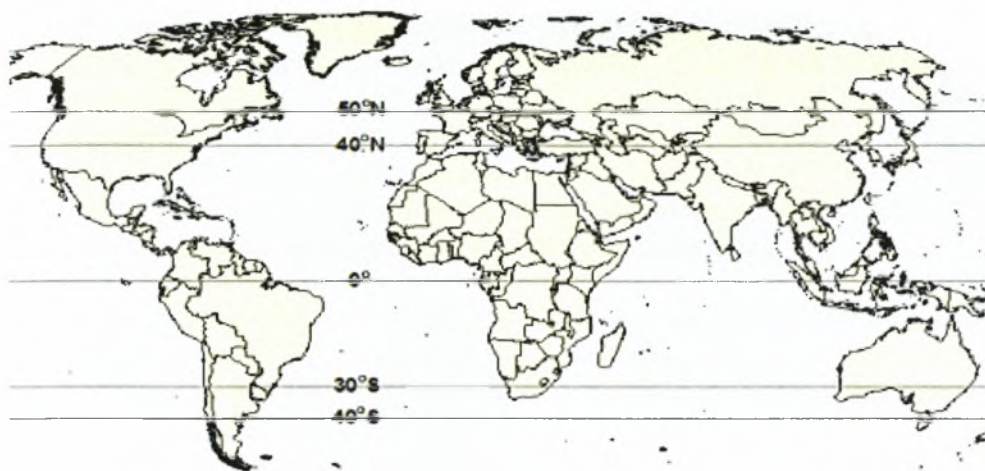
### Κατανομή

Ο καταρροϊκός πυρετός προσέβαλε κυρίως τις τροπικές και υποτροπικές περιοχές της γης ανάμεσα στους 35°S και 40°N. Τα τελευταία χρόνια όμως τα βορειότερα όρια της ασθένειας έχουν εντοπιστεί ως και τον 50°N [5].

Η ασθένεια εμφανίστηκε πρώτη φορά στη Ν. Αφρική γύρω στα 1900 και γρήγορα εξαπλώθηκε και σε άλλες περιοχές της Αφρικής. Το 1940, ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά εκτός Αφρικής, στην Κύπρο και στη Β. Αμερική, ενώ το 1950 εμφανίστηκε στο Ισραήλ και στην Ινδία. Στην Ευρώπη, μέχρι πρόσφατα, ο ιός υπήρχε μόνο περιοδικά [9].

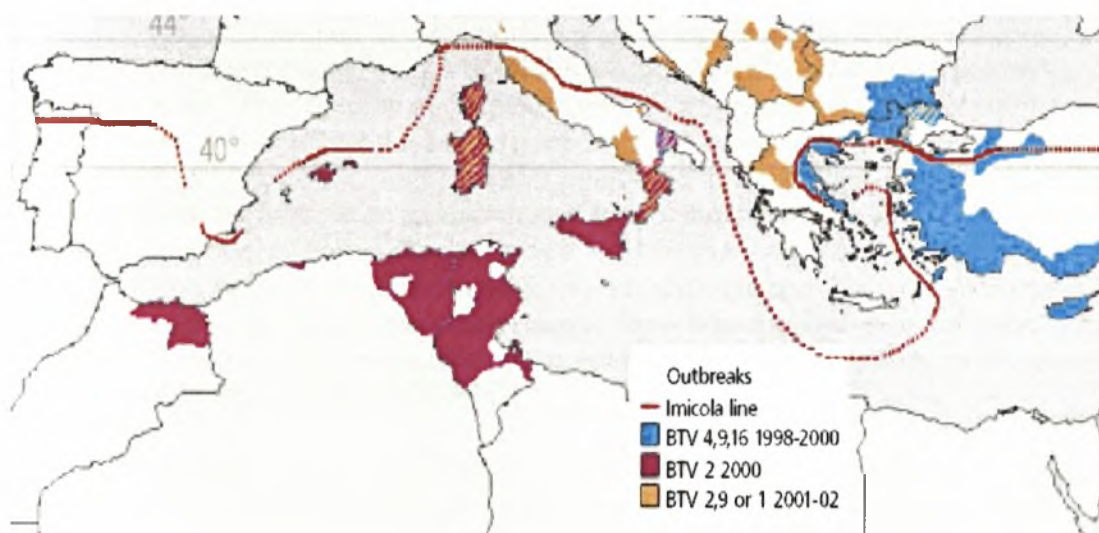
Τα *Culicoides* δεν μπορούν να πετάξουν σε πολύ μεγάλες αποστάσεις. Μπορούν όμως να μεταφερθούν μέσω ισχυρών ανέμων ως και μερικές εκατοντάδες χιλιόμετρα. Με τον τρόπο αυτό μεταφέρθηκαν στις Βαlearίδες νήσους από την Τυνησία και σε Ελληνικά νησιά από την Τουρκία. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη μεταφορά ζώων για εμπόριο από περιοχές της Ασίας ή της Αφρικής προς την Ευρώπη καθώς και την αύξηση της θερμοκρασίας της γης τις τελευταίες δεκαετίες, που έφερε τις θερμοκρασίες του εύκρατου κλίματος πιο κοντά σ' αυτές του τροπικού, είχαν ως αποτέλεσμα την εξάπλωση της ασθένειας στη Νότια και Ανατολική Ευρώπη, γύρω από τις περιοχές της Μεσογείου [4] (Εικ. 4 και 5).





Εικόνα 4. Ο καταρροϊκός πυρετός εξαπλώθηκε αρχικά στο γεωγραφικό πλάτος ανάμεσα στους 35° S και 40° N (τροπικές και υποτροπικές περιοχές) . Προσφάτως αναφέρεται ως και τον 50° N .

Ιδιαίτερα από το 1998 και μετά, οι κλιματικές αλλαγές ευνόησαν την επιβίωση του *Culicoides imicola* στη ΝΑ Ευρώπη, καθώς και την επιβίωση νέων ειδών φορέων (*Culicoides obsoletus* και *Culicoides pulicaris*) σε αυτή την περιοχή. Η ασθένεια εξαπλώθηκε γύρω από τη Μεσόγειο ως και τα Βαλκάνια και πολλές χώρες προσβλήθηκαν για πρώτη φορά. Αποτέλεσμα ήταν η μεγαλύτερη ως τώρα επιζωοτία του κόσμου που διήρκεσε ως το 2004 [4, 5] (Εικ. 4 και 5).



Εικόνα 5. Εξάπλωση του καταρροϊκού πυρετού στις περιοχές της Μεσογείου από το 1988 ως το 2002. Η κόκκινη γραμμή δείχνει τα βορειότερα όρια κατανομής του *Culicoides imicola*.

Ο καταρροϊκός πυρετός εξακολουθεί ως σήμερα να υπάρχει σε περιοχές της Μεσογείου πολύ κοντά στην Ελλάδα (Ισπανία, Πορτογαλία, επιζωοτίες 2005). Οι περιοχές της Κεντρικής και της Βόρειας Ευρώπης δεν είναι ακόμα αρκετά θερμές για να ευνοήσουν τη μετάδοση της ασθένειας.

Στην Ελλάδα, ο καταρροϊκός πυρετός εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1979 στη Λέσβο. Ο ιός ήταν οροτύπου 4 και μεταφέρθηκε με *Culicoides imicola* από την Τουρκία μέσω ισχυρών ανέμων. Τα επόμενα χρόνια δεν αναφέρθηκαν κλινικές περιπτώσεις καταρροϊκού πυρετού στο νησί, ούτε σε άλλες περιοχές της Ελλάδας, ως τον Οκτώβριο του 1998 οπότε ο ιός εμφανίστηκε και πάλι σε νησιά που βρίσκονταν κοντά στις τουρκικές ακτές (Ρόδος,



Κως, Λέρος). Αυτή τη φορά απομονώθηκε καταρροϊκός πυρετός ορότυπος 9. Τον Αύγουστο του 1999 η ασθένεια εξαπλώθηκε στη βόρεια και κεντρική Ελλάδα ξεκινώντας από τον Έβρο και προσβάλλοντας τελικά το ένα τρίτο της χώρας. Ο ιός ήταν οροτύπου 16, ενώ στη μετάδοση ενεπλάκη ακόμη ένα είδος *Culicoides*, το *Culicoides obsoletus*. Το 2000 και 2001 ο καταρροϊκός πυρετός εμφανίστηκε και στη βορειοδυτική Ελλάδα. Την περίοδο αυτή ανιχνεύθηκε ακόμα ένας νέος ορότυπος του ιού, ο ορότυπος 1. Από το 2001 δεν έχουν αναφερθεί ξανά κρούσματα καταρροϊκού πυρετού στην Ελλάδα [6].

### **Επιπτώσεις**

Μόνο στην Αμερική υπολογίζεται απώλεια 125 εκατομμυρίων δολαρίων ετησίως λόγω του καταρροϊκού πυρετού [8]. Από το 1998, στην Ευρώπη, ο καταρροϊκός πυρετός προκάλεσε το θάνατο πάνω από ένα εκατομμύριο προβάτων. Οι επιπτώσεις στο εμπόριο των ζώων και στην παραγωγή ζωικών προϊόντων ήταν τεράστιες [7].

Στην Ελλάδα, τις περιόδους έξαρσης του καταρροϊκού πυρετού σφαγιάστηκαν χιλιάδες μολυσμένα ζώα στα πλαίσια της προσπάθειας αντιμετώπισης της ασθένειας. Επίσης περιορίστηκε σημαντικά το εμπόριο ζώων και ζωοκομικών προϊόντων, καθώς απαγορεύθηκε η μετακίνηση των ζώων από τις μολυσμένες περιοχές και γύρω από αυτές [6].

Εξαιτίας λοιπόν της γρήγορης και ολοένα αυξανόμενης εξάπλωσής του και κυρίως των οικονομικών συνεπειών του, ο καταρροϊκός πυρετός ταξινομείται ως ασθένεια της λίστας Α από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας των ζώων (Office International des Epizooties, OIE).

### **Αντιμετώπιση και παρακολούθηση της ασθένειας**

Προσπάθεια αντιμετώπισης του καταρροϊκού πυρετού γίνεται με εμβολιασμό, σφαγή των αιμικών ζώων, περιορισμό των μετακινήσεων και παρεμπόδιση της αύξησης των εντόμων φορέων.

Στην Ελλάδα, οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν είναι η σφαγή των μολυσμένων ζώων, και ο περιορισμός των μετακινήσεων στις προσβεβλημένες περιοχές, αλλά και γύρω από αυτές, σε συνδυασμό με την ορολογική παρακολούθηση ζώων-μαρτύρων (βοοειδή), στενή παρακολούθηση των εντόμων-φορέων και καταστροφή τους με ψεκασμούς. Οι μέθοδοι αυτές ήταν απόλυτα επιτυχείς. Επίσης, πολύ σημαντική ήταν η μη χρήση εμβολίων λόγω των κινδύνων που ενέχουν για τη μετάδοση και την εξάπλωση του ιού [6].

Η Ελλάδα αυτή τη στιγμή θεωρείται χώρα «ελεύθερη» για τον καταρροϊκό πυρετό. Παρόλα αυτά, ορολογικές εξετάσεις συνεχίζουν να γίνονται στα ζώα που μετακινούνται, καθώς και στα ζώα που βρίσκονται στις περιοχές όπου είχε εμφανισθεί η ασθένεια ή όπου έχει αυξημένες πιθανότητες να εμφανιστεί, με σκοπό την παρακολούθηση επανεμφάνισης του νοσήματος ή νέων οροτύπων του ιού.

### **Εμβολιασμός**

Τα μοναδικά εμβόλια που χρησιμοποιούνται ως σήμερα παγκοσμίως για προστασία έναντι του καταρροϊκού πυρετού είναι ζωντανά εξασθενημένα εμβόλια, που παρασκευάζονται με πολλαπλά περάσματα από εμβρυοφόρα αυγά κότας ή κυτταροκαλλιέργειες [10,11]. Λόγω της πληθώρας των οροτύπων, ο εμβολιασμός είναι συνήθως πολυδυναμικός. Τα εμβόλια αυτά είναι τερατογόνα ενώ μπορεί να προκαλέσουν και αποβολές. Συνεπώς δεν πρέπει να χορηγούνται σε πρόβατα κατά τη διάρκεια της κύησης. Στις ενζωτικές περιοχές οι εμβολιασμοί πρέπει να γίνονται μετά την ηλικία των 3-6 μηνών, ως την οποία οι αμνοί έχουν μητρικά αντισώματα [1,11].

Ένα άλλο πολύ σημαντικό πρόβλημα αυτών των εμβολίων είναι οι κίνδυνοι που ενέχουν για τη μετάδοση και την εξάπλωση του ιού. Αν και σε μικρό ποσοστό, έχει αποδειχθεί ότι τα εξασθενημένα στελέχη μπορούν να μεταδοθούν μέσω των εντόμων φορέων και να ξαναγίνουν μολυσματικά. Έτσι, ο εμβολιασμός μπορεί να επιφέρει το αντίθετο από το επιθυμητό αποτέλεσμα και να συμβάλει στη διατήρηση του ιού στην περιοχή όπου βρίσκονται τα εμβολιασμένα ζώα και στην εξάπλωσή του μέσω των εντόμων [13].

Δικαιολογημένος είναι, επίσης, ο φόβος για τη δημιουργία νέων στελεχών μέσω του εμβολιασμού, λόγω ανασυνδυασμών ανάμεσα στα εμβολιακά και τα κυκλοφορούντα (άγρια) στελέχη [14].

Λόγω των παραπάνω υποφαινόμενων κινδύνων δεν εφαρμόστηκε ο εμβολιασμός των ζώων στην Ελλάδα, ενώ χώρες που εφάρμοσαν την τακτική των εμβολιασμών ήρθαν αντιμέτωπες με αρκετά από τα παραπάνω προβλήματα [6,13].

Υπό δοκιμή βρίσκεται νέα γενιά εμβολίων που παράγονται από virion-like particles (VLP) που δημιουργούνται σε κύτταρα μολυσμένων εντόμων από ανασυνδυασμένους baculoviruses που εκφράζουν τις τέσσερις πρωτεΐνες του καψιδίου του ιού BT, VP2, 3, 5 και 7 [11].

## **Bluetongue virus (ιός του καταρροϊκού πυρετού)**

### ***Ταξινόμηση***

Ο ιός που προκαλεί τον καταρροϊκό πυρετό ονομάζεται bluetongue virus (BTV). Ανήκει στο γένος *Orbivirus* της οικογένειας *Reoviridae*. Το γένος των *Orbivirus* αποτελεί ένα από τα 9 γένη της οικογένειας. Κανένας ιός αυτού του γένους δεν είναι παθογόνος για τον άνθρωπο, ενώ όλοι οι ιοί μεταφέρονται μέσω εντόμων. Τα μέλη του γένους ταξινομούνται σε 19 διαφορετικά είδη ή οροομάδες (serogroups), ενώ υπάρχουν και πολλοί μη ταξινομημένοι ιοί. Η πιο αντιπροσωπευτική ομάδα του γένους είναι η οροομάδα του ιού του καταρροϊκού πυρετού (BTV serogroup), που αποτελείται από 24 διαφορετικούς ορότυπους (serotypes) (αριθμούνται 1-24). Ο ιός BT μεταδίδεται μέσω εντόμων του γένους *Culicoides* και προσβάλλει είδη άγριων και ήμερων μηρυκαστικών [9].

Με το ίδιο έντομο μεταδίδονται και οι ιοί που ανήκουν στις δύο πιο συγγενείς στο BT οροομάδες του γένους: ιός της Αφρικανικής πανώλης του ίππου (African Horse Sickness Virus, AHSV, 9 ορότυποι) και ιός της επιζωοτικής αιμορραγικής νόσου του ελαφιού (Epizootic Hemorrhagic Disease Virus, EHDV, 9 ορότυποι).

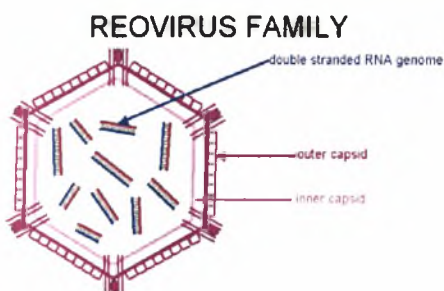
### ***Δομή ιικού σωματιδίου***

Όπως όλα τα μέλη της οικογένειας *Reoviridae*, ο ιός BT αποτελείται από δίκλωνο, τεμαχισμένο RNA, μέσα σε διπλό πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας που δεν περιβάλλεται από φάκελο (Εικ. 6).

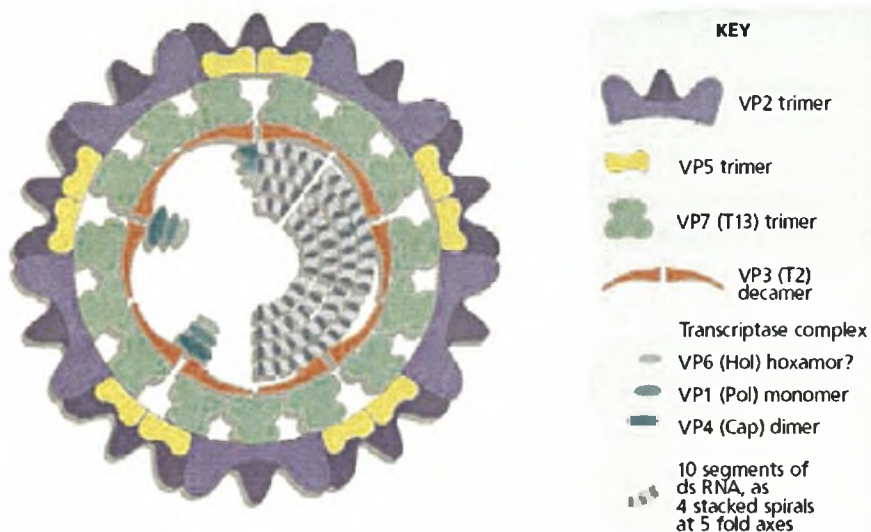
Η εσωτερική μεμβράνη του καψιδίου που ονομάζεται «πυρήνας» (core) συντίθεται από δύο κύριες ιικές πρωτεΐνες τη VP3 και τη VP7. Η VP3 και η VP7 σχηματίζουν δύο ομόκεντρες πρωτεϊνικές στιβάδες που περιβάλλουν μια

κεντρική στιβάδα. Η VP3 βρίσκεται μέσα από τη στιβάδα της VP7. Η VP7 τοποθετείται έτσι, ώστε σχηματίζει εξαμερή δαχτυλίδια που δίνουν το όνομα στο γένος (orbī → κυκλικός, δαχτυλίδι) [9]. Η κεντρική στιβάδα που περικλείει ο «πυρήνας» αποτελείται από τρεις μικρότερες ιικές πρωτεΐνες τις VP1, VP4 και VP6 και το RNA.

Η εξωτερική μεμβράνη του καψιδίου αποτελείται από δύο πρωτεΐνες, τη VP2 και τη VP5 (Εικ. 7). Η VP5 είναι σφαιρική και τοποθετείται στα κενά που αφήνει η πρωτεϊνική στιβάδα της VP7 της εσωτερικής μεμβράνης. Η VP2 έχει σχήμα ιστίου και καλύπτει όλα τα μόρια της VP7. Βάσει της VP2 διακρίνονται οι 24 ορότυποι BT [9].



Εικόνα 6. Δίκλωνο, τεμαχισμένο RNA και διπλό πρωτεϊνικό καψίδιο, χωρίς φάκελο χαρακτηριστικά της οικογένειας *Reoviridae*.



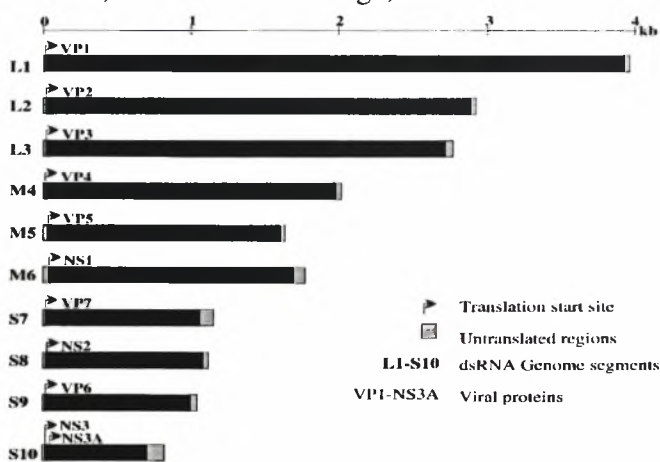
Εικόνα 7. Οργάνωση του ιικού σωματιδίου του BTV.

### Οργάνωση και δομή του ιικού γενώματος

Το γένωμα όλων των *Orbiviruses* είναι τεμαχισμένο και αποτελείται από 10 τμήματα δίκλωνου RNA. Ηλεκτροφόρηση των τμημάτων του γενώματος σε gel πολυακρυλαμίδης δίνει διαφορετικά ηλεκτροφορητικά πρότυπα, χαρακτηριστικά για κάθε ορομάδα και κάθε ορότυπο. Τα τμήματα RNA αριθμούνται από 1 ως 10 σύμφωνα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Επίσης αναφέρονται σαν L, M και S από τα large, medium και small. Οι BT ιοί έχουν 3L, 3M και 4S τμήματα (Εικ. 8). Το μέγεθος των τμημάτων σύμφωνα με το BT-10 υπολογίζεται από 3954bp (L1, M.B.~ 2.7 x 10<sup>6</sup> daltons) ως 822bp (S10, M.B.~ 5 x 10<sup>5</sup> daltons), ενώ όλο το γένωμα υπολογίζεται γύρω στις 19200bp (M.B.~ 13 x 10<sup>6</sup> daltons) [9, 10].

Οι δύο κλώνοι του RNA είναι απόλυτα συμπληρωματικοί. Οι 5' μη κωδικές περιοχές ποικίλλουν σε μέγεθος για τα διάφορα τμήματα από 8 ως 34 νουκλεοτίδια, ενώ οι 3' είναι μεγαλύτερες και ποικίλλουν σε μέγεθος από 31 ως 116 νουκλεοτίδια. Οι τελικές αλληλουχίες μήκους 6 νουκλεοτιδίων είναι συντηρημένες για τα 10 τμήματα RNA όλων των μελετημένων ως τώρα στελεχών που ανήκουν στις οροομάδες των BT και EHDV (Πίνακας 1). Οι AHSV έχουν επίσης παρόμοιες αλλά όχι ταυτόσημες τελικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, δεν είναι όμως συντηρημένες σε όλα τα τμήματα [10].

Το 5' άκρο της κωδικής αλυσίδας κάθε τμήματος είναι καλυμμένο και μεθυλιωμένο, όπως και τα mRNAs, αντίθετα μ' αυτό της μη κωδικής. Οι 5' και 3' αλληλουχίες των mRNAs είναι ανάστροφα συμπληρωματικές και σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές που έχουν σχέση με τη σταθερότητα του mRNA (εμποδίζουν την αποικοδόμηση από νουκλεάσες) και την αναγνώριση και σύνδεση της ιικής πολυμεράσης. Επιπλέον, παίζουν σημαντικό ρόλο στο πακετάρισμα των mRNAs στα πρόδρομα ιικά σωματίδια, στην



Εικόνα 8. Σχηματικό διάγραμμα των τμημάτων RNA του BTV-10 και το σχετικό τους μήκος.



επιλογή του κλώνου που θα συνθέσει το mRNA και στον καθορισμό της επάρκειας της μετάφρασης των διαφόρων mRNAs [9].

Εκτός από τα τμήματα L1 και S10, όλα τα άλλα έχουν ένα πλαίσιο ανάγνωσης που αρχίζει από το πρώτο κωδικόνιο έναρξης και κωδικοποιεί μία μόνο ιική πρωτεΐνη. Το τμήμα L1, έχει δύο κωδικόνια έναρξης και το αναγνωστικό πλαίσιο αρχίζει από το δεύτερο, ενώ το τμήμα S10 που έχει επίσης δύο κωδικόνια έναρξης κωδικοποιεί δύο πρωτεΐνες (Πίνακας 1). Εκτός από τα τμήματα L2 και M5, όλα τα υπόλοιπα είναι συντηρημένα στην οροομάδα των BT [9].

Πίνακας 1. Συντηρημένες τελικές αλληλουχίες των τμημάτων RNA στην οροομάδα των BT.

	5'-Terminal sequence	5'-Non-coding length (bp)	3'-Non-coding length (bp)	3'-Terminal sequence
L1	<u>G U U A A A A U G C A A U G</u>	11	37	<u>U G A G A G C A C G C G C G A G C A C G C G C G C A U U A C A C U U A C</u>
L2	<u>G U U A A A A G A G U G U U C U A C C A U G</u>	19	39	<u>U A G G U C C U G U G A C A U G G A C C G G U A G C C U C U U A C A C U U A C</u>
L3	<u>G U U A A A U U U C C G U A G C C A U G</u>	17	52	<u>U A G A U G U G C G A C C G A U C U A U G C A C U U G G U A G C -</u> <u>G G C A G C G G A A A C A C A C U U A C</u>
M4	<u>G U U A A A A C A U G</u>	8	41	<u>U A U U C C G U G A C U G C U A G G U G A G G G G G C A U G U A C A A C U U A C</u>
M5	<u>G U U A A A A A G U G U U C U C U A C U G C A G A A G A U G</u>	29	31	<u>U G A A C G C A G C G G G G A G G A C C U U C C A C U U A C</u>
M6	<u>G U U A A A A A A G U U C U C U A G U U G G C A A -</u> <u>C C A C C A A A C A U G</u>	34	79	<u>U A G U U A C U G A U U U U A G U U U U U A U U C C U U C U U U</u> <u>C A U U U C U A U U U C U C U U A G</u> <u>C A C U C U A C U A G A A C U U U U C A A C U U A C</u> <u>U A G U C C A C U U U G C A C G G G U G U G G G U U A C A U A U G C</u> <u>G G U G U G U C G G U U G U G G G A</u>
S7	<u>G U U A A A A A U C U A U A G A G A U G</u>	17	92	<u>A A U A U G U A A C C A U U U A A A C G U C U C U A G A U U A C A C U U A C</u> <u>U G A C C G C A U G A U U G G G G G G A U U U U A C A C U U A C</u>
S8	<u>G U U A A A A A A U C C U U G A G U C A U G</u>	19	34	<u>U A A A G G G U C C A G G G U A C C U U C U U G A C G U A G</u>
S9	<u>G U U A A A A A A U C G C A U A U G</u>	15	47	<u>G G C G A U U U C A C A C U U A C</u>
S10	<u>G U U A A A A A G U G U C G C U G C C A U G</u>	19	116	<u>U G A G G A C A G U A G G U A G A G U G C G C C C C A A G</u> <u>G U T U U A C G U C G U G C A G G G U G G U</u> <u>U G A C C U C G C G G C G U A A A U C C C A C U G C U G U A U</u> <u>A A C G G G G A G G G U G C G C A U A</u> <u>C U A C A C A C U U A C</u>

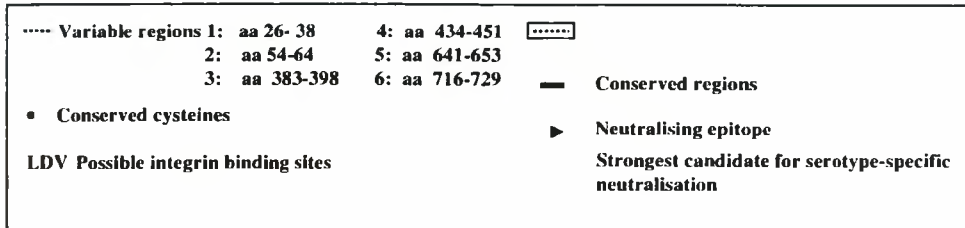
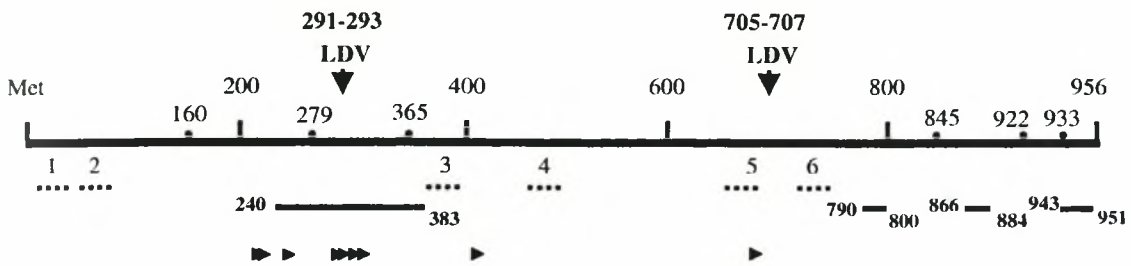
Note: The conserved terminal nucleotides, translation initiation, and termination codons are underlined. The 5' cap structures on each RNA segment are not shown. From ref. 128, with permission.

### Ιικές πρωτεΐνες

Κάθε τμήμα κωδικοποιεί μια μόνο ιική πρωτεΐνη, εκτός από το S10 που κωδικοποιεί δύο πρωτεΐνες. Υπάρχουν 7 δομικές πρωτεΐνες, που αριθμούνται VP1-VP7 σύμφωνα με το μέγεθός τους σε SDS-PAGE και 4 μη δομικές (NS1, NS2, NS3 και NS3A) που συντίθενται στα μολυσμένα κύτταρα και η σύνθεσή τους χαρακτηρίζει την αντιγραφή του ιού.

Η κύρια πρωτεΐνη της εξωτερικής στιβάδας του καψιδίου, η VP2 κωδικοποιείται από το λιγότερο συντηρημένο στην οροομάδα των BT τμήμα L2 και είναι η πιο μεταβλητή πρωτεΐνη ανάμεσα στους ορότυπους, έτσι, βάσει της VP2 χαρακτηρίζονται οι 24 ορότυποι BT (serotype-specific protein). Αποτελείται από 956 αμινοξέα (M.B. 111 kdaltons), ενώ είναι πλούσια σε κυστεΐνες που δημιουργούν δισουλφιδικούς δεσμούς. Το καρβοξυ-τελικό άκρο και η μεσαία περιοχή της πρωτεΐνης είναι συντηρημένες. Επίσης, υπάρχουν 6 συντηρημένες κυστεΐνες (Εικ. 9). Η VP2 έχει δράση αιμοσυγκολλητίνης και εμπλέκεται στην προσκόλληση του ιού στο κύτταρο. Κατά τη μόλυνση με BT, δημιουργεί ειδικά αντισώματα για τον ορότυπο του ιού, που προστατεύουν από επαναμόλυνση από τον ίδιο ορότυπο. Παρά την εξειδίκευση για συγκεκριμένο ορότυπο, σε κάποιες περιπτώσεις τα αντισώματα μπορούν να εξουδετερώσουν και άλλους ορότυπους λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων (cross-reactions), όμως σε πολύ μικρότερη έκταση [9].





Εικόνα 9. Η VP2 είναι η πιο μεταβλητή ανάμεσα στους ορότυπους πρωτεΐνη. Βάσει της VP2 χαρακτηρίζονται οι 24 ορότυποι του ιού (serotype-specific protein). Οι συντηρημένες περιοχές της είναι πολύ μικρές και βρίσκονται στο C τελικό άκρο και μια μεγαλύτερη περιοχή περίπου στη μέση της αμινοξικής αλληλουχίας. Παρατηρούνται επίσης 6 συντηρημένες κυστεΐνες .

Η δεύτερη πρωτεΐνη της εξωτερικής στιβάδας του καψιδίου, η VP5 κωδικοποιείται από το τμήμα M5 και αποτελείται από 526 αμινοξέα (M.B. 59.163 daltons). Η VP5 συμβάλλει επίσης στο χαρακτηρισμό του ορότυπου, αλλά δεν είναι τόσο μεταβλητή όσο η VP2. Είναι υπεύθυνη για τη διείσδυση του ιού στο κύτταρο και την απελευθέρωση του «πυρήνα» στο κυτταρόπλασμα [9].

Από τις δύο πρωτεΐνες της εσωτερικής στιβάδας του καψιδίου μεγαλύτερη είναι η VP3 που κωδικοποιείται από το τμήμα L3. Η VP3 είναι πολύ συντηρημένη πρωτεΐνη όχι μόνο ανάμεσα στους ορότυπους BT αλλά και στους άλλους orbiviruses, όπως φαίνεται και στον πίνακα 2, αποδεικνύοντας έτσι τον πολύ σημαντικό της ρόλο στο σχηματισμό του ιικού καψιδίου, καθώς και στην οργάνωση του γενώματος. Η VP3 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στο εσωτερικό του «πυρήνα».

Η VP7 κωδικοποιείται από το S7. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 2, είναι πολύ συντηρημένη στην οροομάδα των BT, ενώ λιγότερο συντηρημένη ανάμεσα στις ομάδες των orbiviruses. Έτσι, η VP7 χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό της οροομάδας (serogroup-specific protein). Ειδικά αντισώματα για τη VP7 των BT αντιδρούν σε πολύ μικρό ποσοστό με ιούς που ανήκουν στις οροομάδες EHDV και AHSV. Η VP7 εμπλέκεται στην είσοδο του ιού στο κύτταρο [9].

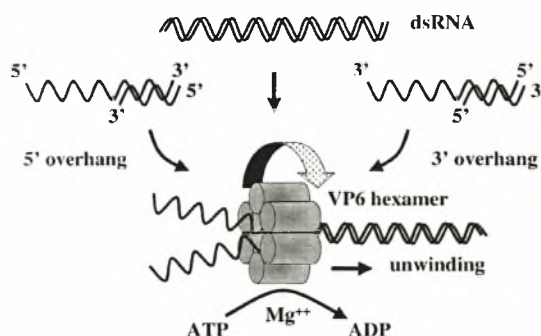
Πίνακας 2. Σύγκριση των δύο πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης του καψιδίου τριών orbiviruses.

BTV-10 Viruses	VP3		VP7	
	Similarity (%) <sup>a</sup>	Identity (%) <sup>b</sup>	Similarity (%) <sup>a</sup>	Identity (%) <sup>b</sup>
BTV-1SA	ND	ND	98	98
BTV-1Au	ND	ND	99	98
BTV-2	98	98	99	99
BTV-11	99	99	ND	ND
BTV-13	99	99	ND	ND
BTV-15	ND	—	89	83
BTV-17	99	99	99	99
EHDV-1	87	79	73	63
EHDV-2	87	79	ND	ND
AHSV-4	68	58	53	43
AHSV-6	68	58	53	43
AHSV-9	ND	ND	53	43

<sup>a</sup>Similarity: Residues belonging to the same functional group.

<sup>b</sup>Identity: Identical amino acid residues.

Οι τρεις μικρές δομικές πρωτεΐνες, VP1, VP4 και VP6 που βρίσκονται μέσα στον «πυρήνα» είναι συντηρημένες ανάμεσα στους ορότυπους. Η VP1, που κωδικοποιείται από το μεγαλύτερο τμήμα RNA L1, είναι η RNA-dependent RNA πολυμεράση. Η VP4



Εικόνα 10. Η VP6 σχηματίζει εξαμερή που προσδένονται στο RNA. Παρουσία δισθενών κατιόντων υδρολύει το ATP και ξετυλίγει το RNA.

κωδικοποιείται από το M4 τμήμα και έχει ενζυμική δράση που τροποποιεί το 5' άκρο (γουανυλυλτρανσφεράση, τρανσμεθυλάση 1 και 2). Η VP6 κωδικοποιείται από το S9 τμήμα και έχει δράση ελικάσης. Σχηματίζει εξαμερή που έχουν την ικανότητα να προσδένονται είτε σε μονόκλωνο, είτε σε δίκλωνο RNA. Παρουσία δισθενών κατιόντων υδρολύει το ATP και ξετυλίγει το RNA. Εκτός από την ιδιότητα να ξετυλίγει τμήματα RNA με τυφλά άκρα, μπορεί επίσης να ξετυλίγει τμήματα με προεξέχοντα 3' ή 5' μονόκλιωνα άκρα (Εικ. 10) [9].

Εκτός από τις δομικές πρωτεΐνες, το ιικό γένωμα κωδικοποιεί και τέσσερις μη δομικές πρωτεΐνες, τις NS1, NS2, NS3, NS3A που εμφανίζονται στα μολυσμένα κύτταρα κατά την αντιγραφή. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες είναι πολύ συντηρημένες ανάμεσα στους ορότυπους των BT. Η NS1 και NS2, κωδικοποιούνται από τα τμήματα M6 και S8 αντίστοιχα και συντίθενται σε πολύ μεγάλο ποσοστό. Η σύνθεση των NS1 και NS2 στα μολυσμένα με BT κύτταρα συμπίπτει με τη σύνθεση δύο ειδικών ικών δομών που εμφανίζονται μόνο στα μολυσμένα κύτταρα, τα σωληνάρια και τα έγκλειστα σωμάτια. Τα σωληνάρια βρίσκονται γύρω από τον πυρήνα και ως τώρα η λειτουργία τους είναι άγνωστη. Πιθανολογείται ότι εμπλέκονται στη μεταφορά των ικών σωματιδίων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Οι NS3 πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το S10 και συντίθενται σε πολύ μικρό ποσοστό στα μολυσμένα κύτταρα των σπονδυλωτών, όπου ο ιός είναι λυτικός, ώστε μόλις ανιχνεύονται. Οι NS3 διευκολύνουν την έξοδο του ιού από το κύτταρο. Στα κύτταρα των ασπόνδυλων όπου ο ιός δεν είναι λυτικός οι NS3 συντίθενται σε πολύ μεγαλύτερα ποσοστά και ίσως εκεί έχουν κάποιον άλλο λειτουργικό ρόλο [9].

Οι πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία των ικών πρωτεϊνών συνοψίζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Οι πρωτεΐνες του ΒΤ-10 [10].

Αριθμός και μέγεθος (bp) τμήματος γενώματος	Πρωτεΐνη και θέση της	Λειτουργία
L1 (3954)	VP1 (Pol) Μέσα στον «πυρήνα»	RNA-dependent RNA polymerase
L2 (2926)	VP2 Εξωτερική μεμβράνη καψιδίου	Πολύ μεταβλητή πρωτεΐνη, χαρακτηρίζει τον ορότυπο του ιού, πρωτεΐνη προσκόλλησης στο κύτταρο-ξενιστή, δράση αιμοσυγκολλητίνης
L3 (2770)	VP3 Εσωτερική μεμβράνη καψιδίου	Συμβάλλει στην οργάνωση του ιικού καψιδίου και του γενώματος
M4 (1981)	VP4 (Cap) Μέσα στον «πυρήνα»	Προσθέτει το cap, δράση γουανυλυλτρανσφεράσης, τρανσμεθυλάσης 1 και 2
M6 (1769)	NS1 (TuP) Εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή	Σχηματίζει σωληνάκια αγνώστου λειτουργίας στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή που είναι χαρακτηριστικά της αντιγραφής του ιού
M5 (1638)	VP5 Εξωτερική μεμβράνη καψιδίου	Συμβάλλει στο χαρακτηρισμό του ορότυπου
S7 (1156)	VP7 Εσωτερική μεμβράνη καψιδίου	Εμπλέκεται στην είσοδο του ιού στο κύτταρο, χαρακτηρίζει την οροομάδα των ΒΤ
S8 (1124)	NS2 (ViP) Εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή	Πρωτεΐνη των έγκλειστων ιικών σωματιδίων
S9 (1046)	VP6 (Hel) Μέσα στον «πυρήνα»	Ελικάση
S10 (822)	NS3-NS3A Κυτταρική μεμβράνη ξενιστή	Γλυκοπρωτεΐνες, εμπλέκονται στην έξοδο του ιού από το κύτταρο, είναι κυτταροτοξικές και μπορούν να διακόψουν την κυτταρική μεμβράνη

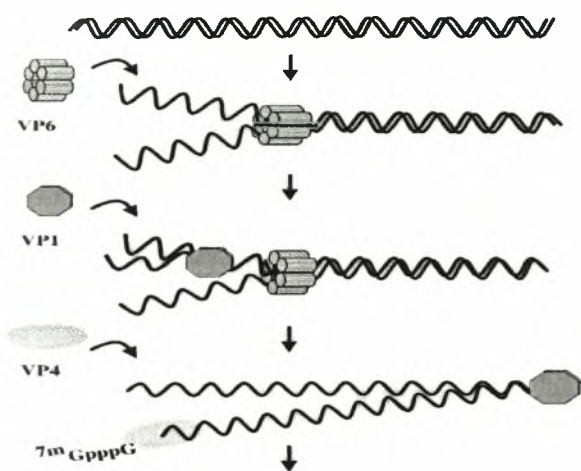
### Αντιγραφή του ιού

Ο ιός προσροφάται γρήγορα στα δεκτικά κύτταρα στους 4°C και 37°C. Η μόλυνση έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της σύνθεσης των μακρομορίων του ξενιστή. Οι κυτταρικοί υποδοχείς που εμπλέκονται στη μόλυνση δεν έχουν ακόμα πιστοποιηθεί. Σύμφωνα με σχετικές έρευνες, πιθανολογείται ότι ο ιός προσδένεται σε μια γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται στα ανθρώπινα και ζωικά ερυθροκύτταρα μέσω της VP2, ενώ πολύ πιθανή είναι η εμπλοκή στη μόλυνση και κάποιας πρωτεΐνης που έχει το ρόλο του συνυποδοχέα [9].

Ο ιός μπαίνει στο κύτταρο με ενδοκύτωση. Μετά την είσοδο και την αποκόλληση από την κυτταρική μεμβράνη σχηματίζεται ένα κυστίδιο κλαθρίνης που περιέχει τον ιό. Το κυστίδιο κλαθρίνης γρήγορα αποικοδομείται, δίνοντας τη θέση του σε ένα ενδοκυτταρικό κυστίδιο που μεταφέρει τον ιό κοντά στον πυρήνα. Κατά τη διάρκεια αυτών των αρχικών σταδίων η μορφολογία του ιού μετατρέπεται λόγω της αποικοδόμησης της VP2 και της αλλαγής της διαμόρφωσης της VP5. Μέσα σε μία ώρα μετά τη μόλυνση ο ιός αποτελείται μόνο από την εσωτερική μεμβράνη του καψιδίου. Η απομάκρυνση της εξωτερικής μεμβράνης απαιτείται προκειμένου να ενεργοποιηθεί η ιική μεταγραφάση. Στο κυτταρόπλασμα, τα σωματίδια χωρίς το εξωτερικό καψίδιο προσδένονται τελικά στον κυτταροσκελετό (ειδικά στα ενδιάμεσα ινίδια) και αρχίζει η μεταγραφή των ιικών mRNA. Για την επάρκεια της μεταγραφικής δραστηριότητας είναι σημαντική η δομική ακεραιότητα του «πυρήνα».



Η VP6 ελικάση ξετυλίγει τα δίκλινα μόρια RNA, ενώ η VP1 πολυμεράση αρχίζει τη σύνθεση RNA κλώνων θετικής πολικότητας από το 3' άκρο κάθε κλώνου RNA αρνητικής πολικότητας. Οι κλώνοι αρνητικής πολικότητας σχηματίζονται αντιστοίχως από τους κλώνους θετικής πολικότητας. Η VP1 από μόνη της είναι ικανή να αρχίσει τη δραστηριότητα της αντιγραφής. Μετά το σχηματισμό των κλώνων θετικής πολικότητας τα 5' άκρα τους τροποποιούνται από τις ενζυματικές δραστηριότητες της VP4, καθώς και τα mRNAs. Οι δραστηριότητες αυτών των πρωτεϊνών απεικονίζονται στην εικόνα 11.



Εικόνα 11. Μηχανισμός σύνθεσης του ιικού RNA και ρόλος κάθε μιας από τις τρεις ιικές πρωτεΐνες.

Τα mRNAs προεξέχουν από τα σωματίδια στο κυτταρόπλασμα και ρυθμίζουν τη σύνθεση των ικών πρωτεϊνών. Οι δευτεροταγείς τους δομές διευκολύνουν την έξοδο τους από τα σωματίδια και συμβάλλουν στη σταθερότητα τους στο κυτταρόπλασμα, καθώς και στις αλληλεπιδράσεις τους με τα ριβοσώματα για τη μεταγραφή. Δεν μεταγράφονται όλα τα τμήματα στο ίδιο ποσοστό. Τα μικρότερα τμήματα μεταγράφονται σε πολύ μικρό ποσοστό.

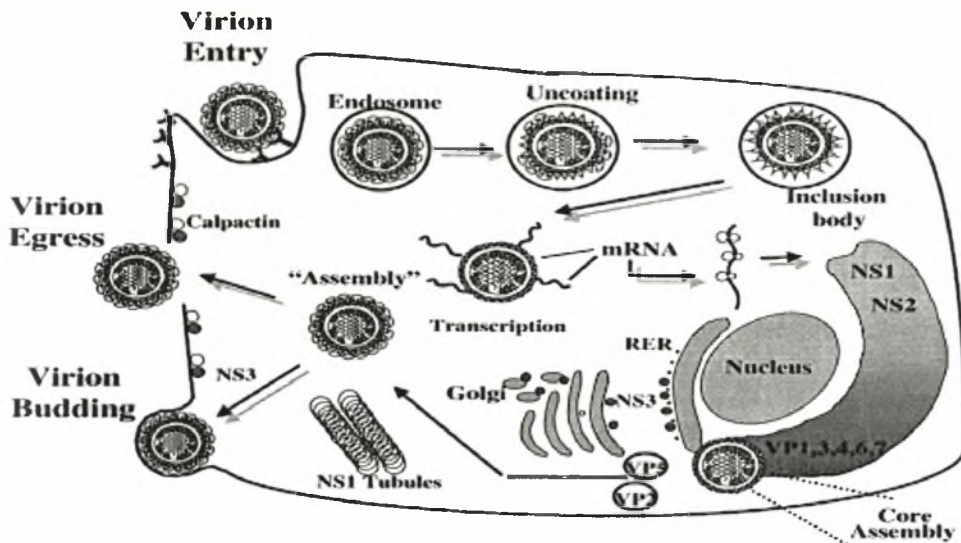
Τα πρώτα ιικά πολυπεπτίδια ανιχνεύονται 2 ως 4 ώρες μετά τη μόλυνση και ο ρυθμός πρωτεϊνοσύνθεσης αυξάνει σημαντικά 11 με 13 ώρες μετά τη μόλυνση. Από εκεί και πέρα, ο ρυθμός πρωτεϊνοσύνθεσης μειώνεται σταδιακά αλλά συνεχίζει ως το θάνατο του κυττάρου.

Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης σχηματίζεται γύρω από τον «πυρήνα» του ιικού σωματιδίου ένα ινώδες δίκτυο. Αυτό το δίκτυο αποτελεί τα έγκλειστα ιικά σωματίδια που περιέχουν mRNA, φωσφορυλιωμένη την NS2 πρωτεΐνη, καθώς και τις VP3 και VP7 πρωτεΐνες αποδεικνύοντας πως ίσως είναι οι θέσεις συναρμολόγησης του ιικού σωματιδίου. Η έκφραση των VP3 και VP7 παρουσία των VP1, VP4 και VP6 οδηγεί στο σχηματισμό του εσωτερικού καψιδίου. Οι VP2 και VP5 βρίσκονται συνήθως στην περιφέρεια των έγκλειστων σωματίων. Μετά την προσθήκη και αυτών και το σχηματισμό της εξωτερικής μεμβράνης του καψιδίου, η μεταγραφική δραστηριότητα του ιικού σωματιδίου σταματάει. Παρόλο που οι ιικές πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να αυτοσυναρμολογούνται, είναι πιθανή η ύπαρξη κάποιου ειδικού μηχανισμού για την αναγνώριση και ενσωμάτωση των mRNAs και τη δημιουργία δίκλινου RNA. Σ' αυτό το μηχανισμό πιθανόν εμπλέκεται η NS2 και ειδικές αλληλουχίες και δομές των ικών RNA. Η ωρίμανση των ικών σωματιδίων γίνεται είτε στο κυτταρόπλασμα, είτε στον κυτταροσκελετό μετά τη σύνδεση των ικών σωματιδίων. Χαρακτηριστικό της μόλυνσης με τον ιό είναι επίσης η παρουσία των σωληναρίων της NS1 (αγνώστου ως τώρα λειτουργίας) στο κυτταρόπλασμα.

Η έξοδος των ικών σωματιδίων γίνεται με λύση των κυττάρων ή budding και δείχνει να εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο. Ο ιός απελευθερώνεται από τα κύτταρα των προσβεβλημένων θηλαστικών μετά τη λύση του κυττάρου που προκαλείται από ανοίγματα της κυτταρικής μεμβράνης σε διαφορετικά σημεία. Στα κύτταρα των εντόμων φορέων ο ιός δεν προκαλεί λύση και βγαίνει πάντα με budding. Στο μηχανισμό εξόδου εμπλέκεται η NS3, η οποία ανιχνεύεται σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα κύτταρα των εντόμων από ότι στα κύτταρα των θηλαστικών.

Τα γεγονότα της αντιγραφής του ιού συνοψίζονται στην εικόνα 12.





Εικόνα 12. Σχηματικό διάγραμμα του κύκλου αντιγραφής του ιού.

## Διάγνωση του καταρροϊκού πυρετού

Οι διαγνωστικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται ως σήμερα για τον καταρροϊκό πυρετό βασίζονται στην ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό και στην απομόνωση και ταυτοποίηση του ιού με ανοσολογικές μεθόδους ή PCR [11].

Η ανοσολογική απόκριση αρχίζει 7-14 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό BT και είναι μακροχρόνια. Τα αντισώματα που παράγονται είναι ειδικά για τις ιικές πρωτεΐνες. Η ανίχνευση των αντισωμάτων γίνεται με τεστ οροεξουδετέρωσης, ανοσοδιάχυση σε gel αγαρόζης ή συναγωνιστική ELISA [11]. Η ανίχνευση αντισωμάτων ειδικών για τη VP7 πρωτεΐνη και τη VP2 είναι χρήσιμη για την ταυτοποίηση και την τυποποίηση του υπεύθυνου για τη μόλυνση ιού. Στην ανοσοδιάχυση έχουμε διασταυρούμενες αντιδράσεις με EHDV. Συχνό φαινόμενο είναι επίσης, οι διασταυρούμενες αντιδράσεις ανάμεσα στους ορότυπους του BT.

Μια θετική απάντηση όμως σε ορολογική εξέταση, δηλώνει απλά ότι το ζώο έχει μολυνθεί και ότι ο ιός ενδεχομένως συνεχίζει να υπάρχει στον οργανισμό του. Τα περισσότερα ζώα στα οποία ανιχνεύονται αντισώματα είναι πιθανόν να έχουν ξεπεράσει τη μόλυνση.

Για την απομόνωση ιού γίνεται αιμοληψία του ζώου με αντιπηκτικό ή σε περίπτωση που έχει επέλθει θάνατος χρησιμοποιούνται ιστοί όπου ο ιός βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση, όπως ο σπλήνας και οι λεμφαδένες. Η απομόνωση πραγματοποιείται σε :

α) Εμβρυοφόρα αυγά κότας (embryonated chicken eggs, ECE). Η απομόνωση σε ECE γίνεται για την αύξηση του τίτλου του ιού, όταν δεν είναι ικανοποιητικός για την ανάπτυξη του ιού σε κυτταροκαλλιέργεια. Το αίμα συλλέγεται με αντιπηκτικό (EDTA ή ηπαρίνη) και τα ερυθρά πλένονται τρεις φορές με PBS (πλυμένα ερυθρά). Τα πλυμένα ερυθρά αιωρούνται σε PBS ή ισότονο διάλυμα NaCl και διατηρούνται στους 4°C ή χρησιμοποιούνται απευθείας για την απομόνωση. Σε περίπτωση που έχουμε ιστό γίνεται ομογενοποίηση σε PBS. Τα πλυμένα ερυθρά ή τα κύτταρα του ομογενοποιημένου καταστρέφονται με υπερήχους. Μικρή ποσότητα του δείγματος (0,1ml) ενοφθαλμίζεται ενδοφλεβίως σε ECE 10-13 ημερών και τα αυγά επωάζονται στους 35°C. Καθημερινά γίνεται ωσκόπηση. Οι θάνατοι που επέρχονται μέσα στο πρώτο 24ωρο μετά τον

ενοφθαλμισμό θεωρούνται μη ειδικοί, ενώ τα έμβρυα που συνεχίζουν να επιζούν 7 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό θανατώνονται. Τα μολυσμένα έμβρυα είναι αιμορραγικά. Τα έμβρυα που πεθαίνουν ανάμεσα στη 2 και την 7 ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό καθώς και αυτά που θανατώνονται επεξεργάζονται για την απομόνωση του ιού. Συγκεκριμένα, γίνεται αφαίρεση του ράμφους και των ποδιών των εμβρύων, τα υπόλοιπα των εμβρύων ομογενοποιούνται και τα υπολείμματα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (η μεγαλύτερη συγκέντρωση του ιού εντοπίζεται στην καρδιά). Ο ιός στο υπερκείμενο, μπορεί να ταυτοποιηθεί με ανοσολογικές τεχνικές. Αν κανένα έμβρυο δεν έχει πεθάνει, κάνουμε δύο ή τρεις τυφλές διόδους, δηλαδή λειοτρίβημα από την πρώτη δίοδο (π.χ. επεξεργασμένη καρδιά του εμβρύου) ενοφθαλμίζεται ξανά σε αυγά ή σε κυτταροκαλλιέργειες [11].

β) Κυτταροκαλλιέργειες. Η απομόνωση σε κυτταροκαλλιέργεια είναι πιο εύκολα εφαρμόσιμη, αλλά η επιτυχία της δεν είναι πάντα εξασφαλισμένη, καθώς ελάχιστος συνήθως αριθμός ικών σωματιδίων από αυτά που βρίσκονται στο δείγμα έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιαστούν σε κύτταρα καλλιέργειας. Γι' αυτό πολλές φορές απαιτείται πρώτα πέρασμα του δείγματος από εμβρυοφόρα αυγά κότας. Οι κυτταρικές σειρές που συνήθως χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη του ιού του καταρροϊκού πυρετού είναι τα BHK (baby hamster kidney), Vero (African green monkey kidney) και κύτταρα του εντόμου *Aedes albopictus*. Μετά τον ενοφθαλμισμό, οι κυτταροκαλλιέργειες παρακολουθούνται για 10 ημέρες για κυτταροπαθογόνο δράση ενώ επωάζονται στους 37° C σε 5% CO<sub>2</sub>. Εάν μέσα σε αυτό το διάστημα δεν εμφανιστεί κυτταροπαθογόνος δράση, δείγμα από την καλλιέργεια ενοφθαλμίζεται σε νέα καλλιέργεια (έως τρεις διόδους) [11].

γ) Πρόβατα. Η απομόνωση σε πρόβατα είναι επίσης πολύ χρήσιμη όταν ο τίτλος του ιού στο δείγμα αίματος είναι πολύ χαμηλός, όπως για παράδειγμα συμβαίνει πολλές εβδομάδες μετά τη μόλυνση. Τα πρόβατα ενοφθαλμίζονται υποδορίως με πλυμένα ερυθρά ή υπερκείμενο του ομογενοποιημένου του ιστού [11]. Έπειτα παρακολουθούνται καθημερινά και όταν σύμφωνα με τις ενδείξεις τα πρόβατα νοσούν, θανατώνονται και γίνεται απομόνωση του ιού από τους ιστούς όπου βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, όπως ο σπλήνας και οι λεμφαδένες. Η απομόνωση σε πρόβατα χρησιμοποιείται σπάνια καθώς είναι η πιο χρονοβόρα και πολυέξοδη μέθοδος κυρίως λόγω των μέτρων προστασίας που απαιτούνται, προκειμένου να μη μεταδοθεί η νόσος από το πρόβατο που έχει ενοφθαλμιστεί.

Μετά την απομόνωση του ιού με οποιαδήποτε από τις παραπάνω τεχνικές, εφαρμόζονται ανοσολογικές τεχνικές αρχικά για την ταυτοποίηση του ιού (serogrouping) και κατόπιν για την τυποποίηση αυτού (serotyping). Η ταυτοποίηση γίνεται με οροεξουδετέρωση, ανοσοφθορισμό ή antigen capture ELISA με αντισώματα ειδικά για την οροομάδα των BT που ανιχνεύουν πρωτεΐνες όπως η VP7 [11].

Η τυποποίηση γίνεται με οροεξουδετέρωση [11]. Μ' αυτή την τεχνική διακρίνονται οι 24 ορότυποι βάσει αντίδρασης της ειδικής για τον ορότυπο πρωτεΐνης VP2 με ειδικά αντισώματα. Τα τεστ εξουδετέρωσης γίνονται συνήθως σε κυτταροκαλλιέργειες. Σημαντική είναι η χρήση αντιορών control για τον καθορισμό της απαιτούμενης συγκέντρωσης αντιορού που εξουδετερώνει συγκεκριμένο τίτλο ιού. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος εξουδετέρωσης είναι αυτή όπου διαδοχικές αραιώσεις ιού ενοφθαλμίζονται σε καλλιέργεια σε πλάκες τιτλοποίησης και επωάζονται με συγκεκριμένη ποσότητα αντιορού. Οι κυτταροκαλλιέργειες παρακολουθούνται καθημερινά για 1-3 ημέρες για κυτταροπαθογόνο δράση. Στα φρεάτια της πλάκας όπου δεν παρατηρείται κυτταροπαθογόνος δράση, ο ιός εξουδετερώνεται από τα αντισώματα του ιού. Στα φρεάτια όπου παρατηρείται κυτταροπαθογόνος δράση σημαίνει ότι ο ιός δεν έχει εξουδετερωθεί από τα αντισώματα του ορού είτε επειδή δεν είναι ειδικά, είτε επειδή ο ιός έχει πολύ υψηλό τίτλο. Ο ιός τελικά χαρακτηρίζεται από τον πιο «ισχυρό» ορότυπο, δηλαδή αυτόν που εξουδετερώνεται από τον αντιορό που αναστέλλει την κυτταροπαθογόνο δράση στη

μικρότερη αραιώση του ιού (δηλαδή μεγαλύτερη συγκέντρωση ιού). Για την αποφυγή λανθασμένων αποτελεσμάτων λόγω των διασταυρούμενων αντιδράσεων ανάμεσα στους ορότυπους πρέπει να χρησιμοποιείται εξαρχής υψηλός τίτλος ιού.

Οι παραπάνω μέθοδοι παρόλο που έχουν τη δυνατότητα ανίχνευσης ζωντανού ιού είναι εξαιρετικά χρονοβόρες, καθώς η ολοκληρωμένη διάγνωση γίνεται μέσα σε αρκετές μέρες ή ακόμη και εβδομάδες. Αναγκαία κρίθηκε λοιπόν η χρήση πιο άμεσων, ευαίσθητων και ειδικών μεθόδων για τη διάγνωση, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

### **Ανάπτυξη και εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για την ταχεία ανίχνευση του καταρροϊκού πυρετού και την τυποποίηση του ιού**

Η ταχεία ανίχνευση του καταρροϊκού πυρετού είναι πολύ σημαντική για την αντιμετώπιση της εξάπλωσης της ασθένειας, δεδομένου του τρόπου μετάδοσης. Η PCR αποτελεί την πιο ειδική, ευαίσθητη και άμεση μέθοδο ανίχνευσης και τυποποίησης σε σχέση με τις ορολογικές και ανοσολογικές τεχνικές. Με την εφαρμογή της, ως διαγνωστικής τεχνικής, το κέρδος χρόνου από τη στιγμή που συλλέγεται το κλινικό δείγμα ως τη διάγνωση είναι πολύ σημαντικό, αφού δεν απαιτεί τόσο υψηλό τίτλο ιού, με αποτέλεσμα την αποφυγή των χρονοβόρων σειριακών περασμάτων του δείγματος από κυτταροκαλλιέργειες και εμβρυοφόρα αυγά κότας.

Επιπλέον, η PCR σε συνδυασμό με την αλληλούχηση των γονιδίων φαίνεται χρήσιμη στον καθορισμό και άλλων χαρακτηριστικών για τα οποία οι προηγούμενες τεχνικές δεν μπορούν να δώσουν καμία πληροφορία, όπως τις φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα στα στελέχη και τη γεωγραφική προέλευση του ιού (typing) βάσει της αλληλουχίας του γονιδίου της VP3 ή της VP6 [11].

Η βασική της διαφορά με τις άλλες τεχνικές είναι η ανίχνευση γενετικού υλικού και όχι ζωντανού ιού. Δεδομένου ότι το γενετικό υλικό του ιού είναι ανιχνεύσιμο για αρκετό καιρό μετά από τη μόλυνση, η PCR δεν επαρκεί για την ανίχνευση ζωντανού μολυσματικού ιού [11]. Έτσι, αν θεωρείται χρήσιμο πέρα από τη διάγνωση να γνωρίζουμε αν ζωντανός ιός συνεχίζει να υπάρχει στον οργανισμό του ζώου (για παράδειγμα στην περίπτωση των βοοειδών ή ζώων που νοσούν αλλά δεν πεθαίνουν) η PCR θα πρέπει να συνδυαστεί απαραίτητως με κυτταροκαλλιέργειες και την παρατήρηση κυτταροπαθογόνου δράσης. Επίσης, μπορεί να γίνει ποσοτική PCR σε 2-3 δείγματα με διαφορά 10-15 ημερών έκαστο δείγμα.

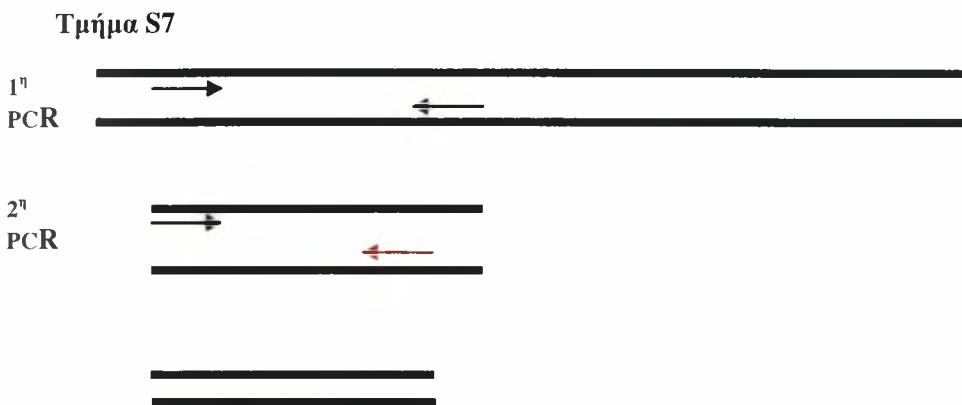
Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η ανάπτυξη και εφαρμογή της RT-PCR για την ανίχνευση των 24 ορότυπων του ιού του καταρροϊκού πυρετού και την τυποποίησή τους. Η τυποποίηση αφορά μόνο τους τέσσερις ορότυπους (1,4,9,16) που εμφανίστηκαν στην Ελλάδα κατά τις περιόδους επιζωοτίας του καταρροϊκού πυρετού (1979, 1998-2001), καθώς και έναν ακόμα ορότυπο (2) που αποτελεί απειλή για την Ελλάδα καθώς κυκλοφορεί σε περιοχές της Μεσογείου.

Για την RT (reverse transcriptase)-PCR χρησιμοποιήθηκαν random d(N)<sub>9</sub> primers ως εκκινητικά μόρια, δηλαδή μονόκλινα εννιαμερή νουκλεοτιδίων σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς. Τα μόρια αυτά έχουν την ικανότητα να υβριδίζονται σε πολλές διαφορετικές περιοχές του RNA. Με τη δράση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφής παράγονται τμήματα cDNA που προέρχονται από όλα τα mRNA που υπάρχουν στο προϊόν της εκχύλισης. Τελικά, επιτυγχάνεται η αντίστροφη μεταγραφή μεγάλου μέρους του γενώματος – και της 5' αμετάφραστης περιοχής.



Για την ανίχνευση του ιού του καταρροϊκού πυρετού, ως μόριο στόχος επιλέχθηκε μια περιοχή του γενώματος του τμήματος S7. Το τμήμα αυτό, όπως έχει προαναφερθεί, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη VP7 που είναι περισσότερο συντηρημένη σε κάθε οροομάδα των orbiviruses, ενώ διαφέρει ανάμεσα στις ομάδες. Τα εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση του ιού του καταρροϊκού πυρετού σχεδιάστηκαν σε περιοχή του γονιδίου του τμήματος S7 συντηρημένη ανάμεσα στους ορότυπους και είναι ειδικά για την ανίχνευση ιών που ανήκουν στην οροομάδα των BT (serogroup-specific primers). Σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητικών μορίων, καθώς εφαρμόστηκε η τεχνική αυξημένης ευαισθησίας semi-nested PCR (Εικ. 13).

Σ' αυτήν την τεχνική τα δύο ζεύγη έχουν κοινό το ένα από τα δύο εκκινητικά μόρια (στη συγκεκριμένη περίπτωση το αριστερό). Το δεξί εκκινητικό μόριο για το δεύτερο ζεύγος είναι λίγα νουκλεοτίδια πιο μέσα στο μόριο στόχο, σε σχέση με αυτό του πρώτου ζεύγους. Η PCR εφαρμόζεται αρχικά με εκκινητικά μόρια το ζεύγος του κοινού αριστερού και του δεξιού εξωτερικού εκκινητικού μορίου. Το προϊόν της πρώτης PCR χρησιμοποιείται σα μόριο στόχος και υποβάλλεται σε δεύτερη PCR με εκκινητικά μόρια αυτή τη φορά το ζεύγος του αριστερού εκκινητικού μορίου και του εσωτερικού δεξιού εκκινητικού μορίου. Το προϊόν της δεύτερης PCR είναι το ίδιο με αυτό της πρώτης (μικρότερο μόνο λίγες βάσεις) ενισχυμένο σε μεγαλύτερο βαθμό. Έτσι, αυξάνεται η ευαισθησία της αντίδρασης και ανιχνεύονται μόρια που δεν ήταν ανιχνεύσιμα στην πρώτη αντίδραση.



Εικόνα 13. Semi-nested PCR.

Για την τυποποίηση του ιού, ως μόριο στόχος επιλέχθηκε κάθε φορά περιοχή του τμήματος L2 συντηρημένη ανάμεσα στα στελέχη κάθε ορότυπου. Το τμήμα αυτό κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης του καψιδίου VP2 που διαφέρει ανάμεσα στους 24 ορότυπους του BT ιού. Ο σχεδιασμός των εκκινητικών μορίων για τη διάκριση των οροτύπων (serotype-specific primers) ήταν πολύ δύσκολη διαδικασία, επειδή το γονίδιο αυτό είναι αρκετά μεταβλητό ακόμα και ανάμεσα σε στελέχη του ίδιου ορότυπου.



## Υλικά και Μέθοδοι

### Δείγματα

Για την ταυτοποίηση του ιού και την τυποποίηση χρησιμοποιήθηκαν 24 πρότυπα στελέχη αναφοράς σε καλλιέργειες BHK (ένα από κάθε ορότυπο, BTV1-BTV24) που αποκτήθηκαν από το παγκόσμιο εργαστήριο αναφοράς για τον καταρροϊκό πυρετό (OIE reference laboratory, Onderstepoort Veterinary Institute, S.Africa) και στελέχη από 31 κλινικά δείγματα (αίμα ή σπλήνας) που απομονώθηκαν σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας κατά τις ελληνικές επιζωotίες (ορότυποι 1, 4, 9, 16) (Πίνακας 4).

Για την τυποποίηση του ιού χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον 10 στελέχη σε καλλιέργειες BHK που απομονώθηκαν από επιζωotίες σε άλλες περιοχές του κόσμου (ορότυποι 2 και 16) (Institute for animal health, Pirbright Laboratory, UK) (Πίνακας 5).

Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν στελέχη EHDV-1, EHDV-318 και AHSV-9, καθώς και BHK κύτταρα μη μολυσμένα με ιό.

Πίνακας 4. Στοιχεία δειγμάτων που απομονώθηκαν κατά τις ελληνικές επιζωotίες. Ο ορότυπος όπως έχει καθοριστεί με τεστ εξουδετέρωσης. Στη στήλη ιστορικό καλλιέργειας αναφέρεται το ιστορικό καλλιέργειας του δείγματος ως την απόκτηση τίτλου ικανοποιητικού για την πραγματοποίηση της εξουδετέρωσης. Το E αναφέρεται σε περάσματα σε αγνά, ο αριθμός που ακολουθεί, στον αριθμό των περασμάτων. Ο αριθμός που ακολουθεί τα BHK αναφέρεται στον αριθμό διόδων από κυτταροκαλλιέργειες.

Κωδικός δείγματος	Στέλεχος	Ιστορικό καλλιέργειας	Περιοχή και χρονιά απομόνωσης	Δείγμα	Ζώο που απομονώθηκε το δείγμα	Ορότυπος
F1	GR79LS	E2BHK5	Λέσβος 1979	Σπλήνας	Πρόβατο	BTV4
F2	GR199/7a/98RS	E2BHK8	Ρόδος 1998	Αίμα	Πρόβατο	BTV9
F3	GR180/99RS	E2BHK4	Ρόδος 1999	Αίμα	Πρόβατο	BTV4
F4	GR228/99EG	E2BHK4	Έβρος 1999	Αίμα	Αίγα	BTV4
F5	GR308/99RS	E2BHK8	Ρόδος 1999	Αίμα	Πρόβατο	BTV16
F6	GR408/99ChS	E2BHK4	Χαλκιδική 1999	Αίμα	Πρόβατο	BTV9
F7	GR395/99LS	E2BHK6	Λέσβος 1999	Σπλήνας	Πρόβατο	BTV4
F8	GR413/99L	E2BHK5	Λέσβος 1999	Αίμα	Πρόβατο	BTV4
F9	GR280/99RoS	E2BHK8	Ροδόπη 1999	Σπλήνας	Πρόβατο	BTV4
F10	GR279/Ros	E2BHK5	Ροδόπη 1999	Σπλήνας	Πρόβατο	BTV4
F11	GR692/99EvS	E2BHK6	Εύβοια 1999	Σπλήνας	Πρόβατο	BTV4
F12	GR610/99EvS	E2BHK7	Εύβοια 1999	Σπλήνας	Πρόβατο	BTV4
F13	GR457/99PS	E2BHK7	Περία 1999	Σπλήνας	Πρόβατο	BTV4
F14	GR631/99MaS	E2BHK7	Μαγνησία	Αίμα	Πρόβατο	BTV4

F15	GR382/99LS	E2BHK7	1999 Λέσβος 1999	Σπλήνας	Πρόβατο	BTV4
F16	GR378/99CB	E2BHK7	Χίος 1999	Αίμα	Βοοειδές	BTV4
F17	GR1217/00ArS	E2BHK2	Άρτα 2000	Αίμα	Πρόβατο	BTV4
F18	GR1472/01LS	BHK2	Λέσβος 2001	Αίμα	Πρόβατο	BTV1
F19	GR1472/01LS	BHK3	Λέσβος 2001	Αίμα	Πρόβατο	BTV1
F20	GR1472/01LS	BHK3	Λέσβος 2001	Αίμα	Πρόβατο	BTV1
F21	GR1472/01LS	BHK3	Λέσβος 2001	Σπλήνας	Πρόβατο	BTV1
F22	GR1472/01LS	BHK3	Λέσβος 2001	Σπλήνας	Πρόβατο	BTV1
F23	GR1217/00ArS	E2BHK3	Άρτα 2000	Αίμα	Πρόβατο	BTV4
F24	GR1513/01LS	BHK6	Λέσβος 2001	Αίμα	Πρόβατο	BTV1
F25	GR1173/01IOS	BHK7	Ιωάννινα 2001	Αίμα	Πρόβατο	BTV1
F26	GR1173/01IOS	BHK8	Ιωάννινα 2001	Αίμα	Πρόβατο	BTV1
F27	GR1173/01IOS	BHK8	Ιωάννινα 2001	Αίμα	Πρόβατο	BTV1
F28	GR1245/01IOS	E1BHK9	Ιωάννινα 2001	Σπλήνας	Πρόβατο	BTV1
F29	GR2192/01RS	BHK8	Ρόδος 2001	Αίμα	Πρόβατο	BTV1
F30	GR15/01GRES	BHK7	Θεσπρωτία 2001	Σπλήνας	Πρόβατο	BTV1
F31	GR1871/01THESS	E1BHK6	Λέσβος 2001	Σπλήνας	Πρόβατο	BTV1

Πίνακας 5. Στοιχεία στελεχών που απομονώθηκαν από επιζωοτίες σε περιοχές εκτός Ελλάδας.

Κωδικός δείγματος	Στέλεχος	Περιοχή και χρονιά απομόνωσης	Ορότυπος
BTV 2 ITL	ITL 2002/01	ΣΙΚΕΛΙΑ 2002	BTV2
BTV2 SAD 2001	SAD 2001/03	ΣΑΡΔΗΝΙΑ 2001	BTV2
BTV2 SAD 2002	SAD 2002/03	ΣΑΡΔΗΝΙΑ 2002	BTV2
BTV2 FRA	FRA 2001/03	ΚΟΡΣΙΚΗ 2001	BTV2
BTV2 IND	IND 2003/03	ΙΝΔΙΑ 2003	BTV2
BTV16 AUS	AUS 1986/02	ΑΥΣΤΡΑΛΙΑ 1986	BTV16
BTV 16 TUR	TUR 2000/09	ΤΟΥΡΚΙΑ 2000	BTV16
BTV 16 ISR	ISR 2003/01	ΙΣΡΑΗΛ 2003	BTV16
BTV 16 NIG	NIG 1982/10	ΝΙΓΗΡΙΑ 1982	BTV16
BTV 16 ISA	ISA 1991/01	ΙΝΔΟΝΗΣΙΑ 1991	BTV16

### Προετοιμασία των δειγμάτων

Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR προήλθαν από καλλιέργειες σε BHK των παραπάνω στελεχών, σε θρεπτικό υλικό Dulbecco με 1% ορό εμβρύου μόσχου. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε κλίβανο στους 37°C σε 5% CO<sub>2</sub> μετά τον ενοφθαλμισμό ως την εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσεως. Έπειτα συντηρήθηκαν στους 4°C.

Η ανίχνευση του ιού και η τυποποίηση για όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από τις ελληνικές επιζωοτίες είχε γίνει αρχικά με τεστ εξουδετέρωσης σε BHK κύτταρα (Πίνακας 4).

Τα 31 κλινικά δείγματα πριν περαστούν σε καλλιέργειες είχαν επεξεργαστεί καταλλήλως ώστε ο τίτλος του ιού να είναι ικανοποιητικός για την εξουδετέρωση: η αιμοληψία των ζώων έγινε σε EDTA και τα ερυθρά πλύθηκαν τρεις φορές με PBS ενώ οι σπλήνες ομογενοποιήθηκαν σε PBS. Τα πλυμένα ερυθρά και το ομογενοποίημα καταστράφηκαν με υπερήχους. 0,1ml του δείγματος ενοφθαλμίστηκαν ενδοφλεβίως σε εμβρυοφόρα αυγά κότας 12 ημερών και τα αυγά επώαστηκαν σε κλίβανο στους 35°C. Καθημερινά γινόταν ωσκόπηση για 7 ημέρες. Οι θάνατοι του πρώτου 24ώρου θεωρήθηκαν μη ειδικοί. Τα έμβρυα που πέθαναν ανάμεσα στη 2 και 7 ημέρα ομογενοποιήθηκαν, αφού πρώτα τους αφαιρέθηκαν τα πόδια και το ράμφος [11]. Το προϊόν ενοφθαλμίστηκε σε καλλιέργειες. Για τα έμβρυα που δεν πέθαναν μεσολάβησε δεύτερη διόδος σε αυγά. Οι καλλιέργειες παρακολουθούνταν για 7 ημέρες για την εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης. Σε περίπτωση που δεν εμφανιζόταν κυτταροπαθογόνος δράση μέσα σε αυτό το διάστημα γινόταν δεύτερη διόδος σε κυτταροκαλλιέργεια. Το ιστορικό καλλιέργειας κάθε δείγματος αναφέρεται στον πίνακα 4.

### Εκχύλιση γενετικού υλικού

Η εκχύλιση του γενετικού υλικού έγινε για όλα τα δείγματα με τη μέθοδο του Casas (GuSCN) [12] απευθείας από τις κυτταροκαλλιέργειες με εμφανή κυτταροπαθογόνο δράση. Το προϊόν της εκχύλισης εναιωρήθηκε σε 200μl νερό ελεύθερο νουκλεασών και συντηρήθηκε στους -80°C ώσπου να χρησιμοποιηθεί για την RT-PCR.

### Primers

Για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν ως προς την ποιότητα της εκχύλισης και την RT-PCR με ένα ζεύγος εκκινητικών μορίων που υβριδίζονται στο γονίδιο της α-τουμπουλίνης (L1: 5'-GTAAATACATGGCTTGCTG-3' nt position: 1011-1029, R2: 5'-CACACCAACCTCCTCATAA-3' nt position: 1375-1393, accession no: BC 009509, PCR product 382bp).

Για το σχεδιασμό των εκκινητικών μορίων για την ταυτοποίηση και την τυποποίηση του ιού έγινε χρήση των αλληλουχιών που έχουν καταχωρηθεί στη GenBank και χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα ClustalW, Blastn και primer3 Input primer design. Δημιουργήθηκαν τα εξής ζεύγη εκκινητικών μορίων:

- Για την ανίχνευση των 24 οροτύπων των BT ιών (serogroup-specific primers):  
**BTV4/7L- BTV4/7R1**  
**BTV4/7L- BTV4/7R2** (semi-nested PCR)
  
- Για την τυποποίηση του ιού (serotype-specific primers):  
Ορότυπος 1: **BTV1/2L1- BTV1/2R2**  
Ορότυπος 2: **BTV2/2KL1- BTV2/2KR1**  
Ορότυπος 4: **BTV4/2KL1- BTV4/2KR1**  
Ορότυπος 9: **BTV9/2KL1- BTV9/2KR1**  
Ορότυπος 16: **BTV16L- BTV16R**  
**BTV16/2KL1- BTV16/2KR1**



Τα στοιχεία σχετικά με τα εκκινητικά μόρια παρατίθενται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Στοιχεία σχετικά με τα εκκινητικά μόρια.

Όνομασία	Αλληλουχία (5'→3')	Θερμοκρασία τήξης (T <sub>m</sub> )	Τμήμα γενώματος	Θέση (nt)
BTV4/7L	ATAGCGTGGGATGGACAAGC	62°C	7	684-704
BTV4/7R1	TCCCACAACCGACACACC	58°C	7	1098-1116
BTV4/7R2	GTAACCCACACCCGTGCAA	60°C	7	1073-1092
BTV1/2L1	ATGGTATGATTGGAGTGTT	52°C	2	1169-1188
BTV1/2R2	ATTGGTGCTATTATCCACTT	54°C	2	1571-1591
BTV2/2KL1	CATTC A/G GAGAGAGC G/A TC G/A AC	51,8°C	2	572-592
BTV2/2KR1	CCA T/C CCA CCA TCT AT A/T AT T/C TCC	51,1°C	2	1434-1456
BTV4/2KL1	CGGATGCTAA G/A TGGATGAAGTG	54,8°C	2	299-321
BTV4/2KR1	CTC C/T TGATCCCA T/C CC A/G CCT	49,2°C	2	1412-1431
BTV9/2KL1	GGAAAGCGATAGATGTGCC	54,5 °C	2	23-42
BTV9/2KR1	GCATGATGTTGGTTTTCTCT	52 °C	2	842-862
BTV16L	TAAACCGCGAGATTGGAAC	60°C	2	250-270
BTV16R	AAGGGGTTACCCTCCTCCTT	60°C	2	530-549
BTV16/2KL1	CACACAAAACACACCGTAC	48,9°C	2	983-1002
BTV16/2KR1	C A/G TTTGAATCATCTC C/T CC	48,6°C	2	1392-1410

### RT-PCR, PCR

Η RT-PCR και η PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή Gene Amp 9700.

Για την RT-PCR, αρχικά αναμίχθηκαν 5μl από το εκχυλισμένο RNA και 2μl d(N)9 primers (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) και τοποθετήθηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή για 5min στους 70°C. Έπειτα, τα tubes τοποθετήθηκαν στον πάγο, όπου προστέθηκαν σε κάθε tube 5μl 5X M-MuLV Reaction Buffer, 5μl dNTPs (1mM) (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK), 6.5μl H<sub>2</sub>O ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), 0.5μl Rnasin Inhibitor 40u/μl (HT Biotechnology, UK), 1μl 200u/μl M-MuLV RT (Promega Corporation, Madison WI, USA) και τοποθετήθηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή για 60min στους 37°C. Η M-MuLV RT απενεργοποιήθηκε με θέρμανση στους 95°C για 5min. Τα cDNAs συντηρήθηκαν στους -20°C.

Για την PCR αναμίχθηκαν 5μl cDNA με 45μl PCR mix: 5μl dNTPs (1mM) (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK), 5μl Taq 10X PCR Buffer, 2μl primers, 2μl MgCl<sub>2</sub> (2mM), 30,6μl H<sub>2</sub>O ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) και 0,4μl 5u/μl Taq Polymerase (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK). Ο αρχικός χρόνος αποδιάταξης για όλες τις αντιδράσεις ήταν 5min στους 95°C και ο τελικός χρόνος επέκτασης ήταν 15min στους 74°C. Οι χρόνοι και οι θερμοκρασίες για κάθε στάδιο της PCR συνοψίζονται στον πίνακα 7 για όλες τις αντιδράσεις.



Πίνακας 7. Συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιήθηκε κάθε PCR και μέγεθος των προϊόντων.

Primers	Συνθήκες	Κύκλοι	Μέγεθος προϊόντος (bp)
BTV4/7L- BTV4/7R1	95°C 10'' 60°C 10'' 72°C 10''	40	433
BTV4/7L- BTV4/7R2	95°C 10'' 60°C 10'' 72°C 10''	30	409
BTV1/2L1- BTV1/2R2	95°C 10'' 50°C 10'' 72°C 10''	40	423
BTV2/2KL1- BTV2/2KR1	95°C 20'' 44°C 20'' 72°C 20''	40	843
BTV4/2KL1- BTV4/2KR1	95°C 10'' 44°C 10'' 72°C 10''	45	1132
BTV9/2KL1- BTV9/2KR1	95°C 20'' 44°C 20'' 72°C 20''	40	840
BTV16L- BTV16R	95°C 10'' 60°C 10'' 72°C 10''	40	300
BTV16/2KL1- BTV16/2KR1	95°C 10'' 40°C 10'' 72°C 10''	40	428

### Ηλεκτροφόρηση

10μl από κάθε προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 2% (GIBCOBRL, Life Technologies) που περιείχε 1μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (GIBCOBRL, Life Technologies), σε TBE 1X buffer (0.045 mM Tris-borate, pH 8.6, 1.5 mM EDTA). Χρησιμοποιήθηκαν δύο μάρτυρες μοριακού βάρους (1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK και DNA Molecular Weight Marker, M100bp, DIALAT Ltd, Russia).

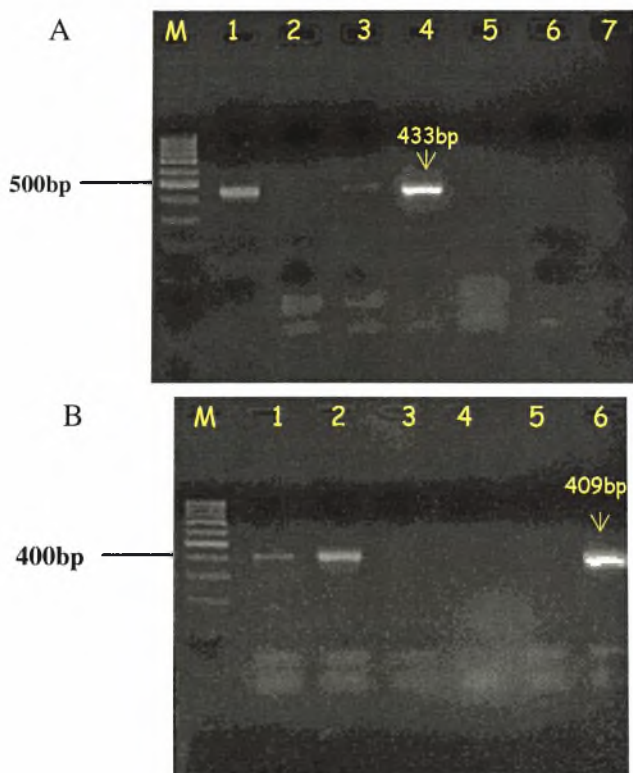
## Αποτελέσματα

Όλα τα δείγματα (αρνητικά και θετικά) έδωσαν προϊόν 382bp με τα εκκινητικά μόρια για το γονίδιο της α-τουμπουλίνης, που σημαίνει ότι η εκχύλιση και η RT είχαν πραγματοποιηθεί σωστά. Επειδή η α-τουμπουλίνη είναι πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, τα αποτελέσματα της PCR με αυτά τα εκκινητικά μόρια αφορούν τα κυτταρικά mRNAs που απομονώνονται κατά την εκχύλιση, συνεπώς, πέρα από την ποιότητα των τεχνικών δε δίνουν καμιά πληροφορία όσον αφορά τα ιικά σωματίδια.

### Serogroup-specific PCR

Με τα ειδικά για την ορομάδα των BT εκκινητικά μόρια ανιχνεύθηκαν οι 23 από τους 24 ορότυπους (δεν ανιχνεύθηκε ο ορότυπος 7) από τα πρότυπα στελέχη αναφοράς. Επίσης ανιχνεύθηκαν όλα τα ελληνικά στελέχη (ορότυποι 1,4, 9 και 16). Όσα από τα στελέχη δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου ή όχι σε ικανοποιητικό βαθμό με την πρώτη PCR (ζεύγος BTV4/7L- BTV4/7R1) λόγω χαμηλής συγκέντρωσης ιικών σωματιδίων, υποβλήθηκαν σε δεύτερη PCR με το ζεύγος εκκινητικών μορίων για τη semi-nested PCR (BTV4/7L- BTV4/7R2) και με το οποίο ανιχνεύθηκαν.

Επιπλέον, αυτά τα εκκινητικά μόρια δεν ανίχνευαν ιούς από τις συγγενείς ορομάδες AHS και EHD (Εικ. 14). Τα αποτελέσματα αναλύονται στους πίνακες 8 και 9.



Εικόνα 14. Α. Αποτελέσματα PCR με ζεύγος BTV4/7L-BTV4/7R1. Στήλη M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (DNA Molecular Weight Marker, M100bp, DIALAT Ltd, Russia), 1: BTV 12 στέλεχος αναφοράς, 2: BTV 15 στέλεχος αναφοράς, 3: BTV 19 στέλεχος αναφοράς, 4: BTV 24 στέλεχος αναφοράς- θετικός μάρτυρας, 5:AHS 9, 6: EHD 1, 7: BHK κύτταρα μη μολυσμένα με ιό. 5, 6, 7 αρνητικοί μάρτυρες. Β. Αποτελέσματα PCR με ζεύγος BTV4/7L-BTV4/7R2 (semi-nested PCR). Στήλη M: Μάρτυρας μοριακού βάρους που μετράει ανά 100bp, 1: BTV 15 στέλεχος αναφοράς, 2: BTV 19 στέλεχος αναφοράς, 3: AHS 9, 4: H<sub>2</sub>O, 5: EHD 1, 6: BTV 1 στέλεχος αναφοράς, 3,4,5 αρνητικοί μάρτυρες, 6 θετικός μάρτυρας. Τα πρότυπα στελέχη BTV 15 και BTV 19 που δεν ανιχνεύονται σε ικανοποιητικό βαθμό στην πρώτη PCR, ανιχνεύονται με μεγαλύτερη επιτυχία στη semi-nested PCR. Το H<sub>2</sub>O χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για τον έλεγχο επιμολύνσεων.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα serogroup-specific PCR για τα πρότυπα στελέχη αναφοράς. Όσα δείγματα ήταν θετικά από την πρώτη αντίδραση δεν υποβλήθηκαν σε δεύτερη. Το – σημαίνει ότι τα δείγματα ήταν αρνητικά.

Ορότυπος	ΒTV4/7L- ΒTV4/7R1	ΒTV4/7L- ΒTV4/7R2
ΒTV1	433	
ΒTV2	433	
ΒTV3	-	409
ΒTV4	433	
ΒTV5	433	
ΒTV6	433	
ΒTV7	-	-
ΒTV8	433,faint	409
ΒTV9	-	409
ΒTV10	433,faint	409
ΒTV11	433	409
ΒTV12	433	
ΒTV13	-	409
ΒTV14	-	409
ΒTV15	433,faint	409
ΒTV16	-	409
ΒTV17	-	409
ΒTV18	-	409
ΒTV19	433,faint	409
ΒTV20	433	
ΒTV21	433	
ΒTV22	433,faint	409
ΒTV23	-	409
ΒTV24	433	
EHDV-1	-	-
EHDV-318	-	-
AHSV-9	-	-
BHK cells	-	

Πίνακας 9. Αποτελέσματα serogroup-specific PCR για τα ελληνικά στελέχη από τα 31 κλινικά δείγματα. Όσα δείγματα ήταν θετικά από την πρώτη αντίδραση δεν υποβλήθηκαν σε δεύτερη. Το – σημαίνει ότι τα δείγματα ήταν αρνητικά.

Κωδικός δείγματος	ΒΤV4/7L ΒΤV4/7R1	ΒΤV4/7L ΒΤV4/7R2
F1	433	
F2	-	409
F3	433	
F4	433	
F5	433	
F6	433	
F7	433	
F8	433	
F9	433	
F10	433	
F11	433	
F12	433	
F13	433	
F14	433	
F15	433	
F16	433	
F17	433	
F18	433	
F19	433,faint	409
F20	433,faint	409
F21	433	
F22	433	
F23	433	
F24	433	
F25	433	
F26	433	
F27	433	
F28	433	
F29	433	
F30	433	
F31	-	409



## Serotype-specific PCR

### Ορότυπος 1

Το ζεύγος BTV1/2L1- BTV1/2R2 ανίχνευσε το πρότυπο στέλεχος αναφοράς ορότυπου 1 και δεν ανίχνευσε κανέναν άλλο ορότυπο από τα πρότυπα στελέχη αναφοράς. Επίσης ανίχνευσε όλα τα ελληνικά στελέχη που είχαν ταυτοποιηθεί ως ορότυπος 1 στο τεστ εξουδετέρωσης, ενώ έδωσε αρνητικά αποτελέσματα με τα στελέχη που ανήκουν στους άλλους ορότυπους.

### Ορότυπος 2

Το ζεύγος BTV2/2KL1- BTV2/2KR1 ανίχνευσε όλα τα διαθέσιμα στελέχη οροτύπου 2, δεν ανίχνευσε όμως το στέλεχος αναφοράς.

### Ορότυπος 4

Το ζεύγος BTV4/2KL1- BTV4/2KR1 ανίχνευσε το πρότυπο στέλεχος αναφοράς ορότυπου 4, δεν ανίχνευσε κανένα όμως από τα στελέχη των κλινικών δειγμάτων που είχαν ταυτοποιηθεί ως ορότυπος 4 με το τεστ εξουδετέρωσης.

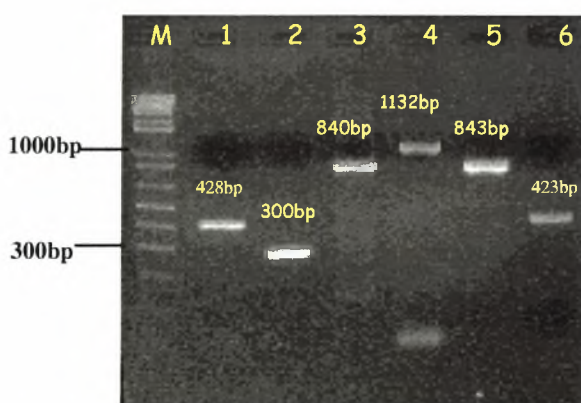
### Ορότυπος 9

Το ζεύγος BTV9/2KL1- BTV9/2KR1 δεν ανίχνευσε το πρότυπο στέλεχος αναφοράς και το ένα από τα δύο ελληνικά στελέχη ορότυπου 9 (F6 GR408/99ChS). Ανίχνευσε ένα μόνο ελληνικό στέλεχος (F2 GR199/7a/98RS).

### Ορότυπος 16

Το ζεύγος BTV16L- BTV16R ανίχνευσε το πρότυπο στέλεχος αναφοράς οροτύπου 16 και το μοναδικό ελληνικό στέλεχος οροτύπου 16 (F5 GR308/99RS), ενώ έδωσε αρνητικά αποτελέσματα για τους υπόλοιπους ορότυπους των προτύπων στελεχών αναφοράς και τα ελληνικά στελέχη που ανήκουν στους άλλους ορότυπους. Δεν ανίχνευσε όμως κανένα από τα διαθέσιμα ξένα στελέχη οροτύπου 16. Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκε ένα δεύτερο ζεύγος εκκινητικών μορίων για τον ορότυπο 16, σε διαφορετική περιοχή του γενόματος, το ζεύγος BTV16/2KL1- BTV16/2KR1. Αυτό το ζεύγος ανίχνευσε το πρότυπο στέλεχος αναφοράς οροτύπου 16 και όλα τα υπόλοιπα στελέχη (ελληνικό και ξένα) οροτύπου 16.

Ενδεικτικά κάποια από τα στελέχη που ανιχνεύθηκαν με κάθε ζεύγος εκκινητικών μορίων φαίνονται στην εικόνα 15.



Εικόνα 15. M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK), 1: BTV16 ISR, 2: F5 BTV16, 3: F2 BTV9, 4: BTV4 στέλεχος αναφοράς, 5: BTV2 SAD 2002, 6: F19 BTV1

## Συζήτηση

Η εφαρμογή της RT-PCR ως διαγνωστική τεχνική για την ανίχνευση και την τυποποίηση του ιού του καταρροϊκού πυρετού πλεονεκτεί έναντι των συμβατικών τεχνικών σε ταχύτητα και ειδικότητα. Η ανάπτυξη όμως μιας τέτοιας τεχνικής κυρίως όσον αφορά τη διάκριση των οροτύπων όπως περιγράφηκε παραπάνω αποδείχθηκε σχετικά δύσκολη, λόγω του ότι τα γονίδια που επιλέχθηκαν για το σχηματισμό των εκκινητικών μορίων είναι αρκετά μεταβλητά και τα στοιχεία που είναι ως τώρα καταχωρημένα στη GenBank δεν επαρκούν για την εύρεση υψηλά συντηρημένων περιοχών και το σωστό σχεδιασμό εκκινητικών μορίων.

Για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, μετά την RT όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν με τα εκκινητικά μόρια L1 και R2. Αυτά τα εκκινητικά μόρια υβριδίζονται στο γονίδιο της α-τουμπουλίνης και επιτρέπουν τον έλεγχο της εκχύλισης και της RT. Έτσι, γνωρίζοντας ότι η εκχύλιση και η RT έχουν δουλέψει για ένα δείγμα, το αρνητικό αποτέλεσμα της PCR είτε για την ταυτοποίηση είτε για την τυποποίηση αποδίδεται σε μη υβριδισμό των εκκινητικών μορίων.

Τα ζεύγη BTV4/7L- BTV4/7R1 και BTV4/7L- BTV4/7R2 σχεδιασμένα σε υψηλά συντηρημένη ανάμεσα στους ορότυπους περιοχή του τμήματος 7, ανίχνευσαν 23 από τους 24 ορότυπους ΒΤ. Δεν ανίχνευσαν τον ορότυπο 7. Φαίνεται ότι ο ιός οροτύπου 7 παρουσιάζει μεγαλύτερη ποικιλομορφία στη συγκεκριμένη περιοχή του τμήματος 7, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο υβριδισμός των εκκινητικών μορίων. Επίσης, τα ζεύγη αυτά είναι ειδικά για την ανίχνευση των ιών που ανήκουν στην οροομάδα των ΒΤ, αφού δεν ανίχνευσαν στελέχη ιών από τις συγγενείς οροομάδες EHD και AHS.

Τα ζεύγη BTV1/2L1- BTV1/2R2 και BTV16/2KL1- BTV16/2KR1 θεωρούνται ειδικά για την ανίχνευση των ιών οροτύπων 1 και 16 αντίστοιχα, αφού ανίχνευσαν τα αντίστοιχα πρότυπα στελέχη αναφοράς και όλα τα διαθέσιμα στελέχη των αντίστοιχων οροτύπων. Όλα τα υπόλοιπα ζεύγη που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση ανίχνευσαν μερικά μόνο από τα διαθέσιμα στελέχη του οροτύπου για τον οποίο σχεδιάστηκαν. Το τμήμα 2 στο οποίο σχεδιάστηκαν όλα τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην τυποποίηση είναι ιδιαίτερα μεταβλητό, σε πολλές περιπτώσεις ακόμα και ανάμεσα στα στελέχη του ίδιου οροτύπου. Επιπλέον, οι αλληλουχίες που έχουν ως τώρα καταχωρηθεί στη GenBank για τους ορότυπους που έγινε προσπάθεια τυποποίησης είναι πολύ λίγες, με αποτέλεσμα να είναι ακόμα πιο δύσκολη η εύρεση συντηρημένων αλληλουχιών και ο σχεδιασμός των εκκινητικών μορίων. Φαίνεται λοιπόν, ότι οι περιοχές στις οποίες σχεδιάστηκαν τα εκκινητικά μόρια αν και συντηρημένες ανάμεσα στα καταχωρημένα στελέχη για κάθε ορότυπο, δεν είναι συντηρημένες για αρκετά από τα στελέχη που κυκλοφορούν και δεν έχουν ακόμη αλληλουχηθεί και καταχωρηθεί.

Συμπερασματικά, η προσπάθεια αλληλούχησης αυτού του μεταβλητού γονιδίου σε όσο το δυνατόν περισσότερα στελέχη θα διευκολύνει το σχεδιασμό εκκινητικών μορίων και την ανάπτυξη και εφαρμογή της PCR. Πολύ σημαντική επίσης, φαίνεται η ανάπτυξη μιας multiplex-PCR για την τυποποίηση και την ανίχνευση ταυτόχρονων μολύνσεων με περισσότερους από έναν ορότυπους.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Ορέστη Α Παπαδόπουλου, Λοιμώδη νοσήματα των ζώων, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 1987
2. Peter C. Mertens and Philip S. Mellor, Bluetongue, State Vet Journal, 1999  
[www.defra.gov.uk/animalh/svi/vol1301/three.pdf](http://www.defra.gov.uk/animalh/svi/vol1301/three.pdf)
3. Mellor P. S., Boorman J. and Baylis M., *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors, Annu. Rev. Entomol., 45, 307-340, 2000
4. Bethan V. Purse, Philip S. Mellor, David J. Rogers, Alan R. Samuel, Peter P. C. Mertens and Matthew Baylis, Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe, Nature Rev. Microbiology, 3, 171-181, 2005
5. Veterinary Services, Overview of the Mediterranean Basin Bluetongue Disease, 1998-2004, 2005
6. Nomikou K., Mangana- Vougiouka O. & Panagiotatos D.E., Overview of bluetongue in Greece, Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium in Bluetongue, Taormina, Italy, 2003
7. Mellor P. S. & Wittmann E. J., Bluetongue virus in the Mediterranean basin, 1998-2001, Vet. J., 164, 20-37, 2002
8. Tabacknick W. J., *Culicoides variipennis* and bluetongue virus epidemiology in the United States, Annu. Rev. Entomol., 41, 23-43, 1996
9. David M. Knipe, Peter M. Howley, Fields Virology, Lippincott Williams & Wilkins, 4<sup>th</sup> edition, Vol 2
10. Draft of the orbivirus genus description for the ICTV Seventh Report, 1998
11. Office International des Epizooties (OIE), chapter 2.1.9, Bluetongue, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5<sup>th</sup> edition, 2004
12. Casas I. et al., New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction, Journal of Virological Methods, 53: 25-36, 1995
13. Ferrari G., De Liberato C. et al., Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype-2 among unvaccinated cattle in central Italy, Preventive Veterinary Medicine, 2005
14. N.J. MacLachlan, Bluetongue: A review and global overview of the only OIE List A disease that is endemic in North America, 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists and 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology, 2004, Orlando, FL, USA