

Golar Oven I. Izdelava in uporaba serološkega profila za ukrepe proti nekaterim povzročiteljem prašičjega respiratornega bolezenskega kompleksa na veliki farmi prašičev.

**UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOMEDICINE**

UDK 636.4.09:616.98:616.24-002(043.3)(497.12)

Mag. Irena Golarin Oven, dr. vet. med.

**IZDELAVA IN UPORABA SEROLOŠKEGA PROFILA ZA UKREPE
PROTI NEKATERIM POVZROČITELJEM RESPIRATORNEGA
BOLEZENSKEGA KOMPLEKSA NA VELIKI FARMI PRAŠIČEV**

Doktorska disertacija

**ESTABLISHMENT AND APPLICATION OF SERUM PROFILE FOR
CONTROL MEASURES AGAINST SELECTED PATHOGENS OF
PORCINE RESPIRATORY DISEASE COMPLEX ON LARGE PIG
FARM**

Doctoral thesis

Ljubljana, 2011

Mag. Irena Golar Oven

**IZDELAVA IN UPORABA SEROLOŠKEGA PROFILA ZA UKREPE PROTI
NEKATERIM POVZROČITELJEM RESPIRATORNEGA BOLEZENSKEGA
KOMPLEKSA NA VELIKI FARMI PRAŠIČEV**

Doktorska disertacija je zaključek Interdisciplinarnega podiplomskega študija biomedicine s področja veterine. Delo je bilo opravljeno v serološkem laboratoriju na Inštitutu za zdravstveno varstvo prašičev na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Mentor: prof. dr. Peter Hostnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Andrej Pengov
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo

Član: znan. sod. dr. Branko Krt
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo

Član: prof. dr. Josip Madič
Veterinarska fakulteta Zagreb

Datum zagovora: _____

Izjavljam, da je predložena doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorantka: mag. Irena Golar Oven

KAZALO VSEBINE

Kazalo vsebine	4
Kazalo tabel	9
Kazalo grafov	9
Izvleček	10
Abstract	12
1. UVOD	14
1.1 Namen dela, cilji in delovne hipoteze	16
2. PODATKI IZ LITERATURE	18
2.1. Prašičji respiratorni bolezenski kompleks – PRDC	18
2.2. Serološki profil	22
2.3. Prašičji cirkovirus 2 - PCV2	23
2.3.1. Etiologija	24
2.3.2. Epidemiologija	24
2.3.3. Patogeneza	24
2.3.4. Klinična znamenja, patoanatomske in patohistološke spremembe	25
2.3.5. Vpliv PCV2 na gostiteljev imunski sistem	26
2.3.6. Diagnostika	27
2.3.7. Preventiva in nadzor bolezni	29
2.4. Prašičja influenza (PI)	29
2.4.1. Etiologija	30
2.4.2. Epidemiologija	31

2.4.3. Patogeneza	32
2.4.4. Vpliv virusov influence A na gostiteljev imunski sistem	33
2.4.5. Klinična znamenja	34
2.4.6. Patoanatomske in patohistološke spremembe	34
2.4.7. Diagnostika	35
2.4.8. Zdravljenje	37
2.4.9. Ukrepi za preprečevanje PI v reji	37
2.5. Prašičji respiratorni korona virus – PRCV	38
2.5.1. Etiologija	38
2.5.2. Epidemiologija	38
2.5.3. Klinična znamenja	39
2.5.4. Patogeneza	40
2.5.5. Patoanatomske in patohistološke spremembe	40
2.5.6. Vpliv PRCV na gostiteljev imunski sistem	41
2.5.7. Diagnostika	41
2.5.8. Ukrepi	42
2.6. Prašičji reproduktivni in respiratorni sindrom – PRRS	43
2.6.1. Etiologija	43
2.6.2. Epidemiologija	44
2.6.3. Patogeneza	45
2.6.4. Klinična znamenja	46
2.6.5. Patoanatomske in patohistološke spremembe	49
2.6.6. Vpliv PRRSV na gostiteljev imunski sistem	50
2.6.7. Diagnostika	51
2.6.8. Preventiva in ukrepi	54
2.6.9. Eradikacija	55
2.7. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	56
2.7.1. Etiologija	57
2.7.2. Epidemiologija	57

2.7.3. Patogeneza	58
2.7.4. Klinična znamenja	59
2.7.5. Patoanatomske in patohistološke spremembe	59
2.7.6. Diagnostika	60
2.7.7. Zdravljenje EP	62
2.7.8. Ukrepi za preprečevanje EP v reji	62
2.7.9. Eradikacija EP	63
2.8. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	64
2.8.1. Epidemiologija	64
2.8.2. Patogeneza	65
2.8.3. Klinična znamenja	66
2.8.4. Patoanatomske in patohistološke spremembe	67
2.8.5. Diagnostika	67
2.8.6. Terapija	69
2.8.7. Preventivni ukrepi in nadzor bolezni	69
2.8.8. Eradikacija	70
2.9. <i>Haemophilus parasuis</i>	71
2.9.1. Etiologija	71
2.9.2. Epidemiologija	72
2.9.3. Patogeneza	72
2.9.4. Klinična znamenja	73
2.9.5. Patoanatomske in patohistološke spremembe	73
2.9.6. Diagnostika	74
2.9.7. Terapija	74
2.9.8. Preventiva in vpliv <i>H. parasuis</i> na gostiteljev imunski sistem	75
3. MATERIAL IN METODE	76
3.1. Material	76

3.1.1. Podatki o farmi	76
3.1.2. Serumi	76
3.1.3. Testi	76
3.2. Metode	77
3.2.1. Odvzem vzorcev serumov	77
3.2.2. Vzorčenje	77
3.2.3. Priprava serumov	78
3.2.4. Statistična obdelava	79
3.2.5 Testi	79
3.2.5.1. Encimskoimunski test (ELISA)	79
3.2.5.1.1. <i>Encimskoimunski test (ELISA) INGEZIM CIRCO IgG (Ingenasa, Španija)</i>	80
3.2.5.1.2. <i>Encimskoimunski test (ELISA) INGEZIM INFLUENZA PORCINA (Ingenasa, Španija)</i>	81
3.2.5.1.3. <i>Encimskoimunski test (ELISA) INGEZIM MHYO COMPAC (Ingenasa, Španija)</i>	82
3.2.5.1.4. <i>Encimskoimunski test (ELISA) INGEZIM PRRS UNIVERSAL (Ingenasa, Španija)</i>	83
3.2.5.1.5. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) Antibody Test Kit CHEKIT* APP-ApxIV (IDEXX laboratories, Švica)</i>	84
3.2.5.1.6. <i>Haemophilus parasuis Antibody Test Kit (ELISA) Swinecheck® HPS (Biovet Inc., Kanada)</i>	85
3.2.5.1.7. <i>ELISA INGEZIM CORONA DIFERENCIAL 2.0 (Ingenasa, Španija)</i>	87
4. REZULTATI	89
4.1. Rezultati preiskav serumov plemenskih svinj	89
4.2. Rezultati preiskav serumov pujskov pri 9 odvzemih	89
4.2.1. Tabelarni in grafični prikaz seroloških profilov za posamezne povzročitelje PRDC	89
4.2.1.1. Tabelarni in grafični prikaz serološkega profila za <i>A. pleuropneumoniae</i> (APP)	89
4.2.1.2. Tabelarni in grafični prikaz serološkega profila za <i>H. parasuis</i>	91
4.2.1.3. Tabelarni in grafični prikaz serološkega profila za virus PI	94

4.2.1.4. Tabelarni in grafični prikaz serološkega profila za <i>M. hyopneumoniae</i>	96
4.2.1.5. Tabelarni in grafični prikaz serološkega profila za PCV2	99
4.2.1.6. Tabelarni in grafični prikaz serološkega profila za PRCV	101
4.2.1.7. Tabelarni in grafični prikaz serološkega profila za PRRSV	103
5. RAZPRAVA IN SKLEPI	105
5.1. RAZPRAVA	105
5.1.1. Testi ELISA	106
5.1.2. Plemenske svinje	107
5.1.3. Pujski od 2. do 28. tedna starosti	109
5.1.4. Uporaba serološkega profila za ukrepe proti povzročiteljem PRDC na omenjeni farmi	114
5.2. SKLEPI	117
6. POVZETEK (SUMMARY)	119
6.1. POVZETEK	119
6.2. SUMMARY	121
7. ZAHVALA	125
8. REFERENCE	126

Kazalo tabel

Tabela 1. Rezultati preiskav serumov pitancev.	79
Tabela 2. Rezultati preiskav serumov plemenskih svinj.	90
Tabela 3. Rezultati preiskav serumov posameznih pujskov od 2. tedna do 28. tedna starosti (1. do 9. odvzem) na protitelesa proti APP	90
Tabela 4. Rezultati preiskav serumov posameznih pujskov od 2. tedna do 28. tedna starosti (1. do 9. odvzem) na protitelesa proti <i>H. parasuis</i>	92
Tabela 5. Rezultati preiskav serumov posameznih pujskov od 2. tedna do 28. tedna starosti (1. do 9. odvzem) na protitelesa proti virusu PI	94
Tabela 6. Rezultati preiskav serumov posameznih pujskov od 2. tedna do 28. tedna starosti (1. do 9. odvzem) na protitelesa proti <i>M. hyopneumoniae</i>	97
Tabela 7. Rezultati preiskav serumov posameznih pujskov od 2. tedna do 28. tedna starosti (1. do 9. odvzem) na protitelesa proti PCV2	99
Tabela 8. Rezultati preiskav serumov posameznih pujskov od 2. tedna do 28. tedna starosti (1. do 9. odvzem) na protitelesa proti PRCV	101
Tabela 9. Rezultati preiskav serumov posameznih pujskov od 2. tedna do 28. tedna starosti (1. do 9. odvzem) na protitelesa proti PRRSV	103

Kazalo grafov

Graf 1. Serološki profil za APP	91
Graf 2. Serološki profil za <i>H. parasuis</i>	93
Graf 3. Serološki profil za virus PI	95
Graf 4. Serološki profil za virus PI glede na izračunane titre pri testu ELISA	95
Graf 5. Serološki profil za <i>M. hyopneumoniae</i>	98
Graf 6. Serološki profil za PCV2	100
Graf 7. Serološki profil za PRCV	102
Graf 8. Serološki profil za PRRS	104

IZDELAVA IN UPORABA SEROLOŠKEGA PROFILA ZA UKREPE PROTI NEKATERIM POVZROČITELJEM RESPIRATORNEGA BOLEZENSKEGA KOMPLEKSA NA VELIKI FARMI PRAŠIČEV

Izvleček

Ključne besede: Prašiči, bolezn-epidemiologija-imunologija; imunologija; dihala, infekcije – imunologija; protitelesa, bakterijska – kri; protitelesa, virusna – kri; encimskoimunski test; prašiči; Slovenija

Izhodišče. Prašičji respiratorni bolezenski kompleks (PRDC) je »multifaktorni« respiratorni bolezenski sindrom prašičev.

S serološkim profilom ugotavljamo prisotnost povzročiteljev in potek okužbe na farmi ter uspešnost izvajanja ukrepov.

Namen dela. Namen našega dela je bil na večji prašičji farmi v Sloveniji izdelati serološki profil za izbrane povzročitelje PRDC in predlagati ukrepe za obvladovanje teh okužb.

Material in metode. Od decembra 2007 do julija 2008 smo na veliki slovenski farmi prašičev na protitelesa proti prašičjemu cirkovirusu tip 2 (PCV2), virusu prašičje influence (VPI), prašičjemu respiratornemu korona virusu (PRCV), virusu prašičjega reproduktivnega in respiratornega sindroma (PRRSV), *Mycoplasmi hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) in *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) pregledali 30 serumov pitancev, 36 serumov plemenskih svinj in 342 serumov prašičev (9 odvzemov po 38 serumov). Pujskom smo jemali kri pri 2, 4, 6, 8, 11, 14, 17, 22 in 28 tednih. Za serološko testiranje smo uporabili komercialne komplete ELISA.

Rezultati in zaključki. Pri plemenskih svinjah je bila seroprevalenca proti VPI, APP in PRCV 100 %, proti PCV2 94 %, proti *M. hyopneumoniae* 83,3 % in proti *H. parasuis* 36 %. Protiteles proti PRRSV nismo dokazali.

Vsi pujski so imeli protitelesa proti APP do 4. tedna starosti. Najnižja seroprevalenca je bila pri 14 tednov starih prašičih (50,0 %).

V 4., 6. in 8. tednu starosti nismo dokazali protiteles proti *H. parasuis*. Seroprevalenca je nato v 11. tednu starosti narasla in se nato dvigovala do 22. tedna starosti (94,7 %).

Seroprevalenca proti VPI se je gibala med 81,5 % in 100 %.

Seroprevalenca proti *M. hyopneumoniae* je bila v 2. tednu starosti 31,5 % in je nato v 6. tednu padla na 0 %. V 11. tednu je nato narasla na 2,6 % in se nato dvigovala vse do 28. tedna, ko je dosegla 86,8 %.

Seroprevalenca proti PCV2 je v 6. tednu padla na 50,0 %. V 8. tednu je narasla na 86,8 % in v 14. tednu na 100 % in taka ostala vse do 28. tedna starosti.

Seroprevalenca proti PRCV je bila pri večini odvzemov 100 %.

Seroprevalenca proti PRRSV, ki je bila sprva 2,5 % je od 11. tedna starosti začela naraščati in v 22. tednu dosegla najvišjo vrednost (97,4 %).

Za omenjeno farmo smo izdelali serološki profil, s katerim smo določili čas vakcinacije za testirane povzročitelje PRDC, razen za PRCV in PRRSV. Na farmi bi lahko ukrepali na sledeči način:

- PRRSV: utrditev plemenske črede z imunizacijo,
- PCV2: vakcinacija svinj,
- *H. parasuis*: vakcinacija svinj ali pujskov,
- APP: vakcinacija pitancev,
- virus PI: vakcinacija svinj,
- *M. hyopneumoniae*: ponovna vakcinacija med 11. in 14. tednom starosti,
- PRCV: ni potrebnih specifičnih ukrepov,
- preprečevanje vnosa novih povzročiteljev PRDC na farmo.

ESTABLISHMENT AND APPLICATION OF SERUM PROFILE FOR CONTROL MEASURES AGAINST SELECTED PATHOGENS OF PORCINE RESPIRATORY DISEASE COMPLEX ON LARGE PIG FARM

Abstract

Key words: *Swine diseases – epidemiology – immunology; immunology; respiratory tract infection –immunology; antibodies, bacterial – blood; antibodies, viral – blood; enzyme-linked immunosorbent assay; swine; Slovenia*

Background. Porcine respiratory disease complex (PRDC) is a multi-factorial respiratory disease syndrome in swine.

Serum profile is technique to demonstrate presence of pathogens, to study disease dynamic in herd and to determine efficacy of applied control measures.

Goal. The main goal was preparation of specific control measures for pathogens of PRDC on the farm from established serum profile.

Materials and methods. From December 2007 to July 2008, 30 serum samples from fatteners, 36 serum samples from breeding sows and 342 serum samples from pigs (38 serum samples; 9 samplings) were tested for antibodies to Porcine Circovirus Type 2 (PCV2), Swine Influenza Virus (SIV), Porcine Respiratory Corona Virus (PRCV), Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) and *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*). Blood sampling was done at 2,4,6,8,11,14,17,22 and 28 weeks of age. Commercial ELISA kits of different producers were used.

Results and conclusions. In breeding sows seroprevalence to SIV, APP and PRCV was 100 %, to PCV2 94 %, to *M. hyopneumoniae* 83,3 % and to *H. parasuis* 36 %. They were seronegative against PRRSV.

All piglets had specific antibodies against APP till 4 weeks of age. The lowest seroprevalence was at 14 weeks of age (50 %).

At 4, 6 and 8 weeks of age pigs were seronegative against *H. parasuis*. The seroprevalence increased at 11 weeks of age to 26,3 % and at 22 weeks of age to 97,4 %.

The seroprevalence against SIV was between 81,5 % and 100 % in all samplings.

The seroprevalence against *M. hyopneumoniae* was 31,5 % at 2 weeks of age, at 6 weeks of age decreased to 0 %. At 11 weeks of age increased to 2,6 % and at 28 weeks of age increased to 86,8 %.

The seroprevalence against PCV2 decreased to 50 % at 6 weeks of age. At 8 weeks of age increased to 86,8 % and at 14 weeks of age to 100 %.

The seroprevalence against PRCV was mainly 100 % in all samplings.

The seroprevalence against PRRSV at 11 weeks of age (2,5 %) start to increase and at 22 weeks of age was the highest (97,4 %).

An optimal time for vaccination for the majority of tested pathogens, except for PRCV and PRRSV was established according to serum profile for the selected farm.

The following measures can be proposed:

- PRRSV: stabilization of breeding herd with immunization,
- PCV2: vaccination of sows,
- *H. parasuis*: vaccination of sows or piglets,
- *A. pleuropneumoniae*: vaccination of sows,
- *M. hyopneumoniae*: second vaccination between 11.–14. weeks of age,
- PRCV: specific measures are not needed,
- prevention of entering other pathogens of PRDC on the farm.

1. UVOD

Respiratorne bolezni se pogosto pojavljajo v prašičereji povsod po svetu. Prevladujejo pnevmonije, plevropnevmonije in plevritisi, ki so pogosto posledica okužbe z več kot enim povzročiteljem respiratornih bolezni (Jirawattanapong in sod., 2010).

Respiratorne bolezni v prašičereji predstavljajo ekonomski problem (Thacker, 2001). Poleg direktnih izgub zaradi poginov pri akutnih izbruhih respiratornih bolezni, veliko vlogo igrajo indirektno ekonomske izgube. Zmanjša se obseg proizvodnje prašičev zaradi slabših dnevnih prirastov in konverzije krme, podaljša se pitanje živali, pojavijo se sekundarne okužbe ter povečajo se stroški zaradi intenzivnega zdravljenja živali (Miller in sod., 2001; Rautiainen in sod., 2000). Ekonomske izgube naraščajo, kadar se respiratorne bolezni pojavijo pri mlajših živalih, če so sočasno prisotne še druge bolezni, živali pa so nastanjene v neprimernem okolju (Stärk, 2000). V raziskavi, narejeni na 115.000 prašičih iz več kot 500 različnih čred, zaklanih na klavnici, so ugotovili, da se zaradi pnevmonije in plevritisov v času pitanja živali, dnevni prirasti zmanjšajo za okoli 30 g na dan na prašiča (Tielen, 1995).

Respiratorne bolezni so najpogostejši vzrok zdravljenja danskih čred prašičev (Andreasen in sod., 2000). Zaradi tega se poveča delež prašičev pri katerih ob klanju dokažemo ostanke antibiotikov (Stärk, 2000).

Že od 1970 leta ugotavljajo, da so respiratorne bolezni ne samo posledica delovanja specifičnih mikroorganizmov, ampak kompleksnega vzajemnega vpliva številnih dejavnikov: gostitelja, okoljskih in genetskih dejavnikov ter managementa reje (Sørensen in sod., 2006; Stärk, 2000). Ena od takih »multifaktorskih« bolezni je prašičji respiratorni bolezenski kompleks (angl.: porcine respiratory disease complex – PRDC), ki je zelo pogost pri pitancih v ZDA in Evropi. PRDC je posledica interakcije in sinergije različnih virusnih in bakterijskih povzročiteljev respiratornih obolenj v kombinaciji z dejavniki okolja in sistemom managementa (Dereu in Somers, 2007).

Respiratorne bolezni se širijo med čredami prašičev običajno na dva načina: z dotikom ali po zraku (Sørensen in sod., 2006). Virus prašičjega reproduktivnega in respiratornega sindroma (PRRSV) se širi tudi preko semena okuženega merjasca (Done in sod., 1996).

Mycoplasma hyopneumoniae (*M. hyopneumoniae*), prašičji respiratorni koronavirus (PRCV), PRRSV in virus bolezni Aujeszkega naj bi se prenašali po zraku tudi do nekaj kilometrov

(Stärk, 2000; Sørensen in sod., 2006; Saif in Sestak, 2006), kar pa je eksperimentalno pogosto težko dokazati (Zimmerman in sod., 2006).

Zgornje dihalne poti naseljujejo številni mikroorganizmi, vključno z virusi, mikoplazmami, klamidijami in ostalimi bakterijami. Različne študije uvrščajo mikroorganizme iste vrste tako med komenzale kot potencialno patogene mikroorganizme. *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma hyorhinis*, in *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) sodijo npr. med mikroorganizme, ki jih pogosto izoliramo iz respiratornega trakta zdravih prašičev (Sørensen in sod., 2006). Pri dovzetnih živalih pa *H. parasuis* lahko postane patogen in povzroči hudo sistemsko obolenje (Rapp-Gabrielson in sod., 2006).

Ob pojavu respiratornih boleznih niso vedno prisotna očitna klinična znamenja. *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) in *M. hyopneumoniae* sta le redko izolirana iz zdravih prašičev. Tovrstne okužbe praviloma potekajo v subklinični obliki (Sørensen in sod., 2006).

Respiratorne bolezni so pogosto posledica okužbe z večimi povzročitelji. Določeni povzročitelji, z vplivom na lokalno in včasih tudi na sistemsko imunost gostitelja, delujejo kot primarni povzročitelji in so t.i. odpiralci vrat sekundarnim povzročiteljem. Primarni povzročitelji so pogosto virusi in mikoplazme, sekundarni pa bakterije (Sørensen in sod., 2006; Brockmeier in sod., 2002).

M. hyopneumoniae npr. poškoduje epitelijske celice traheje, bronhov in bronhiolov, in tako zmanjšuje sposobnost delovanja mukociliarnega aparata ter zavira delovanje limfoidnega sistema; zaradi tega so prašiči nagnjeni k sekundarnim okužbam, zlasti z *A. pleuropneumoniae* in *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) (Stipkovits in sod., 2001; DeBey in Ross, 1994).

Diagnoza respiratornih boleznih oziroma ugotavljanje zdravstvenega stanja črede prašičev temelji na kombinaciji kliničnega pregleda, patoanatomskih in laboratorijskih preiskav.

Za uspešen program vakcinacije in ostalih ukrepov na farmi je pomembno vedeti, kateri povzročitelji se nahajajo na farmi in pri kateri starosti se živali okužijo. To lahko dosežemo s serološkim testiranjem prašičev po starostnih kategorijah, kar imenujemo serološki profil (Opreissnig in sod., 2007).

Ukrepi ob pojavu respiratornih bolezní v čredi temeljijo na dveh principih: eradikaciji bolezní ali zmanjšanju števila okuženih živali v čredi. Eradikacija respiratornih bolezní je bolj učinkovita, vendar pa je za uspešno izveden program eradikacije potrebno razumeti etiologijo respiratornih bolezní in načine (pota) okužbe (Sørensen in sod., 2006). V ZDA, Švici in na Danskem so uvedli pred leti t.i. SPF (angl.: specific pathogen free) način reje prašičev, kjer so bili prašiči brez enzootske pnevmonije, aktinobacilarne plevropnevmonije in atrofičnega rinitisa (Szancer, 2008). Izvedba takšnega sistema reje je tehnično in logistično zahtevna ter draga, vendar ko je enkrat uvedena, prinaša koristi tako v ekonomskem smislu kot pri dobrobiti živali.

Med ostale metode eliminacije oziroma eradikacije respiratornih bolezní sodijo še zgodnje odstavljanje pujskov, stroga ločitev različnih starostnih kategorij prašičev (po možnosti na različnih lokacijah), odstranitev obolelih živali in intenzivno zdravljenje celotne črede prašičev. Te metode se lahko uporabljajo v različnih kombinacijah.

Med ukrepe za zmanjšanje pogostosti respiratornih bolezní sodijo tudi vakcinacije in antibiotično zdravljenje bolnih živali. Za trajno izboljšanje zdravstvenega stanja živali pa so potrebne radikalnejše in dražje spremembe v sistemu proizvodnje in nastanitve živali; dejavniki, ki jih je potrebno pri tem upoštevati, so: gostota naselitve, dotok živali na in s farme, premiki živali znotraj farme, ventilacija hlevov, ločitev različnih kategorij prašičev in drugi (Sørensen in sod., 2006; Stärk, 2000).

1.2 NAMEN DELA, CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen tega dela je na večji farmi prašičev v Sloveniji izdelati serološki profil za povzročitelje PRDC. Na ta način bomo sledili poteku PRDC na farmi. Najprej bomo s serološkimi metodami pri pitancih ugotavljali kateri povzročitelji PRDC (PRRSV, virus prašičje influence (PI), prašičji cirkovirus tip 2 (PCV2), PRCV, *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*) se pojavljajo v seroprevalenci nad 10 %. Pitancem bomo odvzeli kri na klavni liniji. Pri plemenskih svinjah in njihovih potomcih bomo ugotavljali protitelesa v serumu samo proti povzročiteljem PRDC, pri katerih je seroprevalenca okužbe pri pitancih enaka ali višja kot 10%. Pujskom bomo jemali kri pri različnih tednih starosti od rojstva do zakola. S pomočjo serološkega profila za posamezne povzročitelje bomo ugotavljali, ali je pri pujskih prisotna kolostralna zaščita. Dokazali bomo, do katere starosti so

prisotna kolostralna protitelesa in pri kateri starosti se pojavijo protitelesa zaradi okužbe s povzročiteljem PRDC.

Delovne hipoteze:

1. Določili bomo seroprevalenco za posamezne povzročitelje PRDC pri posamezni starostni skupini (pri 2, 4, 6, 8, 11, 14, 17, 22 in 28 tednih). Pričakujemo prisotnost specifičnih protiteles pri sesnih pujskih, v začetku odstavitve ter v času pitanja.
2. Določili bomo trajanje kolostralne imunosti za posamezne povzročitelje PRDC. Pričakujemo, da bomo pri endemično prisotnih boleznih (okužbe z virusom PI, PCV2, PRCV, *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*) dokazali specifična kolostralna protitelesa pri sesnih pujskih do največ 8. tedna starosti.
3. Določili bomo začetek aktivne imunosti za posamezne povzročitelje PRDC. Med 8.–11. tednom starosti prašičev pričakujemo nizko prevalenco ali odsotnost specifičnih protiteles za endemično prisotne povzročitelje (virus PI, PCV2, PRCV, *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*). Po 11. tednu starosti pričakujemo razvoj aktivne imunosti (dvig seroprevalence).
4. Dokazali bomo, da se seroprevalence pri posameznih odvzemih signifikantno razlikujejo med seboj. Pričakujemo, da bodo seroprevalence za posamezne testirane povzročitelje podobne pri isti starostni skupini prašičev.
5. Na podlagi rezultatov monitoringa bomo izdelali program preventivnih ukrepov za navedeno farmo.

2. PODATKI IZ LITERATURE

2.1. Prašičji respiratorni bolezenski kompleks - PRDC

V intenzivni proizvodnji prašičev se srečujemo z vedno bolj kompleksnimi boleznimi. Vzroki za porast kompleksnih bolezenskih sindromov so poleg vnosa nekaterih virusov v čredo (virus prašičjega reproduktivnega in respiratornega sindroma (PRRSV), novi podtipi virusa prašičje influence (PI), prašičji cirkovirus, tip 2 (PCV2)), tudi prenaseljenost, področja z veliko gostoto prašičev in povečan transport s prašiči (Bochev, 2007).

Eden izmed takih kompleksnih bolezenskih sindromov, s katerim se srečujemo v zadnjih 10-15 letih, je prašičji respiratorni bolezenski kompleks (angl.: porcine respiratory disease complex-PRDC) (Bochev, 2007).

Poimenovanje PRDC se je prvič začelo uporabljati v ZDA; v Veliki Britaniji se je do takrat uporabljal naziv poodstavitveni respiratorni sindrom (angl.: postweaning respiratory syndrome), ki je združeval posledice okužbe s PRRSV, virusom PI in *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) (Done in White, 2003). Thacker (2001) je PRDC označila kot kombinacijo enzooske pnevmonije (EP) in virusov, ki povzročajo respiratorna obolenja, pri čemer predstavlja EP sočasno okužbo prašiča z *M. hyopneumoniae* in bakterijami, ki povzročajo sekundarne okužbe (*Pasteurella multocida* (*P. multocida*), *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*), *Streptococcus suis* (*S. suis*), *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) ali *Arcanobacterium pyogenes*).

PRDC je »multifaktorski« respiratorni sindrom prašičev (Dereu in Somers, 2007). Prizadene predvsem pitance (Terrini, 2005); najpogosteje se pojavlja pri 10 do 22 tednov starih prašičih (Holko in sod., 2004). Zanj so značilni manjši dnevni prirasti, zmanjšan apetit, daljše pitanje živali, povišana telesna temperatura, kašelj in oteženo dihanje (Thacker in Thanawongnuwech, 2002; Thacker, 2001). Pri hudi obliki PRDC, se smrtnost znatno poveča (Choi in sod., 2003).

Respiratorne bolezni pri prašičih so pogosto posledica sočasnega delovanja primarnih in sekundarnih povzročiteljev, zelo pomemben pa je tudi management reje (način nakupa živali, konstrukcija hlevov oziroma boksov, ravnanje z gnojem, tehnike krmljenja, dostop do vode, zračenje, prepih, tla, svetloba, gretje, higiena, odstavljanje in mešanje živali, veterinarsko svetovanje, tunnelski sistem reje, sistem »vse noter-vse ven« (angl.: all in-all out)), okolje v

katerem prašiči živijo in dobrobit živali (Brockmeier in sod., 2002a; Bruguera in sod., 2006; Stärk, 2000).

Povzročitelje respiratornih boleznih lahko razvrstimo na primarne povzročitelje, ki lahko sami povzročijo obolenje, in sekundarne povzročitelje, ki povzročijo okužbo tako, da izkoristijo delovanje primarnih povzročiteljev. Nekatere bakterije lahko delujejo kot primarni ali kot sekundarni povzročitelji. V kolikor pri okužbi sodelujejo še sekundarni bakterijski povzročitelji, je potek bolezni resnejši in daljši (Brockmeier in sod., 2002a). Učinki posameznih povzročiteljev se lahko seštevajo in tako poslabšajo potek bolezni (Olsen in sod., 2006).

Med primarne povzročitelje PRDC sodijo :

- PRRSV,
- virus PI,
- virus bolezni Aujeszkega,
- prašičji respiratorni korona virus (PRCV),
- PCV2,
- *M. hyopneumoniae*,
- *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) (Choi in sod., 2003; Thacker, 2001).

Med sekundarne povzročitelje, ki jih omenjajo v povezavi s PRDC pa sodijo:

- *H. parasuis*,
- *S. suis*,
- *Actinobacillus suis* (*A. suis*) (Brockmeier in sod., 2002a; Ohlinger in sod., 2002).

V večini rej prašičev kroži več povzročiteljev hkrati. Povzročitelji PRDC, njihova kombinacija in interakcije se razlikujejo od črede do črede in povzročajo različne zdravstvene težave (Bruguera in sod., 2006). Potek in resnost okužbe sta odvisna od vrste virusov in bakterij, s katerimi se prašiči okužijo, starosti in imunskega statusa prašiča (Olsen in sod., 2006, Bruguera in sod., 2006).

Thacker in sod. (2001) so ugotovili, da je potek pljučnice resnejši pri okužbi z *M. hyopneumoniae* in PRRSV. Podobne rezultate so dobili tudi pri sočasni okužbi *M. hyopneumoniae* z virusom bolezni Aujeszkega (Shibata in sod., 1998) in pri *M.*

hyopneumoniae z virusom PI, kjer je tudi kašelj pogostejši. *M. hyopneumoniae* poslabša tudi potek pljučnice, nastale zaradi okužbe z *A. pleuropneumoniae* (Andreasen in sod., 2000). Brockmeier in sod. (2002a) so dokazali, da oba *B. bronchiseptica* in PRRSV olajšata naselitev zgornjega respiratornega trakta s *H. parasuis*. Feng in sod. (2001) so prišli do zaključka, da so pujski zaradi intrauterine okužbe s PRRSV bolj občutljivi na okužbe s *S. suis* tip II. Allan in sod. (2000) so dokazali, da PRRSV potencira razmnoževanje in razporeditev PCV2, kar ima za posledico pljučnico in obsežnejše patoanatomske spremembe pri sindromu multisistemskega poodstavitvenega hujšanja (angl.: postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS). Ugotovili so tudi, da so se klinična znamenja stopnjevala, ko so dva dni po okužbi s PRCV, prašiče inokulirali še z virusom PI ali virusom bolezni Aujeszkega (Saif in Sestak, 2006).

Neprimerno vodenje reje in okolje, v katerem živali živijo, prav tako prispevata k pojavu respiratornih bolezni. Pripomoreta k širjenju povzročiteljev bolezni in k zmanjšanju odpornosti živali. Prevelika gostota živali ali neprimerno zračenje in neustrezna temperatura ozračja lahko vodijo v pregrevanje ali hlajenje živali, poveča se stres in koncentracija amoniaka in prahu, kar negativno vpliva na obrambni mehanizem respiratornega trakta (Brockmeier in sod., 2002a). Ugotovili so, da povečane količine amoniaka (več kot 50 ppm) zmanjšujejo apetit in posledično dnevne priraste (Done, 2001). Dokazano je, da čisto okolje zmanjša možnost okužbe in medsebojnega delovanja povzročiteljev respiratornih obolenj. Ustrezen nadzor nad čredo in primerni objekti pozitivno vplivajo na proizvodne lastnosti prašičev in na njihov imunski sistem (Bruguera in sod., 2006).

PRDC je prisoten v vseh državah EU (Bochev, 2007); incidenca je v povprečju od 40-60 %, v Franciji je nižja (10–20 %) (Granell, 2006). Obolevnost pri PRDC je na različnih farmah v ZDA med 30–70 %, smrtnost pa med 4–6 %, na nekaterih farmah celo 15 % (Choi in sod., 2003). Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory (ZDA) je leta 2000 diagnosticiral 3163 pljučnic. V 42 % so determinirali PRRSV, v 22 % PCV2, v 17 % virus PI, v 14 % *M. hyopneumoniae*, v 8 % *H. parasuis* in v 5 % *A. pleuropneumoniae* (Harms in sod., 2002). V Srbiji so postmortalno pregledali 180 prašičev. Iz pljučnega tkiva so v 28,5 % izolirali *A. pleuropneumoniae*, v 10 % *H. parasuis*, s pomočjo imunohistokemičnih testov so ugotovili 87 % prevalenco *M. hyopneumoniae*, 65 % prevalenco PRRSV, 54 % prevalenco PCV2 in 2 % prevalenco virusa PI (Savic in sod., 2008). V severni Italiji so leta 2004 in 2005 pri 8.690 pujskih (8–25 kg) z metodo polimerazne verižne reakcije (angl.: polymerase chain reaction – PCR) v 21 % primerov ugotovili PRRSV in različne bakterijske povzročitelje, v 3

% primerov PRRSV, *M. hyopneumoniae* in različne bakterijske povzročitelje, v 2 % primerov PRRSV in v 2 % primerov virus PI (Nigrelli in sod., 2008).

Na Veterinarski fakulteti, na Inštitutu za zdravstveno varstvo prašičev smo s serološkimi metodami v obdobju od leta 2002 do 2005 testirali 5336 serumov, predvsem od plemenskih živalih, in ugotavljali kateri povzročitelji PRDC se pojavljajo na večjih farmah v Sloveniji. Ugotovili smo prisotnost protiteles proti PRRSV (5,5 % prevalenca), virusu PI H1N1 (44 % prevalenca), H3N2 (23,4 % prevalenca), PRCV (90,2 % prevalenca), *A. pleuropneumoniae* (100 % prevalenca na ApxIV faktor) (Golar Oven in Valenčak, 2006). Med leti 1996 in 1999 smo na osmih velikih farmah ugotovili od 47-80 % serološko pozitivnih živali na *M. hyopneumoniae* (Strajn, 2001).

Ukrepi, povezani z nadzorom PRDC, se razlikujejo od reje do reje. Prilagoditi jih je potrebno povzročiteljem, prisotnim v reji, starosti, pri kateri se živali okužijo in resnosti bolezni. Ukrepi so vezani na spremembo managementa reje, na vakcinacijo in uporabo antibiotikov.

Za uspešno zdravljenje oziroma izvajanje ukrepov je najprej potrebno ugotoviti, kateri povzročitelji PRDC krožijo v posamezni reji. Za identifikacijo posameznih povzročiteljev lahko uporabimo različne diagnostične metode: izolacijo povzročitelja, imunohistokemične metode na zbranih tkivnih vzorcih, metodo PCR in serološke preiskave (Brockmeier in sod., 2002a; Bruguera in sod., 2006). Nato je potrebno izvesti preventivne ukrepe in zdravljenje; izbrati učinkovite antibiotike in načrte vakcinacij. Individualno zdravljenje je možno, kadar je bolnih le nekaj živali v boksih, pogosteje pa se poslužujemo dajanja zdravil v vodo ali hrano. Izbira antibiotika je odvisna od njegove učinkovitosti, cene, karence in načina aplikacije. Pred izvedbo vakcinacije je potrebno primerjati stroške vakcinacije z izgubami zaradi zmanjšanih dnevnih prirastov, daljšega pitanja in večje smrtnosti živali. Vakcina mora biti prilagojena povzročiteljem, ki krožijo v čredi in navzkrižni imunosti, kadar je prisotnih več serotipov. Zelo pomemben je tudi čas vakcinacije. Brez spremembe managementa pa sama terapija in vakcinacija pogosto nista uspešni. Nakup živali iz preverjene reje lahko prepreči vnos novih respiratornih povzročiteljev, kar se pogosto zgodi, kadar se kupuje živali iz različnih virov. Najprimernejši ukrepi za preprečevanje respiratornih bolezni so:

- proizvodnja različnih kategorij prašičev na različnih lokacijah,
- proizvodnja »vse noter-vse ven«,
- izolacija in aklimatizacija novo kupljenih živali,
- zgodnje odstavljanja pujskov,

- zoohigienski ukrepi (Brockmeier in sod., 2002a; Dereu in Somers, 2007).

2.2. Serološki profil

S pomočjo seroloških preiskav lahko ugotovimo kateri povzročitelji respiratornih bolezni krožijo v čredi in približen čas oziroma starost prašičev ob okužbi (Brockmeier in sod., 2002). Če želimo ugotoviti dinamiko okužbe določenega povzročitelja oziroma povzročiteljev v čredi prašičev, lahko uporabimo serološki profil (Cunningham in sod., 2008).

S serološkim profilom ugotavljamo prisotnost povzročiteljev in potek okužbe na farmi, uspešnost vakcinacije, eliminacije ali eradikacije bolezni. To lahko izvedemo na dva načina: najbolj pogosta in enostavna je t.i. »presečna« metoda sočasnega odvzema krvnih vzorcev različnim starostnim skupinam prašičev; bolj natančna, vendar dolgotrajnejša, pa je t.i. »zaporedna« metoda odvzema krvnih vzorcev istim živalim v določenem časovnem razmiku, npr. vsaka 2 tedna od rojstva do zakola živali (Opreissnig in sod., 2007; Larochelle in sod., 2003; Andreasen in sod., 2000). S serološkim profilom ugotavljamo v čredi število živali s specifičnimi protitelesi v krvnem serumu v času odvzema vzorcev. S pomočjo serološkega profila lahko ločimo specifična kolostralna in aktivna serumska protitelesa; ugotovimo lahko, ali imajo pujski po rojstvu v serumu specifična kolostralna protitelesa, do katerega tedna starosti so prisotna in kdaj se v serumu pojavijo specifična protitelesa zaradi okužbe ter koliko časa so prisotna. Serum živali lahko testiramo na specifična protitelesa različnih respiratornih povzročiteljev (Andreasen in sod., 2000).

Larochelle in sod. (2003) so s pomočjo serološkega profila ugotavljali prisotnost protiteles proti PCV2. V prvi čredi prašičev so s pomočjo »zaporedne« metode v 4 tedenskih intervalih vsakič odvzeli 10 krvnih vzorcev istim prašičem in sicer od 3. do 23. tedna starosti. V drugi čredi pa so na isti dan v vsaki starostni kategoriji odvzeli 10 krvnih vzorcev. Ugotovili so, da so bila kolostralna protitelesa proti PCV2 prisotna od 3. do 11. tedna starosti in da je do serokonverzije prišlo pri 15. tednu starosti. Ugotovili so tudi, da so bili titri protiteles proti PCV2 vse do zakola, visoki.

Andreasen in sod. (2000) so na ta način ugotavljali protitelesa proti *M. hyopneumoniae*, toksinu *P. multocidae* in *A. pleuropneumoniae* (serovari 2, 5–7,12). Prašičem so odvzeli kri ob odstavitvi, nato pa jo odvzeli še vsake 4 tedne do zakola s pomočjo »zaporedne« metode. Ugotovili so, da se je serokonverzija proti naštetim respiratornim povzročiteljem pojavila med 8. in 24. tednom starosti prašičev.

Vigre in sod. (2003) so s pomočjo serološkega profila ugotavljali, kako dolgo so v serumu prisotna kolostralna protitelesa proti *A. pleuropneumoniae*, serovar 2. 47 prašičem so kri odvzeli 18-krat, od rojstva pa do 22. tedna starosti. Ugotovili so, da so kolostralna protitelesa proti *A. pleuropneumoniae*, serovar 2, iz seruma izginjala med 2. in 8. tednom starosti.

Serološki profil so uporabili tudi Dee in sod. (2001a) pri eradikaciji PRRSV v 5 čredah z metodo testiranja in izločanja živali (TIŽ). Ta metoda je primerna le za farme s seroprevalenco ≤ 25 %. Preden so začeli z metodo TIŽ so ugotavljali seroprevalenco pri plemenskih svinjah, odvzeli pa so tudi 30 naključnih krvnih vzorcev pri 10 tednov in 5-6 mesecev starih prašičih, da bi ugotovili, ali so se prašiči po odstavitvi okužili s PRRSV. Če so po odstavitvi ugotovili protitelesa proti PRRSV, so v vzrejališču in pitališču izvedli depopulacijo. TIŽ so izvajali s testom ELISA in metodo PCR, pri čemer so mesečno (12 mesecev) testirali 52-58 krvnih vzorcev plemenskih svinj (odvisno od velikosti črede), 10 krvnih vzorcev 8–10 tednov starih in 10 krvnih vzorcev 5–6 mesecev starih prašičev. Živali, ki so bile v obeh testih negativne, so lahko ostale v čredi, živali, ki so bile pozitivne v testu ELISA ali PCR ali v obeh, pa so izločili iz črede.

2.3. Prašičji cirkovirus 2 - PCV2

Prašičji cirkovirus 2 (PCV2) povezujejo s številnimi obolenji pri prašičih (Chae, 2005).

Prašičji cirkovirus (PCV) je bil prvič izoliran leta 1974 v laboratoriju kot kontaminant v kulturi celic prašičje ledvice PK15. V poznih devetdesetih letih pa se je pri prašičih pojavil nov PCV. Predlagali so, da se novi PCV imenuje PCV2, kontaminant celične kulture PK15 pa PCV1 (Allan in Ellis, 2000). Protitelesa proti PCV2 so v Belgiji našli v arhiviranih serumih že iz leta 1969, sporadične primere sindroma multisistemskega poodstavitvenega hujšanja (angl.: postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS) pa so v Angliji retrospektivno identificirali v arhiviranih tkivih fiksiranih v formalinu med leti 1970 in 1997 (Opriessnig in sod., 2007).

PCV 2 povezujejo:

- s PMWS,
- s sindromom kožnega vnetja in odpovedi ledvic (angl.: porcine dermatitis and nephropathy syndrome; PDNS),

- z respiratornimi obolenji,
- z reprodukcijskimi motnjami.

V zadnjem času se za te skupine sindromov oziroma bolezni uporablja izraz prašičje cirkovirusne bolezni (angl.: porcine circovirus diseases; PCVD) (Segalés in sod., 2006).

2.3.1. Etiologija

PCV2 sodi v rod *Circovirus*, družina *Circoviridae*. PCV je majhen virus (premer 17 nm), brez ovojnice, s krožno, enovijačno DNA, ki vsebuje 1767–1768 nukleotidov (Tischer in sod., 1995; Segalés in sod., 2006). Analiza virusov PCV2 iz različnih delov sveta je pokazala, da vsi sodijo v filogenetsko skupino z identiteto nukleotidnih sekvenc višjo kot 93 % (Segalés in sod., 2006).

PCV2 je občutljiv na številna razkužila narejena na osnovi klorheksidina, formaldehida, joda in alkoholov (Royer in sod., 2001). Virus preživi 15 minut pri 70 °C in je odporen na pH 3 (Taylor, 2006a).

2.3.2. Epidemiologija

PCV2 je pri domačih prašičih ubikvitaren, protitelesa proti PCV2 pa so ugotovili tudi pri divjih prašičih (Vicente in sod., 2004). V večini primerov je okužba oronazalna, možna je tudi transplacentarna okužba; eksperimentalno so okužili prašiče tudi oralno in intramuskularno. Okužene živali širijo virus z nosnim in očesnim izcedkom, slino, urinom in fecesom (Desrosiers, 2007; Taylor, 2006a). Virusno DNA so našli tudi v semenu merjascev (Schmoll in sod., 2008). Okužbe niso ugotovili pri ljudeh, konjih, govedu, ovcah, psih, mačkah in perutnini (Desrosiers, 2007).

2.3.3. Patogeneza

PCV2 se običajno nahaja v citoplazmi makrofagov in dendritskih celic. Obstajajo dokazi, da PCV2 za svojo replikacijo potrebuje celice v S fazi celičnega cikla (Darwich in sod., 2004). Primarno mesto replikacije PCV2 še ni ugotovljeno. Pri imunosupresivnih gnotobiotskih prašičih so 7 dni po inokulaciji PCV2 virusno protein replikazo (Rep) ugotovili v tonzilarnem in ezofagealnem epiteliju, epiteliju kript sluznice želodca in tankega črevesa. Rep in nukleokapsidne proteine so pri imunosupresivnih svinjah odkrili v histiocitih, folikularnih dendritskih celicah v bezgavkah, vranici in timusu, Kuppferjevih in endotelijskih celicah jeter, redkeje pa v sinusoidalnih fagocističnih makrofagih (Krakowka in sod., 2003).

Pri prašičih s PMWS se zmanjša število levkocitov v primarnem (timus) in v sekundarnem (bezgavke, vranica, tonzile) limfoidnem tkivu, kot tudi število cirkulirajočih limfocitov (Darwich in sod., 2004).

2.3.4. Klinična znamenja, patoanatomske in patohistološke spremembe

PMWS

Najpogosteje PMWS prizadene prašiče med 7. in 15. tednom starosti. Večina bolezenskih znamenj je neznačilnih (Darwich in sod., 2004). Obolevnost je običajno 4-30 % (občasno 50-60 %), smrtnost pa 4-20 % (Segalés in sod., 2006). Najbolj izstopajoča bolezenska znamenja so hujšanje, oteženo dihanje, povečane podkožne bezgavke; manj pogosto se pojavi bledica kože, zlatenica in driska. Občasno so poročali tudi o kašlju, povišani telesni temperaturi, živčnih znamenjih in nenadnih poginih (Segalés in sod., 2006; Darwich in sod., 2004; Allan in Ellis, 2000). Ob raztelesbi so najbolj očitne spremembe (ki pa niso vselej prisotne): nabrekla, nekolabirana pljuča in povečane bezgavke (večinoma ingvinalne, submandibularne, mezenterialne in mediastinalne) (Segalés in sod., 2004). V nekaterih primerih so jetra povečana ali atrofirana, bleda in čvrsta z različno izraženimi vnetnimi ali nevnetnimi spremembami (hepatitis, nekroza). V kasnejši fazi se lahko pojavi generalizirana zlatenica. Pri nekaterih prašičih se pojavljajo nabrekle ledvice s pikčastimi krvavitvami in belimi lisami (petehije, infarkti) v skorji. Poročali so tudi o plevritisu, peritonitisu in gastroenteritisu (Segalés in sod., 2004, Segalés in sod., 2006; Quintana in sod., 2001).

Za PMWS so značilne histološke spremembe v limfoidnih tkivih: zmanjšanje števila limfocitov skupaj z infiltracijo histiocitov in/ali večjedrnih celic velikank. Te limfoidne spremembe se pojavljajo v bezgavkah, tonzilah, Peyerjevih ploščah, vranici in timusu. Ostale histološke spremembe, ki se pojavljajo so: limfohistiocitna intersticijska pnevmonija, hepatitis, limfocitna ali limfohistiocitna infiltracija v intersticiju ledvic, atrofija črevesnih resic (Darwich in sod., 2004).

PDNS

Obolijo odstavljeni, pitanci in odrasle živali, najpogosteje med 12. in 14. tednom starosti. Obolevnost je običajno manj kot 1 % (Segalés in sod., 2006; Chae, 2005). Smrtnost je skoraj 100 % pri prašičih starejših od 3 mesecev in okoli 50 % pri mlajših živalih. Pri akutnem poteku bolezni prašiči lahko poginejo v nekaj dneh po pojavu simptomov bolezni. Preživeli prašiči običajno okrevajo; na teži začno pridobivati 7–10 dni po pojavu sindroma (Segalés in

sod., 2006). Najbolj značilno klinično znamenje je prisotnost okroglih ali nepravilno oblikovanih rdeče-vijoličnih makul in papul (1 do 20 mm v premeru) na koži, predvsem na področju zadnjih okončin in na področju perineuma (Segalés in sod., 2006; Chae, 2005). Sčasoma kožne spremembe prekrijejo temne kraste, ki po 2–3 tednih obledijo, ostanejo pa lahko brazgotine. Blago prizadeti prašiči imajo le spremembe na koži; večina se jih opomore brez zdravljenja. Pri hudo prizadetih prašičih pa se pojavljajo še naslednja bolezenska znamenja: anoreksija, depresija, hipertermija, izguba telesne teže, dispneja ali tahipneja. Večina teh živali pogine v nekaj dneh po pojavu kliničnih znamenj (Drolet in sod., 1999).

Pri raztelesbi ima večina živali povečane, blede ledvice s petehijami po celotni površini ledvične skorje (Segalés in sod., 2004). Bezgavke so povečane in sočne, pogosto s krvavitvami. Prisotni so lahko infarkti vranice (Segalés in sod., 2006).

PCV2 v povezavi z respiratornimi obolenji

Z mikroskopsko preiskavo lahko ugotovimo bronhointersticijsko pnevmonijo s peribronhialno in peribronhiolarno fibrozo, brez sprememb značilnih za PMWS (Chae, 2005; Opriessnig, 2007). Harms in sod. (2002) so opisali tri primere sočasnih okužb: PCV2 in PRRSV, PCV2 in virus PI in PCV2 in *M. hyopneumoniae*. Pri vseh treh primerih se je klinično bolezen podaljšala in bila resnejša. Pri sočasni okužbi s PCV2 in PRRSV so diagnosticirali hudo intersticijsko pnevmonijo; pri okužbi s PCV2 in virusom PI so diagnosticirali bronhiolitis in bronhopnevmonijo; pri okužbi s PCV2 in *M. hyopneumoniae* pa bronhointersticijsko pnevmonijo in spremembe, ki jih povzročajo mikoplazme.

PCV2 v povezavi z reprodukcijskimi motnjami

Najpogosteje se pojavljajo sledeča klinična znamenja: pozni abortusi, mrtvorojeni pujski in mumificirani fetusi ter višja predodstavitvena smrtnost (Chae, 2005; Opriessnig, 2007). PCV2 so dokazali pri mrtvorojenih in nevitalnih pujskih. Pri raztelesbi takih pujskov so odkrili kronično pasivno jetrno kongestijo, kardialno hipertrofijo in difuzni miokarditis (Segalés in sod., 2004; Segalés in sod., 2006).

2.3.5. Vpliv PCV2 na gostiteljev imunski sistem

Bolezni simptomi značilni za PMWS se najpogosteje pojavijo pri starejših odstavljenih in pitancih, kar sovpada z znižanjem titra kolostralnih protiteles (Calsamiglia in sod., 2007). Kolostralna protitelesa so prisotna do 7. tedna starosti prašičev. Ob morebitni okužbi pa se

specifična protitelesa pojavijo okoli 12. tedna in so prisotna do 28. tedna starosti (Rodríguez-Arrijoja in sod., 2002). Opriessnig in sod. (2004a) so ugotovili, da kolostralna protitelesa proti PCV2, ki so bila prisotna pri 10–12 dneh starih pujskih, padejo pod mejo zaznavnosti testa ELISA pri $4,9 \pm 1,2$ tedna starosti pri pujskih z nizkimi vrednostmi protiteles ob odstavitvi; pri $8,1 \pm 1,9$ tedna starosti pri pujskih s srednjimi vrednostmi protiteles ob odstavitvi in okoli $11,1 \pm 2,5$ tedna starosti pri pujskih z visokimi vrednostmi protiteles ob odstavitvi.

Pri subklinično okuženih prašičih se protitelesa IgM pojavijo 7–14 dni po okužbi in so prisotna do 42. dneva po okužbi, medtem ko so protitelesa IgG prisotna več tednov, od 21.–49. dneva po okužbi dalje (Podgorska, 2008). Larochelle in sod. (2003) so ugotovili, da nastopi viremija zaradi okužbe s PCV2 pri 11.–15. tednu starosti prašičev in traja okoli 8 tednov. Virus so dokazali še pri 41 % serumov, odvzetih 23 tednov starim prašičem.

2.3.6. Diagnostika

PCV2 je v prašičji populaciji ubikvitaren in ker okužbe z virusom ne moremo vedno enačiti z boleznijo, so izdelali definicijo za PMWS. Prašič oziroma skupina prašičev ima PMWS, kadar so izpolnjeni sledeči kriteriji:

- prisotnost bolezenskih simptomov, kot so hiranje, izguba teže, respiratorni bolezenski simptomi, povečanje ingvinalnih bezgavk in občasno zlatenica;
- dokaz karakterističnih histopatoloških sprememb v limfoidnem tkivu;
- zmerne do visoke količine PCV2, ki se nahajajo v spremenjenem limfoidnem in drugih tkivih prizadetega prašiča (Segalés in sod., 2006; Opriessnig, 2007).

Ta definicija ne izključuje prisotnosti drugih bolezni, ki spremljajo PMWS. Čredna diagnoza temelji na bolezenskih simptomih, kot sta hiranje in smrtnost (število takih živali se močno poveča), kot tudi na prej opisani individualni diagnozi PMWS pri prašiču ali skupini prašičev (Segalés in sod., 2003).

Diagnoza PDNS temelji na dveh glavnih kriterijih:

- prisotnost hemoragičnih in nekrotizirajočih kožnih sprememb, primarno lociranih na zadnjih okončinah in področju perineuma in/ali otekle in blede ledvice z generaliziranimi petehijami po ledvični skorji;
- prisotnost sistemskega nekrotizirajočega vaskulitisa ter nekrotičnega in fibrinoznega glomerulonefritisa (Segalés in sod., 2006).

Diagnoza s PCV2 povezanimi reprodukcijskimi motnjami temelji na treh kriterijih:

- abortus v drugi polovici brejosti in mrtvorojeni pujski;
- fibrozni in/ali nekrotizirajoči miokarditis;
- prisotnost velikih količin PCV2 v miokardialnih spremembah in ostalem tkivu fetusa (Segalés in sod., 2006).

Laboratorijska diagnostika

Razvitih je bilo kar nekaj metod za dokazovanje PCV2 v tkivih. Najpogosteje se uporabljata testa in situ hibridizacija (ISH) za ugotavljanje nukleinske kisline in imunohistokemija (IHC) za ugotavljanje antigena (Segalés in sod., 2003; Opriessnig, 2007). Pri ISH se za PCV2 uporabljajo segmenti DNA, ki ustrezajo specifičnemu delu genoma PCV2. Pri IHC se uporabljajo monoklonalna ali poliklonalna protitelesa za ugotavljanje antigena v tkivu, fiksiranem s formalinom ali vložnem v parafinu. ISH je bolj specifičen kot IHC, zlasti kadar se pri IHC uporabljajo poliklonalna protitelesa (Opriessnig, 2007).

Obstaja kar nekaj testov PCR za dokaz PCV2 specifičnih nukleinskih kislin, vendar najbolj priporočajo uporabo kvantitativnega PCR v realnem času, s katerim lahko določimo število kopij genoma PCV2 v serumu ali tkivu (Segalés in sod., 2006; Opriessnig, 2007).

Izolacija virusa poteka na celicah PK 15. Za dokaz replikacije virusa na celičnih kulturah se uporablja imunofluorescenčno ali imunoperoxidazno barvanje (Opriessnig, 2007).

Razvili so tudi direktno in indirektno imunofluorescenco na zamrznjenih tkivnih rezinah. Uporabljajo se monoklonalna ali poliklonalna protitelesa. Test je hiter, vendar dokaz antigena ne moremo vedno trdno povezati s patoanatomskimi spremembami.

Opisan je tudi test ELISA za dokaz antigena na homogeniziranih tkivih in rezultati so bili primerljivi s kvantitativno izolacijo virusa in IHC (Opriessnig, 2007).

Razvitih je tudi nekaj seroloških metod za dokaz protiteles proti PCV2. Diagnosticiranje PCVD z uporabo seroloških tehnik je lahko problematično, ker je PCV2 ubikvitaren in je serokonverzija podobna na farmah s PMWS in na farmah brez PMWS (Segalés in sod., 2006). Uporaba serologije je najprimernejša na čredni osnovi, za ugotavljanje časa okužbe s PCV2 v populaciji. Protitelesa proti PCV2 lahko ugotavljamo z indirektnim fluorescenčnim testom,

testom IPMA (angl.: indirect immunoperoxidase monolayer assay), testom ELISA in serum nevtralizacijskim testom (Opriessnig, 2007).

2.3.7. Preventiva in nadzor bolezni

Preden so vaccine postale dostopne na trgu, so PCVD nadzirali z zmanjševanjem stresa, z eliminacijo sočasnih okužb ali zmanjševanjem njihovih učinkov in z eliminacijo sprožilnih dejavnikov, ki pretvorijo okužbo s PCV2 v PCVD (Opriessnig, 2007). Na farmah, kjer je bila okužba zelo razširjena so izvajali t.i. »Madecov načrt«, ki obsega 20 točk (ukrepov), s katerimi so zmanjšali vpliv bolezni in signifikantno znižali smrtnost (Segalés in sod., 2006; Rose in sod., 2003). Teh 20 točk so povzeli v 4 zlatih pravilih, ki vključujejo: omejevanje kontakta med prašiči, zmanjševanje stresa, dobra higiena in dobra prehrana (Opriessnig, 2007). Rose in sod. (2003) so ugotovili, da so dejavniki tveganja pri tunnelskem sistemu reje za PCVD sočasne okužbe s prašičjim parvovirusom in virusom PRRS pri pitancih, veliki boksi pri odstavljenih in prestavljanje pujskov. Opriessnig in sod. (2004b) so ugotovili, da je potrebno v čredah s PMWS določiti čas okužbe s PCV2 in temu prilagoditi čas vakcinacij zoper druge povzročitelje, da se zmanjša učinke PMWS. Na farmah s PMWS so poročali tudi o uspešnosti terapije s serumom, ki so ga odvzeli prašičem na farmi in aplicirali pujskom oziroma odstavljenecem (Valenčak in Martinjak, 2005).

Sedaj so na voljo tudi komercialne vaccine za uporabo pri svinjah in mladica in tudi pri pujskih nad 3 tedni starosti (Segalés in sod., 2006).

2.4. Prašičja influenza (PI)

Virus prašičje influence pogosto povzroča respiratorne bolezni pri prašičih. Virus PI sinergistično sodeluje z drugimi virusi in bakterijami pri nastanku PRDC. Poleg pomena, ki ga ima pri prašičih, okužbe z virusom PI predstavljajo pomembno potencialno grožnjo javnemu zdravstvu (Olsen in sod., 2006).

PI se je prvič pojavila leta 1918 v ZDA. Sovpadala je s pandemijo gripe pri ljudeh, ko je po svetu umrlo 20–50 milijonov ljudi (Bachmann, 1989). Zaradi kliničnih podobnosti z gripo pri ljudeh je Koen leta 1919 bolezen pri prašičih poimenoval gripa (Olsen in sod., 2006). Virus PI so izolirali in identificirali šele leta 1930. Klasičen prašičji virus H1N1 se je v Evropi pojavil leta 1976. Leta 1979 se je v Evropi pojavil aviarni podtip virusa H1N1, ki je antigensko različen

od klasičnega virusa H1N1. Okoli leta 1970 se je po pandemiji hongkonške gripe humani virus H3N2 prenesel iz ljudi na prašiče. V Evropi so ga šele leta 1984 povezali z izbruhi PI (Castrucci in sod., 1993; Easterday in Van Reeth, 1999). Leta 1998 je v ZDA začel krožiti nov podtip virusa PI H3N2, ki je povzročal hude reproduktivne in/ali respiratorne motnje ter se je antigensko in genetsko razlikoval od evropskega podtipa H3N2. Virus influence A H1N2 na Japonskem že od leta 1970 povezujejo z respiratornimi obolenji pri prašičih (Brown, 2000).

O novem humanem virusu H1N1 pri ljudeh so prvič poročali aprila 2009 iz Mehike in ZDA; bolezen so takrat poimenovali prašičja gripa. Novi virus H1N1 vsebuje gene prašičjih, aviarnih in humanih virusov influence v kombinaciji, ki je do sedaj še ni bilo (Trifonov in sod., 2009).

2.4.1. Etiologija

PI povzročajo virusi influence, ki sodijo v družino *Orthomyxoviridae* (Olsen in sod., 2006).

Virusi influence imajo ovojnico in so pleomorfni. Lahko so sferične ali filamentozne oblike, srednje veliki, s premerom od 80–120 nm. Virusni genom se sestoji iz osmih polarnih enovijačnih segmentov RNA, ki kodirajo 11 virusnih proteinov (Whittaker, 2001). Segmentirana narava genoma omogoča virusom influence genetsko rekombinacijo (ustvarjanje novih genskih kombinacij) (Olsen in sod., 2006).

V lipidni ovojnici se nahajajo površinski glikoproteini hemaglutinini (HA) in nevraminidaze (NA) ter transmembranski matriks protein (M2) (Easterday in Van Reeth, 1999). HA povzroči endocitozo virusa v gostiteljevo celico. Na protein HA se vežejo tudi nevtralizacijska protitelesa. NA sodeluje pri sproščanju nastalih virionov iz gostiteljeve celice (Whittaker, 2001).

Proteinske (M1) molekule matriksa se nahajajo pod ovojnico in obdajajo ribonukleoproteinski (RNP) kompleks. Spiralen kompleks molekul se sestoji iz RNA, ki so povezane s številnimi kopijami nukleoproteina (NP) in polimerazami (PA, PB1, PB2), le te pa so odgovorne za replikacijo in transkripcijo RNA (Easterday in Van Reeth, 1999; Whittaker, 2001).

Obstajajo trije tipi virusov influence: A, B in C. Influenca A je najbolj razširjena. Najpogosteje se pojavlja pri perutnini, ljudeh, konjih in vodnih sesalcih (Whittaker, 2001). Virus influence A delimo na podtipe, na podlagi antigenske in genetske sestave površinskih

glikoproteinov HA in NA (Bachmann, 1989; Olsen in sod., 2006). Obstaja 16 različnih HA in 9 različnih NA. HA in NA se lahko pojavijo v različnih kombinacijah in definirajo podtip virusa, npr. H1N1, H3N2 (Van Reeth in sod., 2006a).

2.4.2. Epidemiologija

PI se v rejo običajno vnese s premiki živali, predvsem s premiki živali iz okuženih v dovzetne reje (Brown, 2003).

PI se širi s kapljično okužbo in neposrednim stikom. Pri prašičih je najpogostejša nazofaringealna pot okužbe (Easterday in Van Reeth, 1999). Največje količine virusa se izločijo z nosnim izcedkom v 2–5 dneh po okužbi (Olsen in sod., 2006). K širjenju virusa influence največ prispevajo tesni stiki med prašiči, stres, meteorološki in okoljski faktorji (Brown, 2003).

Povzroči lahko izbruhe bolezni na obširnih geografskih področjih, kjer je večja gostota prašičje populacije (Easterday in Van Reeth, 1999).

V preteklosti so se izbruhi PI na severu ZDA in zahodni Evropi najpogosteje pojavljali pozno jeseni in zgodaj pozimi, običajno v povezavi z nižjimi temperaturami in hladnim jesenskim dežjem. Raziskave pa so pokazale, da virus PI kroži celo leto. Ker je prašičja proizvodnja vezana predvsem na zaprte prostore, je bolezen vedno manj sezonske narave (Olsen in sod., 2006).

Na farmah s plemenskimi prašiči lahko virus po prvem izbruhu izgine ali pa ostane prisoten. To je odvisno od številnih faktorjev: velikosti črede, imunskega statusa živali, gostote populacije in sistema managementa. Večina okužb je samoomejujočih, če ni neprestanega vnosa novih, dovzetnih živali (Pensaert, 1995).

Postavljena je bila tudi hipoteza, da se virus PI nahaja v pljučnih črvih (*Metastrongylus*) in deževnikih, vendar pa hipoteze ni bilo moč direktno potrditi (Bachmann, 1989).

Vodne in obrežne ptice redko zbolijo, predstavljajo pa rezervoar virusov, saj so pri njih odkrili vseh 16 HA in 9 NA podtipov virusa influence (Olsen in sod., 2006).

Podtipi virusov H1, H3, N1 in N2 krožijo predvsem med prašiči (Olsen in sod., 2006).

Na posameznih kontinentih se lastnosti teh virusov razlikujejo. Prevladujoči virus PI v Evropi aviarni tip H1N1 se je prenesel iz divjih rac na prašičjo populacijo leta 1979. V ZDA krožita

t.i. klasičen virus H1N1, ki je prisoten že od začetka 20. stoletja, in novi H1N1, ki ima površinske glikoproteine klasičnega virusa in notranje proteine novejšega virusa PI H3N2 in H1N2 (Van Reeth in sod., 2006a).

Nastanek novih sevov virusa PI

Do prenosa virusov influence z ene na drugo živalsko vrsto lahko pride na različne načine:

- Virus influence A se nespremenjen prenese iz ene vrste živali na prašiče.
- Virus influence se lahko antigensko spremeni (antigenski odmik) zaradi postopnega kopičenja mutacij v genih, ki kodirajo HA in/ali NA.
- Pri sočasni okužbi prašiča z dvema nesorodnima virusoma influence A lahko pride do prerazporejanja genetskih segmentov (antigenski premik). Tako nastane nov virus z drugačnimi antigenimi in genetskimi značilnostmi. Do tega pride zaradi segmentiranega genoma influence, ki omogoča, da se pri sočasni okužbi med procesom razmnoževanja virusa, segmenti RNA zamenjajo (Done in Brown, 1998; Brown, 2003; Van Reeth s sod., 2006a; Mengeling, 2003).

Prašiči so dovzetni za okužbe s humanimi in aviarnimi virusi influence A. Ito je s sodelavci (1998) dokazal na traheji prašiča celične receptorje tako za humane (SA α 2,6Gal) kot za aviarne (SA α 2,3Gal) viruse influence A. Tako lahko humani in aviarni virusi hkrati okužijo iste celice gostitelja.

Razširjenost PI

Virusa PI H1N1 in H3N2 sta v večini držav Evrope prisotna enzootično s čredno seroprevalenco od 44 do 100 % (Segalés, 2002). V Aziji ima 70 % rej protitelesa proti virusu PI (Bruguera in sod., 2005). V ZDA so ugotavljali seroprevalenco proti virusu H3N2, H1N1 in H1N2. Ugotovili so, da je 31 % serumov imelo protitelesa proti podtipu H3N2, 67 % proti podtipu H1N1 in 2 % proti podtipu H1N2 (Swenson in sod., 2001).

V Sloveniji smo v letu 2006 dokazali protitelesa proti virusu PI podtipa H1N1 pri 49,6 % plemenskih svinj in pri 47 % pitancev. Delež plemenskih svinj, okuženih s podtipom H3N2, je v letih 2001 do 2003 znašal 36 %, pri pitancih pa 26 % (Golarin Oven, 2007).

2.4.3. Patogeneza

Okužba z virusom PI je večinoma omejena na zgornji respiratorni trakt. Virus se razmnožuje v epitelijskih celicah nosne sluznice, tonzil, traheje, pljuč in traheobronhialnih bezgavk.

Viremija se zelo redko pojavlja, če pa se, traja zelo kratek čas, titri virusa pa so zelo nizki (Olsen in sod., 2006).

Virus je v organizmu prisoten le kratek čas. Številne raziskave so pokazale, da se izločanje virusa z nosnim izcedkom začne že en dan po okužbi, preneha pa po 7 dneh. Imunohistokemične raziskave so pokazale zelo visok, specifičen tropizem virusa za bronhialni in alveolarni epitelij (Van Reeth in sod., 2006a).

Poškodbe celice, ki jih povzročajo virusi influence, nastanejo zaradi apoptoze. Apoptozo sprožijo nevraminidazni proteini in/ali nestrukturni protein NS1 (Schultz-Cherry in sod., 1998).

Ugotovili so, da imajo zgodnji citokini, ki nastanejo na mestu infekcije, pomembno vlogo pri razvoju kliničnih in patoloških sprememb. Sem sodijo interferon-alfa (INF- α), dejavnik tumorske nekroze (angl.: tumor necrosis factor- α ; TNF- α), interleukin-1 (IL-1) in interleukin-6 (IL-6), ki so odgovorni za oslABLJENO delovanje pljuč, vročino, prekomerno zaspanost, slabost in neješčnost (Van Reeth, 2000).

2.4.4. Vpliv virusov influence A na gostiteljev imunski sistem

Okužbi z virusom PI sledi humoralni in celični imunski odziv. Protitelesa sodelujejo pri specifičnem imunskem odzivu na dva načina: z vezavo na okuženo celico zmanjšajo nastajanje novih virusov, z vezavo na novo nastale viruse pa zavirajo širjenje okužbe (Mozdzanowska in sod., 1999). Humoralni imunski odziv nastane proti proteinom HA, NA, M in NP, vendar pa le protitelesa proti HA lahko preprečijo vezavo virusa na gostiteljeve celične receptorje. Protitelesa proti proteinom NA, M in NP ne preprečijo okužbe (Heinen, 2003).

Imunski odgovor pri okužbi z virusom PI je hiter in učinkovit, saj virusa v respiratornem traktu po enem tednu ne moremo več dokazati. Protitelesa proti HA lahko v serumu zasledimo 7–10 dni po okužbi. Specifični IgG in IgA dosežejo vrh 2–3 tedne po primarni okužbi z virusom PI H1N1 in bistveno ne narastejo po okužbi (Larsen in sod., 2000). Titer protiteles ostane visok nekaj tednov, po 8–10 tednih pa začne padati (Olsen in sod., 2006). Povišano količino specifičnih IgM in IgG so dokazali že tretji dan po eksperimentalni okužbi, specifične IgA v nosnih vzorcih pa so ugotovili četrti dan po okužbi (Lee in sod., 1995).

Po primarni okužbi z virusom PI so prašiči odporni na ponovno okužbo z istim ali podobnim virusnim sevom, ne ve pa se, kako dolgo traja zaščita. Zaradi različnih podtipov virusov influence, ki sočasno krožijo v Evropi in ZDA, so prašiči v življenju izpostavljeni mnogim, antigensko različnim virusom (Olsen in sod., 2006). S pomočjo eksperimentalnih študij so dokazali omejeno navzkrižno zaščito pri okužbi z evropskimi virusi PI H1N1, H3N2 in H1N2 (Van Reeth in sod., 2003).

Kolostrum večinoma vsebuje protitelesa IgG, ki največkrat ne preprečijo okužbe z virusi influence. Količina protiteles proti virusom PI pri pujskih je odvisna od količine protiteles pri svinji; čez čas (4–14 tednov) nivo protiteles v serumu pujskov pade. Maternalna imunost ne omogoča navzkrižne zaščite pred okužbo z različnimi podtipi virusa PI (Olsen in sod., 2006).

2.4.5. Klinična znamenja

Klinična znamenja so pri okužbah s podtipi H1N1, H1N2 in H3N2 podobna. Bolezen nastopi po eno- do trodnevni inkubacijski dobi (Olsen in sod., 2006). Za bolezen je značilna povišana telesna temperatura (do 41,8 °C), živali so oslabele, apatične, neješče in nerade vstajajo. Opazimo lahko tudi konjunktivitis, rinitis, nosni izcedek, kihanje, kašljanje in izgubo teže (Taylor, 2006b). Dihanje je težavno, sunkovito in hitrejše. Pogosto lahko opazimo abdominalni tip dihanja (Bachmann, 1989). V Severni Ameriki so pri okužbi s podtipom H3N2 poročali o abortusih pri svinjah (Wesley, 2004).

Obolevnost živali je zelo visoka (okoli 100 %), smrtnost pa zelo nizka (običajno manj kot 1 %), razen v primeru mešanih okužb in/ali če obolijo mlade živali. Živali ozdravijo v 5–7 dneh po pojavu kliničnih znamenj (Olsen in sod., 2006).

Akutna oblika PI se pojavlja le pri zelo dovzetnih prašičih. Plemenske živali zaradi pridobljene imunosti večinoma ne zbolijo. Subklinične okužbe se lahko pojavljajo pri pitancih, zlasti v čredah, kjer je visoka seroprevalenca različnih podtipov virusa PI (Olsen in sod., 2006).

2.4.6. Patoanatomske in patohistološke spremembe

Pri nekomplikirani PI so spremembe na pljučih posledica virusne pljučnice in se nahajajo predvsem na apikalnih in srčnih pljučnih režnjih. Pri hudi pljučnici je lahko prizadeta polovica pljučnega tkiva. Običajno poteka med zdravim in poškodovanim pljučnim tkivom demarkacijska linija (Olsen in sod., 2006). Spremembe so čvrste, ostro omejene,

modrikastordeče (Olsen in sod., 2006), kasneje rožnato sive barve (Taylor, 2006b). Prisoten je lahko interlobularni edem (Easterday in Van Reeth, 1999). Bronhi in bronhioli so dilatirani in zapolnjeni z eksudatom in sluzjo. Bronhialne in mediastinalne bezgavke so običajno polnokrvne in povečane (Bachmann, 1989; Taylor, 2006b). Pri hudi obliki PI se lahko pojavi tudi fibrinozni plevritis (Easterday in Van Reeth, 1999).

Opazimo lahko degeneracijo in nekrozo epitelija bronhov in bronhiolov. Lumen bronhov, bronhiolov in alveol je poln eksudata, ki vsebuje odluščene celice, nevtrofilce, kasneje pa predvsem monocite. Pojavi se tudi hiperplazija, polnokrvnost in celična infiltracija pljučnega tkiva. Te poškodbe lahko spremlja še alveolarna atelektaza, intersticijska pnevmonija, emfizem ter peribronhialna in perivaskularna celična infiltracija (Bachmann, 1989).

2.4.7. Diagnostika

Končna diagnoza PI je možna le v laboratoriju s pomočjo izolacije virusa, ugotavljanja virusnih proteinov ali nukleinskih kislin ali z dokazovanjem specifičnih protiteles (Olsen in sod., 2006).

Izolacija virusa

Virus lahko izoliramo iz nosnega brisa oziroma brisa žrela pri zelo majhnih prašičih. Izberemo živali, ki kažejo respiratorne znake in imajo povišano telesno temperaturo. Optimalni čas za jemanje nosnih brisov pri prašičih je 2–5 dni po pojavu kliničnih znamenj (Terrini, 2005).

Virus lahko izoliramo tudi iz traheje ali pljučnega tkiva pri poginjenih ali usmrčenih živalih v akutni fazi bolezni (Olsen, 2006).

Izolacija virusa lahko poteka na deset- do enajstdnevnih embrioniranih piščančjih jajc. Po 72-96-urni inkubaciji amnijsko ali alantoisno tekočino testiramo na prisotnost hemaglutininov s pomočjo piščančjih eritrocitov (Bachmann, 1989; Beard, 1989). Izolacija virusa lahko poteka tudi na celičnih kulturah: govejih, pasjih ali prašičjih ledvičnih celicah, prašičjih pljučnih ali trahealnih epitelnih celicah, na prašičjih celicah mod, na človeških diploidnih celicah, Vero celicah in na pljučnih celicah kune zlatice (Olsen, 2006).

Identifikacija podtipa virusa PI se ugotavlja s pomočjo testa inhibicije hemaglutinacije in inhibicije nevraminidaze (Swenson in Foley, 2004).

Obratna transkripcija z verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR)

Občutljivost metode RT-PCR je primerljiva z izolacijo virusa. Njena prednost je v krajšem času izvedbe testa in obdelavi večjega števila vzorcev. Metoda je primerna tudi za ugotavljanje specifičnih podtipov HA kot tudi za nadaljno genetsko karakterizacijo virusnih izolatov (Choi in sod., 2002).

Ostale metode za ugotavljanje virusa ali virusnega antigena so:

- direktna imunofluorescenca (IF), ki se izvaja na pljučnem tkivu, nosnih celicah ali na vsebini bronhoalveolarnega izpirka;
- imunohistokemični test, kjer se uporablja tkivo fiksirano s formalinom;
- test ELISA (Olsen, 2006);
- hitri encimsko imunski test za ugotavljanje virusa influence A (BD DirectigenTM Flu A), kjer se uporabljajo nosni brisi in pljuča prašičev (Maldonado in sod., 2006).

Dokazovanje specifičnih protiteles

Najpogostejši serološki test za ugotavljanje protiteles proti virusu PI je test inhibicije hemaglutinacije (IH), čeprav so testi ELISA postali komercialno dostopni. Ostali testi, kot je npr. seroneutralizacijski test (SNT) ali enojen radialni test hemolize, se uporabljajo za ugotavljanje protiteles proti virusu PI, vendar le v specializiranih laboratorijih. S testom IH in SNT lahko ugotovljamo tip in podtip virusa (Olsen, 2006).

Test inhibicije hemaglutinacije (IH)

Test IH je klasičen serološki test za ugotavljanje protiteles proti virusu PI. Dokazano je, da je test IH še vedno dovolj specifičen, da loči med infekcijami z evropskimi sevi virusov H1N1, H3N2 in H1N2 pri nevakciniranih prašičjih čredah (Van Reeth in sod., 2006b). Pri testiranju je treba paziti na prisotnost nespecifičnih inhibitorjev in nespecifičnih aglutininov v prašičjem serumu, zaradi katerih je lahko rezultat lažno pozitiven (Swenson in Foley, 2004).

IH je specifičen test. S testom IH povečanega titra protiteles ne bomo zaznali, ko je virus PI, ki kroži v čredi, antigensko drugačen (nov podtip ali antigensko spremenjen podtip) od antigena, ki se uporablja v testu (Olsen, 2006).

Encimskoimunski (ELISA) testi

Prednosti komercialnih testov ELISA pred IH so: lažja standardizacija, avtomatizacija, nižji stroški in lažja izvedba, vendar pa testi ELISA niso tako specifični in občutljivi kot IH (Lang in sod., 2006). Testi ELISA, ki so danes na voljo, slabo razlikujejo med podtipi virusov influence A. To velja zlasti za teste ELISA za ugotavljanje protiteles proti podtipu H3N2 (Lang in sod., 2006; Schmoll in sod., 2006).

2.4.8. Zdravljenje

Specifičnega zdravljenja za PI ni (Bachmann, 1989). Akutno obliko PI zdravimo z antibiotiki, da preprečimo sekundarne bakterijske infekcije in z antipiretiki, da skrajšamo obdobje neješčnosti in izgube teže (Pensaert, 1995).

2.4.9. Ukrepi za preprečevanje PI v reji

Najpogostejši ukrepi, ki se uporabljajo pri preprečevanju vnosa PI v rejo, so:

- izvajati način »all in–all out« (AIAO) – vse noter–vse ven, kjer je le mogoče,
- karantena živali, ki na novo pridejo v rejo,
- omejitev prometa na farmi,
- zagotavljanje sveže pitne vode,
- čiščenje in razkuževanje prostorov in orodja, ki se uporablja na farmi,
- zmanjšati prenaseljenost hlevov,
- zmanjšati količino prahu (Done, 2002),
- organizirati rejo tako, da bo premikanje in mešanje živali minimalno,
- preprečevanje stikov z ostalimi vrstami živali, zlasti s perutnino,
- preprečevanje stikov z ljudmi obolelimi z influenco,
- izvajanje vakcinacije (Easterday in Van Reeth, 1999).

Vakcinacija

Ponekod v Evropi in v ZDA uporabljajo preventivno intramuskularno vakcinacijo s komercialno inaktivirano vakcino. Živali vakcinirajo dvakrat z dva- do štiritedenskim razmakom. Prva vakcinacija je priporočljiva pri starosti 10–14 tednov, ko ni več maternalnih protiteles. Za svinje so priporočljive poživitvene doze cepiva (angl.:booster) dvakrat letno. Sevi, ki se uporabljajo v posamezni vakcini, se razlikujejo glede na kontinent, saj obstajajo antigenske in genetske razlike med virusi PI, ki krožijo v Evropi oziroma ZDA (Olsen in sod., 2006).

2.5. Prašičji respiratorni korona virus - PRCV

Prašičji respiratorni korona virus (PRCV) je bil prvič izoliran leta 1984 v Belgiji in je antigensko soroden virusu, ki povzroča virusno vnetje želodca in črevesja (angl.: transmissible gastroenteritis virus – TGEV) (Chae in sod., 2000; Ahn in sod., 1997).

V tem obdobju se je v Evropi povečala prevalenca protiteles proti TGEV, vendar brez kliničnih izbruhov bolezni, kar je privedlo do ugotovitev, da okužbo najbrž povzroča soroden koronavirus. Naknadno so nato raziskovalci izolirali PRCV (Halbur in sod., 1993).

2.5.1. Etiologija

PRCV sodi v družino *Coronaviridae*, rod *Coronavirus*. PRCV ima ovojnico in vsebuje enovijačno pozitivno polarno RNA (Saif in Sestak, 2006).

PRCV ima 4 strukturne proteine: površinski glikoprotein S, majhni membranski protein E ali sM, integralni membranski glikoprotein M in nukleokapsidni protein N (Cavanagh in sod., 1994). Na S glikoproteinu se nahajajo epitopi, ki sprožijo nastanek nevtralizacijskih protiteles. S glikoprotein vsebuje 4 glavna antigenska mesta (A, B, C, D) (De Diego in sod., 1992). Izguba antigenkega epitopa D na PRCV omogoča diferencialno diagnozo TGEV in PRCV z uporabo monoklonskih protiteles proti epitopu D (Sestak in sod., 1999). S glikoprotein pri PRCV znaša 170 do 190 kDa, pri TGE pa 220 kDa.

S seronevtralizacijskim testom ni mogoče ločiti PRCV od enteropatogenih sevov TGEV.

Seve PRCV, izolirane med leti 1984 do 2000, so delno sekvenirali. Ugotovili so, da je med TGEV in PRCV 96 % skladnost nukleotidnih in amino kislinskih sekvenc, kar kaže na to, da se je PRCV razvil iz TGEV (Saif in Sestak, 2006).

2.5.2. Epidemiologija

PRCV so prvič izolirali leta 1984 v Belgiji, ko so s serološkimi preiskavami izločenih svinj ugotovili povečano prevalenco protiteles proti TGEV. Živali niso bile cepljene proti TGEV, niti kazale kliničnih znamenj, značilnih za TGE. PRCV se je hitro razširil v večino evropskih držav. V ZDA se je pozimi v letih 1988–1989 pojavila nepojasnjena serokonverzija na TGEV, čeprav tudi tu živali niso bile vakcinirane ali izpostavljene TGEV (Wesley in sod., 1990).

PRCV invadira epiteljske celice respiratornega trakta in alveolarne makrofage (Flori in sod., 1995). Costantini in sod., (2004) so z vgnezdno obratno transkripcijo z verižno reakcijo s

polimerazo (angl.: nested reverse transcription polymerase chain reaction - nRT-PCR) ugotovili, da je na PRCV pozitivnih 57 % nosnih in 37 % rektalnih brisov. PRCV invadira tudi črevesje, kar se kaže z izločanjem virusa z blatom. V tem primeru resice niso atrofirane.

PRCV okuži prašiče vseh starosti (Taylor, 2006c). Širi se po zraku ali z dotikom (Saif in Sestak, 2006).

Raziskave so pokazale, da na prenos in širjenje PRCV vplivajo številni dejavniki: velikost prašičje črede, razdalje med farmami, letni čas, premiki okuženih prašičev (Flori in sod., 1995).

Okužbe s PRCV so pogosto subklinične in se hitro širijo med prašiči (Wesley in sod., 1997).

PRCV okuži prašiče med 20. in 26. tednom starosti, potem ko ni več prisotne kolostralne imunosti (Saif in Sestak, 2006). Kolostralna imunost lahko traja do 3 ali 4 meseca starosti živali (Taylor, 2006c). Serokonverzija proti PRCV se pojavi kmalu po prestavitvi prašičev v pitališče in mešanju PRCV negativnih in PRCV pozitivnih prašičev iz različnih virov (Saif in Sestak, 2006).

Wesley in sod. (1990) so ugotovili, da eksperimentalno okuženi prašiči okoli 2. tedna po okužbi izločajo virus z nosnim izcedkom. Ni dokazov za fekalno-oralni prenos PRCV.

Raziskave so pokazale, da se živali lahko okužijo s PRCV že takoj po odstavitvi, kljub prisotnosti kolostralnih protiteles. PRCV lahko vztraja v čredi celo leto ali pa začasno izgine iz črede (večinoma poleti) in se v hladnih mesecih ponovno pojavi v vzrejališču in pitališču. Valovi okužbe, brez kliničnih znamenj, sovpadajo z deževno sezono v Evropi (Saif in Sestak, 2006).

2.5.3. Klinična znamenja

Resnost kliničnih znamenj in stopnja patogenosti je odvisna od seva PRCV. Pojav respiratornih bolezní je odvisen od dejavnikov okolja, letnega časa, managementa, količine virusa in prisotnosti drugih bakterijskih in virusnih povzročiteljev v čredi (Saif in Sestak, 2006).

PRCV so najprej imeli za nepatogeni virus (Jabrane in sod., 1992). V raziskavi, v kateri so primerjali ameriške seve PRCV, so opazili, da se razlikujejo v patogenosti. Ko so primerjali med seboj izolate PRCV, sta dva izolata (AR310 in LEPP) z izgubo S gena povzročila zmerna

respiratorna obolenja pri prašičih, medtem ko je tretji izolat povzročil le blage respiratorne težave (Saif in Sestak, 2006).

Pri eksperimentalni okužbi prašičev s PRCV, ki so bili pred tem brez protiteles proti PRCV, so po 1 do 5 dneh opazili neješčnost, ležanje, pospešeno dihanje in povišano telesno temperaturo. V isti raziskavi, ki je potekala pri gnotobiotskih prašičih, pa kliničnih znamenj niso opazili (Taylor, 2006c).

Ugotovili so, da so se klinična znamenja stopnjevala, ko so dva dni po okužbi s PRCV, prašiče inokulirali še z virusom PI ali virusom bolezni Aujeszkega. Sočasna okužba s PRRSV pa je privedla do dolgotrajno povišane telesne temperature z respiratornimi kliničnimi znamenji, nižjimi prirasti in daljšim izločanjem PRCV (Saif in Sestak, 2006). Tudi pri sočasni okužbi z *B. bronchiseptica* so bile patološke in histopatološke spremembe na pljučih resnejše (Brockmeier in sod., 2008).

2.5.4. Patogeneza

PRCV se razmnožuje v respiratornem traktu. V visokih titrih se pojavlja v pljučih, invadira pa tudi epiteljske celice nosne votline, traheje, bronhov, bronhiolov, alveole in alveolarne makrofage (Jabrane in sod., 1994). Viremija se pojavi po primarni okužbi, nato se virus raznese v parenhimske organe in bezgavke (Saif in Sestak, 2006). Ugotovili so tudi, da imajo le nekatere celice tankega črevesa receptorje za PRCV (Costantini in sod., 2004).

Prašiči izločajo virus z nosnim izcedkom 1 do 6 dni po okužbi. Ne prehaja skozi placento, v semenu merjascev pa so ga zasledili do 6 dni po okužbi. Protitelesa v serumu dokažemo en teden po okužbi (Taylor, 2006c).

2.5.5. Patoanatomske in patohistološke spremembe

V primeru okužbe s PRCV ni opaziti atrofije črevesnih resic (Saif in Sestak, 2006). Spremembe so običajno omejene na pljuča in bronhe (Taylor, 2006c).

Histopatološke spremembe pljuč prašičev brez kliničnih znamenj so pokazale, da PRCV pri večini okuženih živali povzroča difuzno intersticijsko pljučnico. Nekateri poročajo o hudih respiratornih motnjah, odvisno od seva in odmerka PRCV, ki so ga uporabili pri eksperimentalno okuženih prašičih (Saif in Sestak, 2006; Halbur in sod., 1993).

2.5.6. Vpliv PRCV na gostiteljev imunski sistem

Opazili so, da so se po okužbi evropskih prašičev s PRCV, epidemični izbruhi TGE v Evropi občutno zmanjšali. Številne raziskave so pokazale, da je predhodna okužba s PRCV zmanjšala posledice okužbe s TGEV, kar je pri nekaterih živalih povzročilo kratkotrajnejše izločanje TGEV in blažje driske. Mehanizem delne imunosti je verjetno v povezavi s hitro naraščajočim titrom nevtralizacijskih protiteles proti TGEV in s številnimi IgG in IgA protitelesi v črevesu prašičev, predhodno okuženih s PRCV. Novorojeni pujski po okužbi s PRCV potrebujejo vsaj 6 do 8 dni, da razvijejo delno imunost na TGEV, kar je verjetno prepozno, da bi seronegativne novorojene pujske zaščitilo pred epidemičnim TGE (Saif in Sestak, 2006; De Diego in sod., 1992).

2.5.7. Diagnostika

Ugotavljanje virusnega antigena

PRCV se lahko ugotavlja v pljučnem tkivu in nosnem epiteliju s testom imunofluorescence in imunohistokemije, kjer se uporablja tkivo fiksirano s formalinom in vloženo v parafin. Za potrditev virusa so potrebna monoklonska protitelesa, saj se TGEV lahko razmnožuje v teh tkivih (Ahn in sod., 1997).

Za ugotavljanje PRCV antigena v nosnem izcedku ali pljučih, lahko uporabimo test sendvič ELISA z dvojnimi protitelesi (Saif in Sestak, 2006).

Ugotavljanje virusne nukleinske kisline

Bae in sod. (1991) v svoji raziskavi opisujejo uporabo nukleinsko kislinskih (cDNA) sond, specifičnih za 5' konec S glikoproteinskega gena virulentnega TGEV za diferenciacijo TGEV od PRCV in ostalih antigensko sorodnih koronavirusov.

Za razločevanje med TGEV in PRCV so uporabili tudi RT-PCR in neradioaktivne sonde (Costantini in sod., 2004).

Preiskava z elektronskim mikroskopom

Elektronski mikroskop lahko uporabimo za ugotavljanje PRCV v nosnem izcedku. S to metodo ne moremo ločiti TGEV od PRCV, razen če uporabimo monoklonska protitelesa (Saif in Sestak, 2006).

Izolacija virusa

Za izolacijo PRCV se najpogosteje uporabljajo prašičje celične linije mod (ST) in primarne prašičje ledvične celice (Wesley in sod., 1990; Halbur in sod., 1993; Jabrane in sod., 1994). PRCV raste tudi na trajnih fetusnih mačjih celičnih linijah (Saif in Sestak, 2006).

Za izolacijo virusa se lahko uporabijo nosni brisi ali homogenizirano tkivo pljuč okuženih prašičev (Wesley in sod., 1990; Halbur in sod., 1993).

Prašičje koronavirusi lahko na celični kulturi dokažemo s serumnevtralizacijskim testom, testom IF ali elektronsko mikroskopijo. Za razlikovanje PRCV od TGE se morajo uporabiti monoklonska protitelesa specifična za TGE (Saif in Sestak, 2006). Izolate lahko diferenciramo tudi z uporabo metode RT-PCR ali specifičnih cDNA sond ter metodo določanja nukleotidnih zaporedij (Kim in sod., 2000).

Serologija

Če želimo vedeti, ali predstavlja endemični PRCV težave v čredi, vzamemo 2 do 6 mesecev starim prašičem vzorce seruma in jih testiramo na protitelesa (Saif in Sestak, 2006).

TGEV in PRCV sprožita tvorbo nevtralizacijskih protiteles, ki so kvalitativno in kvantitativno enaka. Z uporabo testa bloking ELISA lahko ta protitelesa razlikujemo (Saif in Sestak, 2006). Pri tem testu so dna mikrotitrskih jamic prevlečena s TGEV antigenom ali rekombinantnim S proteinom. Protitelesa proti TGEV ali PRCV se loči s pomočjo monoklonskih protiteles. Protitelesa proti TGEV blokirajo vezavo monoklonskih protiteles, protitelesa proti PRCV pa ne. Bloking ELISA je čredni test; prašiče z nizkimi titri protiteles proti TGEV ali PRCV, kar se lahko zgodi v zgodnji fazi okužbe (od 7. do 14. dneva), ta test ne zazna (Sestak in sod., 1999).

2.5.8. Ukrepi

Prašiči, ki so bili cepljeni z rekombinantno adenovirus S vakcino, so kljub temu izločali PRCV z nosnim izcedkom, so pa hitreje nastala nevtralizacijska protitelesa, skrajšal pa se je tudi čas izločanja virusa (Saif in Sestak, 2006; Taylor, 2006c).

2.6. Prašičji reproduktivni in respiratorni sindrom - PRRS

Pri čredah prašičev so v letih 1987 in 1988 iz ZDA poročali o katastrofalnih izbruhih prej nepoznane bolezni. Klinična slika bolezni je obsegala hude reprodukcijske motnje, poodstavitveno pljučnico, slabše priraste in povišano smrtnost. O bolezni so poročali tudi iz Nemčije, Nizozemske, Anglije, Belgije in Španije. Etiologijo bolezni so razrešili leta 1991 raziskovalci Centralnega Veterinarskega Inštituta (Lelystad, Nizozemska) (Zimmerman in sod., 2006; Collins in sod., 1992), kmalu (leta 1992) pa so RNA virus izolirali tudi v ZDA (Collins in sod., 1992) in Kanadi. Prve izolate virusa so na Nizozemskem poimenovali Lelystad virus in v ZDA VR-2332 (Benfield in sod., 1992). Sindromu so naredi mnogo imen: skrivnostna bolezen prašičev, prašičji infertilni in respiratorni sindrom (angl.: swine infertility and respiratory syndrome – SIRS), prašičji epidemični abortivni in respiratorni sindrom (angl.: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome-PEARS) in bolezen modrih ušes (Collins in sod., 1992). V Evropi se je bolj prijel izraz prašičji reproduktivni in respiratorni sindrom (PRRS) (Zimmerman in sod., 2006).

2.6.1. Etiologija

PRRS virus (PRRSV) je majhen, RNA virus. Uvrščen je v družino *Arteriviridae*, ki skupaj z družino *Coronaviridae* tvorijo red *Nidovirales*. Obstajata dva genotipa, severno ameriški (NA, 15.4 kb) in evropski (EU, 15.1 kb) (Bautista in sod., 2002). PRRSV ima ovojnico, v premeru meri od 50-65 nm, nukleokapsidna sredica pa od 25–35 nm (Zimmerman in sod., 2006; Benfield in sod., 1992).

PRRSV primarno raste na prašičjih alveolarnih makrofagih in makrofagih nekaterih drugih tkiv. Sur in sod. (1997) so ugotovili, da se razmnožuje tudi v zarodnih testikularnih celicah okuženega merjasca. In vitro, PRRSV raste na primarnih kulturah prašičjih alveolarnih makrofagov, kot tudi na celicah ledvic MA-104 afriške zelene opice in njihovih derivatih (Benfield in sod., 1992) ter na podganji celični liniji ATCC PTA-3930 (Zimmerman in sod., 2006).

Sevi ali izolati PRRSV se razlikujejo v virulenci in so biološko, antigensko in genetsko heterogeni (Meng, 2000). Dokazali so, da so lahko genetsko različni sevi PRRSV istočasno prisotni na eni fermi (Dee in sod., 2001b). S pomočjo sekveniranja so dokazali tudi prisotnost EU sevov v ZDA in obratno (Ropp in sod., 2004). Skrb vzbuja možnost rekombinacije med NA sevi in EU sevi PRRSV, ki se sočasno nahajajo v isti regiji. Van Vugt in sod. (2001) so

ugotovili, da je in vitro (na celičnih kulturah) RNA rekombinacija bolj verjetna med dvema NA sevoma ali med dvema EU sevoma PRRSV kot med NA in EU sevoma.

2.6.2. Epidemiologija

Retrospektivne serološke raziskave so pokazale, da je PRRSV prisoten v Kanadi od leta 1979, v ZDA od leta 1985 in v Nemčiji od leta 1987. Nekatere države so še vedno proste PRRS: Švedska, Norveška, Finska, Nova Zelandija, Avstralija (Zimmerman in sod., 2006), Švica (Corbellini in sod., 2006), Čile (directors of Chilean pig producers' association Asprocer, 2007).

Na okužbo s PRRSV so dovzetni tudi divji prašiči, vendar so okužbe redkejše (Albina, 1997; Ruiz-Fons in sod., 2006). Ni znano, ali so za PRRSV dovzetne tudi druge vrste živali (Zimmerman in sod., 2006).

Okužene živali izločajo virus s slino, nosnim izcedkom, urinom, semenom in fecesom (Done in sod., 1996; Albina, 1997). Mleko lahko vsebuje virus še 1 do 2 dni po okužbi (Taylor, 2006d). Virus so v serumu dokazali do 210 dni, v semenu do 92 dni, v slini do 42 dni, v fecesu do 38 dni in v urinu do 28 dni po eksperimentalni okužbi (Bierk in sod., 2001).

Prašiči se s PRRSV lahko okužijo intranazalno, intramuskularno, oralno, intrauterino in vaginalno. Prašiči se lahko okužijo parenteralno; ob ščipanju ušes, rezanju repkov, ščipanju zobkov, tetoviranju in aplikaciji zdravil in vakcin. Ker je PRRSV prisoten tudi v slini, se lahko prenaša ob ugrizu, odrgninah in praskah, ki nastanejo med agresivnim obnašanjem živali (Zimmerman in sod., 2006).

Možen je tudi indirektni prenos virusa: z opremo, orodjem, obleko, vodo, hrano, živimi prenašalci (vektorji) ali aerosolom. Otake in sod. (2002a) so dokazali, da je bil PRRSV kar 60 minut prisoten na oblekah, obutvi in rokah delavcev, ki so prišli v stik z akutno obolelimi živalmi.

Mehanično lahko PRRSV prenašajo tudi komarji (*Aedes vexans*) in domača muha (*Musca domestica*) (Taylor, 2006d).

Prenos virusa na dolge razdalje poskušajo razlagati s širjenjem virusa po zraku, kar pa je eksperimentalno težko dokazati. Otake in sod. (2002b) so dokazali prenos PRRSV le na kratke razdalje (2,5 m). Prenosa PRRSV niso dokazali na razdaljah 15 in 30 m (Zimmerman

in sod., 2006). Prenos virusa po zraku je učinkovitejši pozimi, pri nižjih temperaturah, visoki vlažnosti (Albina, 1997).

Raziskave so pokazale, da je riziko vnosa PRRSV v čredo manjši na področju z manjšo gostoto prašičev (Albina, 1997).

Dokazali so, da se lahko PRRSV pri svinjah z viremijo transplacentarno prenese na fetuse. Povzroči lahko smrt fetusov ali rojstvo okuženih pujskov, ki so lahko slabotni ali normalni. Nekateri pujski v leglu se lahko okužbi s PRRSV tudi izognejo (Zimmerman in sod., 2006). PRRSV virus uspešno prehaja skozi placento šele v zadnji tretjini brejosti (Christianson in sod., 1993).

PRRSV povzroči kronično, perzistentno okužbo pri prašičih. Virus se v dovzetnih celicah živali, ki ne kažejo kliničnih znamenj, razmnožuje nekaj mesecev (Zimmerman in sod., 2006). Po naravni ali eksperimentalni okužbi se PRRSV pri odstavljenih lahko izolira iz seruma 4 do 7 tednov (Van Alstine in sod., 1993).

PRRSV je večinoma prisoten endemično zaradi klicenoscev ali zaradi stalnega dotoka novih živali (porodi, nakupi, izguba pridobljene imunosti). V čredi se ohranja zaradi prenosa virusa iz svinje na pujske, transplacentarno ali po porodu, ali z združevanjem dovzetnih in okuženih prašičev npr. pri odstavitvi (Zimmerman in sod., 2006; Done in sod., 1996). S pomočjo seroloških metod so ugotovili, da je širjenje virusa med odstavljenici hitro in se pogosto zaključi v 1 do 2 tednov, protitelesa proti PRRSV pa dosežejo svoj vrh med 6. in 12. tednom starosti (Taylor, 2006d).

PRRSV je stabilen v območju od 4 °C do -70 °C (Benfield in sod., 1992). Mesece in leta je stabilen pri -70 °C in -20 °C (Zimmerman in sod., 2006). PRRSV je občutljiv na lipidna topila (kloroform in eter); popolnoma se inaktivira v 45 minutah pri 56 °C (Van Alstine in sod., 1993) in v 48 urah pri 37 °C (Benfield in sod., 1992). Infektivnost izgubi virus pri pH pod 6 in nad 7,5 (Van Alstine in sod., 1993; Benfield in sod., 1992).

PRRSV je v okolju relativno labilen in predvsem občutljiv na izsušitev (Zimmerman in sod., 2006).

2.6.3. Patogeneza

Virus se po vstopu v organizem sprva razmnožuje v lokalnih makrofagih, nato pa se hitro razširi v limfoidne organe, pljuča, redkeje v druga tkiva. Virulentni sevi PRRSV lahko

povzročijo viremijo že po 12 urah, pogosteje pa v 24 urah po inokulaciji virusa (Zimmerman in sod., 2006; Taylor, 2006d). Titri virusa rastejo hitro in v serumu, bezgavkah in pljučih dosežejo vrh po 7 do 14 dneh. Najvišji titri virusa so v pljučih (Zimmerman in sod., 2006).

Duan in sod. (1998) so dokazali, da se PRRSV veže na 210 kDa membranski protein in vstopa v celico z endocitozo.

Pojav kliničnih znamenj in patoloških sprememb sovpada s časom, ko virus doseže najvišje titre v pljučih in bezgavkah (Zimmerman in sod., 2006). Nato začnejo titri virusa v serumu hitro padati. Virusi iz krvnega obtoka izginejo 28 dni po inokulaciji, čeprav so virusno RNA v serumu z RT-PCR zaznali do 251 dni po inokulaciji (Duan in sod., 1997). Rowland in sod. (2003) so ugotovili, da je lahko viremija pri kongenitalno okuženih prašičih daljša. Virus so izolirali še 48 dni po rojstvu, vzorci serumov pa so bili z RT-PCR pozitivni med 78. in 228. dnevom po rojstvu.

Po viremiji PRRSV dolgo časa vztraja v tonzilah in/ali bezgavkah, zlasti ingvinalnih in sternalnih (Willis in sod., 1997; Zimmerman in sod., 2006). Rowland in sod. (2003) so virus iz tonzil izolirali do 132 dni po rojstvu; Willis in sod. (1997) pa do 157 dni po eksperimentalni okužbi.

2.6.4. Klinična znamenja

Opis kliničnih znamenj kot posledica okužbe s PRRSV je podoben v Severni Ameriki in Evropi (Zimmerman in sod., 2006).

Posledice okužbe s PRRSV so v čredi prašičev lahko pogubne, ali pa je bolezen asimptomatska. Tudi klinična znamenja se od primera do primera razlikujejo oziroma so zamaskirana zaradi sekundarnih okužb. Klinična znamenja so odvisna od seva virusa, imunskega stanja gostitelja, dovzetnosti gostitelja, izpostavljenosti sekundarnim okužbam, izpostavljenosti lipopolisaharidom (LPS) in od vodenja reje (Zimmerman in sod., 2006; Done in sod., 1996).

Sevi PRRSV se med seboj razlikujejo genetsko in antigensko in v pogledu kliničnih znamenj in patoloških sprememb. Manj virulentni virusi lahko v čredi povzročijo subklinično okužbo, visoko virulentni izolati pa hudo klinično okužbo. Pri visoko virulentnih sevih je signifikantno več virusnega antigena v pljučih in limfoidnem tkivu, višji so titri virusa ob viremiji in celice izločajo več IFN-gama (Halbur in sod., 1996; Zimmerman in sod., 2006).

Sekundarne virusne in bakterijske okužbe lahko skupaj s PRRSV povzročijo resnejši potek bolezni. Brockmeier in sod. (2002) so ugotovili, da *B. bronchiseptica* in PRRSV olajšata kolonizacijo zgornjega respiratornega trakta s *H. parasuis*. Feng in sod. (2001) so ugotovili, da so pujski zaradi intrauterine okužbe s PRRSV bolj občutljivi na okužbe s *S. suis* tip II. Allan in sod. (2000) so dokazali, da PRRSV potencira razmnoževanje in razporeditev PCV2, kar ima za posledico resnejšo PRRS virusno pljučnico in resnejše patoanatomske spremembe pri PMWS. Resnejše obolenje nastane tudi pri sočasni okužbi PRRSV z *M. hyopneumoniae*, PRCV, virusom PI in z virusom bolezni Aujeszkega (Zimmerman in sod., 2006; Shibata in sod., 2003; Thacker in sod., 1999).

Epidemična okužba

Epidemija se pojavi, ko se PRRSV prvič vnese v čredo in so prizadete vse kategorije prašičev (Zimmerman in sod., 2006).

Prva faza traja 2 ali več tednov in je posledica akutne viremije. Zanja značilna klinična znamenja so neješčnost, letargija, povišana telesna temperatura (39-41 °C), agalaksija, hiperpneja, dispneja ter včasih cianoza na ekstremitetah ali prehodna hiperemija kože (Zimmerman in sod., 2006; Done in sod., 1996; Taylor, 2006d).

Epidemija se hitro širi in v 3–7 dneh in prizadane vse kategorije prašičev.

Druga faza se lahko začne še preden se konča prva in se nadaljuje 1–4 mesece. Zanja so značilne predvsem reprodukcijske motnje in visoka predodstavitvena smrtnost (Zimmerman in sod., 2006; Done in sod., 1996).

Svinje

Med akutno fazo bolezni prihaja do abortusov med 22. in 109. dnem brejosti (Done in sod., 1996). Pri nekaterih akutno obolelih svinjah se pojavi tudi agalaksija, inkoordinacija in/ali pojav drugih endemičnih bolezni (npr. garje, atrofični rinitis, cistitis/pielonefritis). Smrtnost pri svinjah je 1–4 %, kot posledica pljučnega edema in cistitis/pielonefritisa (Zimmerman in sod., 2006).

Med akutno fazo bolezni niso vse svinje klinično bolne. Na 100.–118. dan brejosti prasi 5 %–80 % svinj. Gnezda teh svinj so lahko normalna, lahko pa so prisotni slabotni, različno veliki

pujski, mrtvorojeni pujski, avtolitični delno mumificirani ali popolnoma mumificirani fetusi (Zimmerman in sod., 2006; Lager in sod., 1996; Done in sod., 1996; Collins in sod., 1992).

Pri svinjah so opisani primeri kasnejših vrnitev v estrus oiroma trajni anestrus (Done in sod., 1996).

Merjasci

Med akutno fazo bolezni so merjasci neješči, letargični, oteženo dihajo, libido je zmanjšan, slabša pa je tudi kvaliteta semena (Done in sod., 1996; Swenson in sod., 1994). Spremembe v spermi se pojavijo 2 do 10 tednov po okužbi, ni pa jasno, ali je prizadeta tudi stopnja koncepcije (Zimmerman in sod., 2006; Lager in sod., 1996; Swenson in sod., 1994). Pomembno je zlasti širjenje PRRSV s semenom in s tem spolni prenos bolezni, saj so PRRSV v semenu merjascev ugotovili še 43 dni po eksperimentalni okužbi (Swenson in sod., 1994).

Sesni pujski

Pri pujskih se najpogosteje pojavljajo sledeča klinična znamenja: apatičnost, hujšanje, razkrečenost okončin, hiperpneja, dispneja in hemoza, manj pogosto pa tremor, anemija in trombocitopenija, krvavitve iz popka, povečano število bakterijskih poliartritisov, meningitisov in driska (Zimmerman in sod., 2006; Rowland in sod., 2003; Rossow in sod., 1994).

Odstavljenci in pitanci

Najpogostejša klinična znamenja, ki se pojavljajo pri akutni obliki so neješčnost, letargija, hiperemija kože in/ali dispneja brez kašlja, nasršene ščetine, manjši prirasti; smrtnost se dvigne za 12–20 % (Zimmerman in sod., 2006; Collins in sod., 1992; White, 1992).

Endemična oblika

Endemična oblika se pojavi, ko je v čredi prisotna homologna imunost na infektivni sev PRRSV (Zimmerman in sod., 2006). Pri tej obliki so klinična znamenja običajno pojavijo pri odstavljenih-pitancih, ko ni več kolostralne imunosti in/ali pri nadomestnih mladica ter svinjah ali merjascih, ki so se prej izognili okužbi (Dee in sod., 1996).

Sevi PRRSV so antigensko zelo različni, in če v čredo vstopi nesoroden sev PRRSV, lahko povzroči epidemijo v endemično okuženi čredi.

Pri mladica se lahko pojavijo posamezni abortusi, neredne vrnitve v estrus, nebreje mladice in različna velikost pujskov v gnezdu, kar je sicer značilno pri PRRS (Zimmerman in sod., 2006).

2.6.5. Patoanatomske in patohistološke spremembe

Večina raziskav v povezavi s PRRSV je bila opravljenih pri sesnih in odstavljenih pujskih med 1. in 70. dnevom starosti (Zimmerman in sod., 2006; Rossow in sod., 1994).

Pogosto se pojavlja intersticijska pljučnica in povečane bezgavke, vendar se te spremembe lahko pojavljajo tudi pri drugih virusnih in bakterijskih obolenjih (Šabec, 2002; Done in sod., 1996; Rossow in sod., 1994; Taylor, 2006d).

Patološke in patohistološke spremembe se pojavijo med 4. in 28. dnem po inokulaciji virusa in sicer v pljučih in bezgavkah, kjer poteka razmnoževanje virusa. Med 7. in 14. dnem po inokulaciji se lahko pojavijo spremembe na ledvicah, možganih, srcu, maternici in testisih (Rossow in sod., 1994; Taylor, 2006; Zimmerman in sod., 2006).

Pljuča so polnokrvna (Taylor, 2006d). Blage spremembe so pogoste na kranialnih režnjih, lahko pa so difuzne. Prizadeti parenhim je prožen, trden, lisasto sive barve in vlažen. Hujše spremembe so difuzno razporejene, parenhim je lisast ali difuzno rdečkasto obarvan, elastičen in čvrst, ter zelo vlažen (Zimmerman in sod., 2006). Collins in sod. (1992) so pri odstavljenih in slabotnih pujskih našli subakutni mononuklearni encefalitis in perivaskulitis.

Okoli žil so se kopičili makrofagi, limfociti in plazmociti. Pri intersticijski pljučnici so bile alveolarne septe odebeljene in prežete z makrofagi in nekaj limfociti.

Alveoli lahko vsebujejo nekrotične makrofage, ostanke celic in serozno tekočino.

Številne bezgavke so pri večini prašičev povečane od 2 do 10-krat. Najprej so edematozne in zmerno čvrste, kasneje pa postanejo čvrste in bele barve. Mikroskopske spremembe so predvsem v germinalnih centrih, ki so lahko nekrotični in povečani (Zimmerman in sod., 2006; Šabec, 2002).

Lahko se razvije tudi perivaskularni miokarditis, na ledvicah se občasno pojavijo blagi periglomerularni in peritubularni limfohistiocitni agregati (Rossow in sod., 1994; Taylor, 2006d).

Pri brejih svinjah se pojavlja edem miometrija in/ali endometrija in limfohistiocitni vaskulitis (Zimmerman in sod., 2006).

2.6.6. Vpliv PRRSV na gostiteljev imunski sistem

Humoralni imunski odgovor

Specifična IgM protitelesa proti PRRSV se v serumu pojavijo 5. do 7. dan po inokulaciji in po 2 do 3 tednih padejo pod mejo zaznavnosti. Titer IgG protiteles se v serumu pojavi med 7. in 10. dnevom po inokulaciji, doseže vrh med 2. in 4. tednom in vztraja nekaj mesecev in do 300. dneva po inokulaciji počasi pade. Protitelesa proti PRRSV so lahko prisotna v krvi prašiča celo njegovo življenje (Murtaugh in sod., 2002).

IgA protitelesa proti PRRSV so v serumu zaznavna 14. dan po inokulaciji, dosežejo maksimum 25. dan po inokulaciji, in so zaznavna do 35. dne po inokulaciji (Labarque in sod., 2000).

Imunoglobulini v serumu proti PRRSV so primarno usmerjeni proti N in M proteinu PRRSV. Protitelesa proti N proteinu so v serumu zaznavna v prvih 7 dneh po okužbi, protitelesa proti M proteinu pa se pojavijo v serumu proti koncu 2. tedna po inokulaciji (Murtaugh in sod., 2002).

Epitopi za nevtralizacijska protitelesa so bili ugotovljeni pri glikoproteinih GP4 in GP5 (López Fuertes in sod., 1999). Nevtralizacijska protitelesa se v serumu pojavijo okoli 3. tedna po okužbi (Murtaugh in sod., 2002). V serumu se nahajajo dolgo časa, vendar v nizkih titrih (Labarque in sod., 2000).

Ker se viremija lahko pojavi kljub prisotnosti nevtralizacijskih protiteles, njihov titer očitno ni zadosten za preprečevanje razmnoževanja PRRSV. Nevtralizacijska protitelesa imajo verjetno sekundarno vlogo pri pridobljeni imunosti na okužbo s PRRSV (Zimmerman in sod., 2006).

Protitelesa nastanejo tudi proti nestrukturnemu proteinu nsp, zlasti nsp2 polipeptidu (Oleksiewicz in sod., 2001). Protitelesa se pojavijo 1 do 4 tedne po okužbi in jih najdemo v semenu merjascev. Njihova prisotnost je v korelaciji s trajanjem izločanja PRRSV s semenom (Murtaugh in sod., 2002).

Zaščitna imunost

Prašiči, okuženi ali vakcinirani z živim PRRSV, so pri ponovni okužbi s homolognim PRRSV zaščiteni pred reprodukcijskimi motnjami, ki jih povzroča virus (Lager in sod., 1997).

Ugotavljajo, da je pri ponovni okužbi imunih prašičev s heterolognimi sevi PRRSV možna tudi delna do visoka zaščita (Zimmerman in sod., 2006).

Za učinkovite so se izkazale tudi atenuirane žive vakcine, ki zmanjšujejo resnost bolezni, trajanje viremije, izločanje virusa in pogostost heterolognih okužb s PRRSV (Mengeling in sod., 2003).

Kolostralna imunost

Svinje, ki so imune, prenesejo kolostralno zaščito na pujske. Protitelesa proti PRRSV so prisotna v enaki koncentraciji tako v kolostrumu kot v krvi. Okužba s PRRSV narašča, ko nivo kolostralnih protiteles pada (Chung in sod., 1997).

V raziskavah komercialnih čred v Kanadi so ugotovili, da je imelo 12–44 % prašičev kolostralna protitelesa do 3. tedna, 2–16 % pa do 5. tedna starosti (Zimmerman in sod., 2006).

Pri svinjah predhodna imunost ne prepreči transplacentarne okužbe zarodkov (Zimmerman in sod., 2006).

2.6.7. Diagnostika

Diagnoza PRRS temelji na objektivnih (epidemiološka slika, klinična znamenja, patoanatomske in patohistološke spremembe) in subjektivnih (dokaz virusa, serologija) informacijah (Zimmerman in sod., 2006).

Vzorci za izolacijo virusa ali dokaz virusne RNA morajo biti ohlajeni na 4 °C in v 2 dneh dostavljeni v laboratorij.

PRRSV pri mlajših živalih v primerjavi s starejšimi, dokazujemo dlje časa in v večjih količinah. Virus se, v primerjavi s serumom in pljuči, dlje časa nahaja v tonzilah in bezgavkah (Zimmerman in sod., 2006). Viremija lahko pri sesnih pujskih, odstavljenih in pitancih vztraja 28 do 42 dni po inokulaciji virusa, pri svinjah in merjascih pa 7 do 14 dni (Mengeling in sod., 1996). Virus in virusno RNA lahko dokažemo v pljučnem izpirku, tonzilah in bezgavkah še nekaj tednov po prenehanju viremije (Zimmerman in sod., 2006).

Izolacija virusa

Za izolacijo virusa se uporabljajo prašičji alveolarni makrofagi kot tudi celice ledvic MA-104 afriške zelene opice in njihove podvrste (CL-2621, MARC-145) (Benfield in sod., 1992).

Ker se vsi sevi PRRSV ne razmnožujejo na vseh tipih celic, je priporočljiva hkratna uporaba vsaj dveh tipov. Za uspešno izolacijo evropskih sevov PRRSV so potrebni prašičji alveolarni makrofagi (Christopher-Hennings, 2002).

Za izolacijo virusa se lahko uporablja vzorce seruma, pljuč, bezgavk in tonzil, ki se jih odvzame med 4. in 28. dnem po inokulaciji. Mumificirani fetusi in mrtvorojeni pujski niso primerni zaradi avtolize tkiva. Pri kronični okužbi so tonzile, orofaringealni ostružki in bezgavke primernejši vzorci za izolacijo virusa kot serum ali pljuča (Zimmerman in sod., 2006).

Biološki poskus

Za dokaz PRRSV lahko opravimo tudi biološki poskus na prašičih. Homogenizirane vzorce, za katere sumimo, da vsebujejo PRRSV, apliciramo pujskom. Prisotnost PRRSV v vzorcu potrdimo z dokazom protiteles ali virusa v poskusnih prašičih (Horter in sod., 2002; Dee in sod., 2001b).

Dokaz virusnega antigena

Za dokaz virusnega antigena se uporablja IHC na tkivih fiksiranih s formalinom (Van Alstine in sod., 2002) in test IF na zamrznjenih tkivnih rezinah (Benfield in sod., 1992). Najprimernejši vzorci za IHC so pljuča, srce, ledvice, bezgavke, vranica, timus in tonzile, medtem ko so za IF najprimernejša pljuča. IHC test je zelo specifičen (skoraj 100 %), občutljivost pa se giblje med 40 in 95 % (Van Alstine in sod., 2002). Test IF je hitrejši in bolj ekonomičen, vendar so zanj potrebni sveži vzorci. Pozitivni vzorci v IHC in testu IF se običajno potrdijo še z izolacijo virusa ali metodo PCR. Virusne antigene je najlažje dokazati med 4. in 7. dnem po inokulaciji (Zimmerman in sod., 2006).

Dokaz virusne nukleinske kisline

RT-PCR se uporablja za dokaz PRRSV genoma v homogeniziranih prašičjih tkivih in/ali kliničnih vzorcih, kot je seme, serum, orofaringealni ostružki in pljučni izpirek (Christopher-Hennings, 2002). Virusno RNA lahko dokažemo z RT-PCR ali vgnezenim RT-PCR, pri

čemer lahko zaznamo že 1 do 10 delcev na mililiter (Taylor, 2006d). Ta metoda je visoko občutljiva in specifična (Horter in sod., 2002). Virusno RNA lahko dokažemo pri akutno in kronično okuženih prašičih ter pri avtoliziranih fetusih in/ali vzorcih, kot sta seme in feces, ki sta toksična za celične kulture (Zimmerman in sod., 2006). Rezultati RT-PCR so na voljo v 1 do 3 dni po prejemu vzorcev (Christopher-Hennings, 2002).

ORF6 in ORF7 sta področji genoma z najbolj ohranjenim nukleotidnim zaporedjem med različnimi sevi PRRSV, zato sta najbolj pogosta gena, ki se ju dokazuje. V primeru, da nas zanimajo evolucijske spremembe virusa v čredi, je najprimernejši gen ORF5, pri čemer uporabimo sekvenčno analizo (Zimmerman in sod., 2006; Christopher-Hennings, 2002).

Za metodo RT-PCR so pri akutnem poteku primerni vzorci seruma, pljuč, bezgavk in tonzil (Zimmerman in sod., 2006).

Sekvenčna analiza

Za sekveniranje se najpogosteje uporabljata ORF5 in ORF6. Na voljo je baza podatkov za primerjavo sekvenc. ORF6 je najbolj ohranjen segment in služi kot kontrola (Zimmerman in sod., 2006; Christopher-Hennings, 2002).

Serološke metode

Testi za dokaz serumskih protiteles proti PRRSV so: test ELISA, indirektna imunofluorescenca (IIF), serumnevtralizacijski test (SNT) in IPMA (Zimmerman in sod., 2006; Christopher-Hennings, 2002).

S serološkimi testi ne moremo ločiti okuženih od vakciniranih čred (Zimmerman in sod., 2006).

Test IIF zazna IgM in IgG protitelesa že med 5. in 14. dnem po inokulaciji. IgM protitelesa so prisotna 21 do 28 dni po inokulaciji, medtem ko IgG dosežejo vrh med 30. in 50. dnem po inokulaciji (Joo in sod., 1997).

Komercialni test ELISA (HerdChek * PRRS X3, IDEXX Laboratories) je zlati standard za dokaz protiteles proti PRRSV. Test je občutljiv, specifičen, standardiziran in hiter (Zimmerman in sod., 2006).

Lažno pozitivne reakcije v testu ELISA se pojavljajo med 0,5 in 2 %. Pri lažno pozitivnih rezultatih lahko kot potrditveni test uporabimo test IIF ali test bloking ELISA (Zimmerman in sod., 2006).

SNT je manj občutljiv kot test IIF in test ELISA. Uporablja se v raziskovalne namene (Benfield in sod., 1992).

Pri črednem monitoringu se uporabljata testa ELISA in PCR, kot potrditveni testi pa PCR, IIF in bloking ELISA, s katerimi potrdimo sumljive pozitivne rezultate v čredah, za katere pričakujemo, da so proste PRRSV (Zimmerman in sod., 2006).

2.6.8. Preventiva in ukrepi

Preventiva

Preventivni programi temeljijo na preprečitvi vnosa PRRSV v negativno čredo ali preprečitvi vnosa novih sevov PRRSV v okuženo čredo (Dee in sod., 2001b).

V ZDA so ugotovili, da so v več kot 80 % vzroki za novo okužbo v komercialnih rejah prašičev sledeči: transport prašičev, prenos virusa po zraku iz sosednjih farm ali vnos virusa s pomočjo insektov (Zimmerman in sod., 2006).

Ker PRRSV dlje preživi v mrzlem in vlažnem vremenu, je potrebno vso opremo in material, ki se uporablja na farmi ali za transport prašičev, temeljito očistiti in osušiti (Otake in sod., 2002). Na farmo je potrebno preprečiti vstop glodavcem, insektom in ptičem (Zimmerman in sod., 2006).

S karanteno in serološkim testiranjem novih plemenskih živali lahko preprečimo vnos PRRSV v negativno čredo (Done in sod., 1996). Vse nove plemenske živali je priporočljivo izolirati za najmanj 30 dni in opraviti serološke preiskave pred vnosom v čredo. Seme za umetno osemenjevanje mora izvirati od merjascev negativnih na PRRSV. Priporočljivo je, da se serum ali seme merjascev testirata z metodo PCR, da se odkrijejo tudi na novo okužene živali (Zimmerman in sod., 2006; Done in sod., 1996).

Ukrepi

Specifičnega zdravljenja pri PRRS ni (Taylor, 2006d).

Prvi korak, da se prekine kroženje virusa v plemenski čredi, je vnos nadomestnih živali, ki so bile pred vstopom v čredo izpostavljene PRRSV in so že razvile imunost ter niso več viremične. Na ta način se stabilizirajo klinična znamenja, izboljšajo parametri proizvodnje in število odstavljenec negativnih na PRRSV narašča (Zimmerman in sod., 2006; Torremorell in sod., 2002).

Serološko negativne mladice je potrebno vnesti v pozitivno čredo prej kot normalno (pri 3-4 mesecih starosti), da razvijejo imunost (Done in sod., 1996).

V nekaterih sistemih uporabljajo odstavljenec in izločene svinje kot donorje okuženega materiala. Čez čas postane plemenska čreda imuna in prenos virusa znotraj plemenske črede se prekine. V takem primeru mladice niso izpostavljene PRRSV ob združevanju z odstavljeneci (Zimmerman in sod., 2006).

Negativne nadomestne živali se lahko izpostavi PRRSV na različne načine: uporabi se lahko tkivo slabotnih pujskov ali mrtvorojencev, modificirane žive ali mrtve vakcine ali se jim inokulira serum viremičnih prašičev iz iste farme (Batista in sod., 2002).

Z uporabo vakcinacije se eliminirajo naivne (negativne) subpopulacije in nadzira širjenje virusa znotraj okužene črede (Dee in Philips, 1998). Glavna omejitev vakcin je omejena navzkrižna zaščita med sevi PRRSV. Pri uporabi modificiranih živih vakcin je potrebno naenkrat vakcinirati celotno populacijo prašičev na določenem področju. Mrtve vakcine se lahko uporabijo za aklimatizacijo mladic kot dopolnilo pri uporabi modificiranih živih vakcin ali po izpostavitvi divjemu virusu (Zimmerman in sod., 2006).

2.6.9. Eradikacija

Freese in Joo (1994) sta poročala o spontani eliminaciji PRRSV iz črede, kar pa je redkost.

Totalna depopulacija in repopulacija

Je zelo uspešna tehnika, vendar draga. Primerna je takrat, kadar želimo eradicirati še druge bolezni in v čredah, kjer redijo vse kategorije prašičev, od plemenskih živali do pitancev (Zimmerman in sod., 2006).

Delna depopulacija

Dee in sod. (1997) so izvajali delno depopulacijo odstavljenec, ki so jih po odstavitvi prestavili na ločeno lokacijo, vzrejališče pa pustili prazno 14 dni. Na ta način se prekine

prenos virusa iz odstavljenec v plemensko čredo. Rezultati delne depopulacije so pokazali signifikantno izboljšanje pri dnevni prirasti in manjšo smrtnost.

Ta tehnika je primerna, kadar želimo eradicirati virus, ko je širjenje virusa pri plemenski čredi prenehalo. Na ta način lahko eradiciramo virus iz majhnih čred (manj kot 500 svinj) (Zimmerman in sod., 2006; Taylor, 2006d).

Zgodnje odstavljanje

Zgodnje odstavljanje se uporablja, kadar želimo dobiti negativne pujske na PRRSV iz okuženih svinj. Pujske se odstavi pri 5 do 7 dneh starosti in se jih preseli na ločeno, izolirano lokacijo, oddaljeno vsaj 35 km od farme. Pujske se zdravi z antibiotiki 2 dni pred in 7 dni po odstavitvi (Torremorell in sod., 2002).

Zaprtje črede

Zaprtje črede temelji na dejstvu, da PRRSV ne more vztrajati v imuni populaciji. Priporoča se zaprtje plemenske črede za 6 mesecev. Vnos novih, negativnih živali je možen, ko so imune vse plemenske živali in v čredi ni več klicenoscev. Na ta način se čez čas dobi negativno populacijo plemenske črede (Zimmerman in sod., 2006; Taylor, 2006d).

Testiranje in izločitev živali

Testira se celotno plemensko čredo, tako na antigen kot na protitelesa, in se odstrani pozitivne živali iz črede. Ta način lahko uporabimo pri čredah s proizvodnjo živali na različnih lokacijah, v kolikor že 12 mesecev ni bilo kliničnih primerov PRRS in če je ocenjena seroprevalenca pod 25 % (Dee, 2004).

2.7. *Mycoplasma hyopneumoniae*

Enzootsko pnevmonijo (EP) pri prašičih povzroča *M. hyopneumoniae*, ki ima pomembno vlogo tudi pri PRDC. *M. hyopneumoniae* so izolirali leta 1965 in od takrat EP velja za najbolj razširjeno respiratorno bolezen pri prašičih. Ekonomske izgube zaradi EP so predvsem posledica zmanjšanih dnevni prirastov, povišane smrtnosti, zmanjšane konverzije krme in večjih stroškov zdravljenja (Thacker, 2006). V 24 različnih raziskavah so ugotovili, da se dnevni prirast zmanjša od 2,8 % do 44,1 % (Rautiainen in sod., 2000).

2.7.1. Etiologija

Mikoplazme so najmanjši izmed prokariontov, so brez celične stene, imajo majhen genom (580 do 1,380 kb) in malo gvanina in citozina (Razin in sod., 1998; Thacker, 2004; Gundersen in sod., 1994). Pomanjkanje celične stene loči mikoplazme od drugih bakterij in jih uvršča v razred *Mollicutes* (lat.: *mollis*-mehak, gladek, nežen; *cutis* – koža) (Razin in sod., 1998).

M. hyopneumoniae je uvrščena v Red I: *Mycoplasmatales*

Družina I: *Mycoplasmataceae*

Rod I: *Mycoplasma*.

Gojitev in identifikacija *M. hyopneumoniae* sta zamudni in zapleteni, pogosto pa tudi neuspešni. Pogosta je tudi kontaminacija z drugimi bakterijami ali mikoplazmami, zlasti z *Mycoplasma hyorhinis*. *M. hyopneumoniae* v tekočem gojišču raste počasi, povzroča motnost in po 3 do 30 dnevih spremembo pH ter s tem tudi barve. Po predhodni pasaži v tekočem gojišču, kulture inokuliramo na trdno gojišče in jih inkubiramo pri 5–10 % CO₂. Po 2-3 dnevni inkubaciji so kolonije komaj vidne (Thacker, 2004; Thacker, 2006).

Artiushin in Minion (1996) sta v svoji raziskavi na temelju PCR z naključnimi začetnimi oligonukleotidi (angl.: arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR) dokazala, da med izolati *M. hyopneumoniae* iz različnih rej obstaja genetska raznovrstnost. Vicca in sod. (2003) pa so v raziskavi dokazali, da obstajajo razlike v virulenci med posameznimi sevi, izoliranimi iz različnih čred prašičev.

2.7.2. Epidemiologija

M. hyopneumoniae se v okuženi čredi lahko prenaša vertikalno in horizontalno (Fano in sod., 2005). Najpogosteje se prenaša z okuženih svinj na novorojene pujske (Calsamiglia in Pijoan, 2000). V času odstavitve in pitanja se ob združevanju vrstnikov širi z neposrednim stikom med okuženimi in neokuženimi prašiči (Fano in sod., 2005). Pri tunelskem sistemu reje se *M. hyopneumoniae* in ostali povzročitelji respiratornih obolenj prenašajo predvsem v času odstavitve (Thacker, 2006). Raziskave so pokazale, da na prenos in širjenje EP v čredi vplivajo številni dejavniki: tehnologija reja, ventilacija, gostota živali, klimatske razmere, proizvodnja na eni ali večih lokacijah.

Incidenca EP se med državami razlikuje. V ZDA so Choi in sod. (2003) v letih 2000-2001 diagnosticirali 2872 pljučnic, od tega so v 27 % s pomočjo nPCR diagnosticirali *M. hyopneumoniae*. Raziskave narejene v drugih državah, so pokazale, da ima EP 38 % do 100 % čred. Natančno prevalenco, na podlagi pljučnic, je težko določiti zaradi sočasnih okužb z drugimi povzročitelji (Thacker, 2006).

V Sloveniji je bilo v letih 1996 do 1999 na protitelesa proti *M. hyopneumoniae* preiskanih 1500 serumov plemenskih svinj z osmih velikih farm. S testom ELISA DAKO in Bommeli so dokazali protitelesa v serumih pri 71 % oziroma 67 % plemenskih svinj (Strajn, 2001).

2.7.3. Patogeneza

Okužba dihal se začne s pritrditvijo *M. hyopneumoniae* na migetalke (cilije) dihalnega epitela (Thacker, 2004; Hsu in Minion, 1998). Pritrjevanje *M. hyopneumoniae* omogoča membranski protein adhezin P97.

Posledica pritrditve *M. hyopneumoniae* na epitelne celice traheje, bronhov in bronhiol, je zlepljanje in degeneracija epitelijskih celic (DeBey in Ross, 1994). S tem je prizadeta primarna naloga mukociliarnega aparata, ki je odgovoren za odstranjevanje sluzi in tujkov. Slabše delovanje mukociliarnega aparata je po vsej verjetnosti eden od poglobitnih vzrokov za pojav sekundarnih okužb z bakterijami, kot so *P. multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *A. pleuropneumoniae*, *Arcanobacterium pyogenes* in druge (Thacker, 2006).

Okužba z *M. hyopneumoniae* povzroča sočasno infiltracijo limfocitov in makrofagov v peribronhialnem in perivaskularnem področju (Thanawongnuwech in sod., 2001). Za to so po vsej verjetnosti odgovorne druge snovi, ki se začno sproščati po pritrditvi in kolonizaciji, ali morebitni toksini, ki jih izloča *M. hyopneumoniae* (Young in sod., 2000). Poškodbo epitelijskih celic povzročajo tudi toksični produkti (npr. vodikov peroksid), ki nastanejo pri metabolizmu *M. hyopneumoniae* (Maes in sod., 2008).

M. hyopneumoniae ima pomembno vlogo pri PRDC. Sekundarne bakterijske okužbe skupaj z *M. hyopneumoniae* povzročajo resnejši potek pljučnice. Marois in sod. (2009) so v svoji raziskavi ugotovili, da so pri sočasni okužbi z *M. hyopneumoniae* in *A. pleuropneumoniae* klinična znamenja izrazitejša in poškodbe pljuč obsežnejše. Najbolj so bili prizadeti prašiči, ki so bili eksperimentalno okuženi z *M. hyopneumoniae* pri 6 tednih starosti in 4 tedne kasneje še z *A. pleuropneumoniae*. Tudi Thacker in sod. (1999) so dokazali, da PRRSV signifikantno poveča resnost in trajanje pljučnice pri sočasni okužbi z *M. hyopneumoniae*. Podobe rezultate

so dobili tudi pri sočasni okužbi *M. hyopneumoniae* z virusom bolezni Aujeszkega (Shibata in sod., 1998). Pri sočasni okužbi z virusom PI pa so opazili le resnejša klinična znamenja (Thacker in sod., 2001).

2.7.4. Klinična znamenja

Poznamo dve obliki EP: redkejšo akutno in pogostejšo kronično obliko. Akutno obliko najpogosteje najdemo v primeru, ko se prašiči prvič srečajo s povzročiteljem. Kronična oblika je značilna za reje, kjer se EP pojavlja enzootsko (Taylor, 2006e). Inkubacijska doba znaša 10 do 14 dni. EP se lahko pojavi že v 2. tednu starosti, praviloma pa se bolezen širi počasi, zato se klinična znamenja pojavijo šele okoli tretjega do šestega meseca starosti (Thacker, 2006).

Pri akutni obliki so lahko prizadeti prašiči vseh starosti. Pojavi se neješčnost, povišana telesna temperatura (40,6 °C do 41,7 °C) in kašelj. Posamezne odrasle živali in do 50 % pujskov lahko pogine, še preden se pojavi kašelj. Pri merjascih opazimo zmanjšan libido, pojavijo pa se lahko tudi druge reprodukcijske težave (Taylor, 2006e).

Za kronično obliko je značilna visoka obolevnost in majhna smrtnost. Začetek bolezni je postopen. Najbolj značilno klinično znamenje je kašelj, ki je suh in neproduktiven (Thacker, 2006) in se pri eksperimentalni okužbi pojavi 7-14 dni po okužbi (Thacker, 2004). Raziskave so pokazale, da kašljanje lahko doseže svoj maksimum 27. dan po okužbi in traja okoli 2 meseca (Sørensen in sod., 1997); oziroma da se kašelj pojavi 2 tedna po okužbi in da doseže vrh 5 tednov po okužbi in nato počasi slabi (Leon in sod., 2001).

Ostala klinična znamenja, kot so povišana telesna temperatura, zmanjšan apetit, oteženo dihanje ali izčrpanost, so povezana s sekundarnimi okužbami (Thacker, 2006).

2.7.5. Patoanatomske in patohistološke spremembe

Patoanatomske spremembe

EP je tipična bronhopnevmonija. Značilne patoanatomske spremembe, ki so čvrste, trdo elastične konzistence, najdemo na kranioventralnih delih pljuč. Običajno so spremembe razširjene obojestransko in zavzemajo kranialne in medialne režnje, akcesorni reženj ter kranioventralne dele kavdalnih režnjev (Taylor, 1996; Taylor, 2006e; Thacker, 2006; Sørensen in sod., 1997). Spremenjena področja na pljučih so pri akutni obliki odebela in temno rdeče barve, pri kronični obliki pa siva in skrčena (Taylor, 1996). Če se ne pojavijo sekundarne okužbe, so spremembe omejene. Pri mešanih okužbah pa so spremembe bolj

razpršene. Rezna ploskev spremenjenih področij je vlažna in mesnate konzistence (Thacker, 2006). V dihalih lahko najdemo kataralni ali kataralno purulentni eksudat. Regionalne bezgavke so povečane in čvrste (Taylor, 1996; Thacker, 2006).

Patohistološke spremembe

Na začetku bolezni najdemo nevtrofilce v dihalnih poteh. Ko bolezen napreduje, sledi infiltracija limfocitov in monocitov v peribronhiolarnem, peribronhialnem in perivaskularnem področju. Pojavi se lahko tudi intersticijska pljučnica. V lumnu alveol je eksudat, v katerem so alveolarni makrofagi in manjše število nevtrofilcev. Alveolarne septe so polnokrvne in infiltrirane z mononuklearnimi levkociti (Taylor, 1996; Thacker, 2006; Calsamiglia in sod., 2000).

Patohistološke spremembe so izrazitejšje v primeru sekundarnih okužb in če so higienske razmere v reji slabe (Thacker, 2006).

2.7.6. Diagnostika

Sum na EP lahko postavimo na podlagi kliničnih znamenj, seroloških reaktorjev ali sprememb na pljučih bodisi ob postmortalnih sekcijah ali v klavnici (Sørensen in sod., 1997; Stärk, 2000).

Najznačilnejši znaki EP v čredi so:

- pojavljanje kroničnih pljučnic, zlasti pri pitancih;
- neenakomeren prirast, zmanjšana konverzija krme, brez poginov živali;
- pojav kliničnih znamenj pri 2 do 4 mesece starih prašičih; suh, neproduktiven kašelj brez visoke telesne temperature in drugih respiratornih težav;
- postmortalne spremembe na pljučih, ki so ostro omejene in se nahajajo na sprednjih pljučnih režnjih.

Za dokončno potrditev diagnoze potrebujemo rezultat laboratorijskih testov (Taylor, 2006e).

Dokaz *M. hyopneumoniae* ali njenega antigena

Izolacija *M. hyopneumoniae* je težavna, predvsem zaradi zahtevne kultivacije, počasne rasti kultur (za rast potrebujejo 6–8 tednov) in pogoste kontaminacije z ostalimi prašičjimi mikoplazmami ali bakterijami. Zaradi tega je izolacija draga, težka in nepraktična metoda (Thacker, 2006).

Za izolacijo lahko uporabimo vzorce pljuč (Taylor, 2006e).

Za dokaz *M. hyopneumoniae* v pljučnem tkivu lahko uporabimo IF ali IHC. Hibridizacija in situ v fiksiranem tkivu se redkeje uporablja. Za IF se uporabljajo zamrznjene rezine pljučnega tkiva (Thacker, 2004).

Bolj natančna metoda za ugotavljanje *M. hyopneumoniae* je PCR. Uporablja se nPCR za dokaz *M. hyopneumoniae* iz bronhialnih brisov (Calsamiglia in sod., 2000), pljučnega tkiva (Holko in sod., 2004), nosnih brisov (Thacker, 2006) in vzorcev zraka (Stärk in sod., 1998). Za večjo občutljivost testa, se pri nPCR uporabljata dva seta začetnih oligonukleotidov (Thacker, 2004). Stakenborg in sod. (2006) so razvili multiplex PCR za ugotavljanje in identifikacijo *M. hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare* in *Mycoplasma hyorhinis* in sočasno razlikovanje vseh treh vrst mikoplazem, ki so lahko prisotne v pljučih prašiča.

Dokaz specifičnih protiteles v serumu

Serološke metode se najpogosteje uporablja na nivoju črede za dokaz protiteles proti *M. hyopneumoniae* (Thacker, 2006). Specifična protitelesa proti *M. hyopneumoniae* se pojavijo 2 do 4 tedne po eksperimentalni okužbi. Vrh dosežejo 11 do 14 tednov po okužbi, po 20 tednih pa jih praviloma ne moremo več zaslediti. Pri naravni okužbi je titer protiteles najvišji pri 12 do 14 tednov starih živalih ali okoli 4 tedne po pojavu kliničnih znamenj (Sørensen in sod., 1997; Stärk in sod., 1998).

Včasih se je za dokaz protiteles proti *M. hyopneumoniae* uporabljal test reakcije vezanja komplementa (RVK). Sčasoma so ugotovili, da je test indirektna ELISA bolj učinkovit (Thacker, 2006).

Trenutno se za ugotavljanje protiteles proti *M. hyopneumoniae* najpogosteje uporabljajo testi ELISA. Pomanjkljivost omenjenih seroloških testov so navzkrižne reakcije z *Mycoplasma flocculare* in *Mycoplasma hyorhinis*, ki zmanjšajo specifičnost testa (Stärk in sod., 1998). V zadnjem času se uporabljajo testi ELISA z monoklonskimi protitelesi, predvsem blokirajoča ELISA. Večina omenjenih testov ima dobro specifičnost, zato je malo lažno pozitivnih rezultatov. Občutljivost teh testov pa je nižja (Thacker, 2006, Sørensen in sod., 1997).

Serokonverzija se običajno pojavi 3 do 5 tednov po okužbi in prašiči ostanejo seropozitivni vsaj 8 mesecev (Kobisch, 2001).

2.7.7. Zdravljenje EP

Okužbe z mikoplazmami je težko popolnoma ozdraviti, vendar lahko z uporabo zdravil zmanjšamo klinična znamenja bolezni (Taylor, 2006e). Mikoplazem ne moremo eliminirati iz respiratornega trakta niti pozdraviti že obstoječih poškodb (Thacker, 2006). Zaradi manjkajoče celične stene se močno skrči število razpoložljivih antibiotikov. Mikoplazme so neobčutljive za beta laktamske antibiotike kot so penicilini, ampicilini, amoksicilini in cefalosporini (Maes in sod., 2008; Thacker, 2006).

Za zdravljenje okužb z mikoplazmami so najbolj učinkoviti tertraciklinski antibiotiki in makrolidi. Klortetraciklini so uspešni pri blaženju kliničnih znamenj EP (Bargen, 2004). Različne raziskave so dokazale tudi učinkovitost tiamulina, tilmikozina in tilozina (Mateusen in sod., 2001; Thacker, 2006).

2.7.8. Ukrepi za preprečevanje EP v reji

Najpomembnejši ukrep za preprečevanje EP je izboljšanje bivalnih pogojev v reji (Maes in sod., 2008; Maes, 2001; Stärk in sod., 1998):

- izvajanje načina »vse noter–vse ven«;
- zaprtje črede; takšne črede imajo bolj stabilno čredno imunost kot črede, kjer se plemenske živali kupuje in tveganje je večji tam, kjer kupujejo več živali oziroma, kjer kupujejo živali iz različnih rej;
- zmanjšanje prenaseljenosti prašičev;
- zmanjšanje velikosti črede;
- izvajanje ukrepov za preprečevanje drugih bolezni;
- izvajanje zoohigienskih ukrepov;
- zmanjšanje števila prvesnic na 30 %;
- cepljenje.

Vakcinacija

Komercialne vakcine proti *M. hyopneumoniae* vsebujejo inaktivirane bakterije ali samo določene membranske proteine (Thacker, 2006). V večini držav se proti *M. hyopneumoniae* cepi več kot 70 % čred. Glavne prednosti vakcinacije so izboljšanje dnevnih prirastov, konverzije krme in zmanjšanje smrtnosti. Skrajša se čas pitanja, manj je kliničnih primerov in stroškov zdravljenja (Maes in sod., 2008; Taylor, 2006e).

Vakcinacija se priporoča v čredah z visoko stopnjo okuženosti. Okužba z *M. hyopneumoniae* se lahko pojavi že pri teden dni starih pujskih, zato se najpogosteje izvaja vakcinacija pujskov. Vakcinacija sesnih pujskov (zgodnja vakcinacija; pri manj kot 4 tednih starosti) se pogosteje izvaja v čredah, kjer poteka proizvodnja prašičev na eni lokaciji. Kasnejša vakcinacija (med 4. in 10. tednom starosti) se izvaja pri proizvodnji prašičev na 3 lokacijah, kjer so pogostejše kasnejše okužbe. Zadnje čase se uporablja enkratna vakcinacija pujskov, ki je v večini primerov enako učinkovita kot dvakratna (Maes in sod., 2008).

Ugotovili so, da visok titer kolostralnih protiteles proti *M. hyopneumoniae* zmanjšuje uspešnost vakcinacije (Thacker, 2006). Tudi sočasna vakcinacija ali okužba živali s PRRSV zmanjša učinek vakcinacije proti *M. hyopneumoniae* (Thacker in sod., 2000).

2.7.9. Eradikacija EP

Histerektomija in izolacija

Pujski, ki jih pridobimo s histerektomijo in živijo v izolaciji, nimajo niti EP niti nekaterih drugih kužnih bolezni. Ta metoda se na običajnih farmah redko uporablja (Taylor, 2006e).

Zakol in ponovna naselitev živali, ki so proste EP

Vse prašiče se odstrani s farme, hleve očisti in razkuži, ter jih pusti prazne približno štiri tedne, nato pa se jih naseli s prašiči, ki niso okuženi z *M. hyopneumoniae* (Taylor, 2006e).

Zgodne odstavljanje z medikacijo

Ta metoda se večinoma uporablja v ZDA. Izoliranim brejim svinjam, apliciramo antibiotike pred prasiatvijo in po njej. Pujske odstavimo peti dan starosti, jih prestavimo v izolirano vzrejališče in zdravimo še 10 dni po odstavitvi (Taylor, 2006e; Maes in sod., 2008).

Izkoreninjanje z delno depopulacijo

Ta način eradikacije so uspešno uporabili v Švici, na Danskem, Švedskem in Finskem (Thacker, 2006). V obdobju 14 dni na farmi ni prasitev, v hlevih pa ostanejo zgolj plemenske svinje in merjasci, starejši od 10 mesecev, ki jim najmanj 14 dni dajemo antibiotike. V tem času očistimo in razkužimo vse hleve; enkrat ali dvakrat na dan se očisti in razkuži bokse v katerih so živali. Hlevi, kjer so bili nastanjeni odstavljenici in pitanci, morajo biti prazni 21 dni (Szancer, 2008; Hege in sod., 2002).

2.8. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

A. pleuropneumoniae je povzročitelj plevropnevmonije pri prašičih (Gottschalk in Taylor, 2006). Najprej so ga poimenovali *Haemophilus pleuropneumoniae*, kasneje pa je bil uvrščen v rod *Actinobacillus* kot *A. pleuropneumoniae* (Nicolet, 1988).

Plevropnevmonija je ena od ekonomsko pomembnih, nalezljivih, pogosto smrtnih bakterijskih bolezni respiratornega trakta pri prašičih in se pojavlja tako v Evropi, ZDA, Kanadi in Vzhodni Aziji (Taylor, 2006f). Izgube nastanejo zaradi poginov živali, zmanjšane proizvodnje in zaradi večjih stroškov zdravljenja in vakcinacije (Gottschalk in Taylor, 2006).

2.8.1. Epidemiologija

A. pleuropneumoniae glede na antigene razvrščamo v 15 serovarov (Nielsen in sod., 1997). O izbruhih plevropnevmonije so poročali praktično iz vseh evropskih držav in različnih delov ZDA in Kanade, Mehike, Južne Amerike, Japonske, Koreje, Tajvana in Avstralije. Znotraj ene države se lahko pojavljajo različni serovari. Nekateri serovari (npr. serovar 3) so v nekaterih državah nizko virulentni in epidemiološko nepomembni, v drugih pa epidemični. Različni serovari se lahko pojavljajo tudi znotraj ene farme (Gottschalk in Taylor, 2006).

Pri akutni in perakutni okužbi so *A. pleuropneumoniae* dokazali ne le v spremenjenem pljučnem tkivu, ampak tudi v nosnem izcedku. Za subklinično obliko bolezni zbolijo živali izpostavljene majhnemu številu klic ali po klinični ozdravitvi, ki ostanejo klicenosci (Gottschalk in Taylor, 2006). Kume in sod. (1984) so ugotovili, da se v teh primerih *A. pleuropneumoniae* večinoma nahaja v nekrotičnem pljučnem tkivu in/ali v tonzilah, manj pogosto v nosni votlini.

Povzročitelja v rejo najpogosteje vnesejo klicenosci. Bolezen se v reji širi z dotikom in kapljično, lahko tudi posredno z obleko in obutvijo (Gottschalk in Taylor, 2006). Kristensen in sod. (2004) so dokazali, da je prenos po zraku na kratke razdalje (1 m) možen, vendar redek. Premikanje in mešanje živali povečuje tveganje za okužbo.

A. pleuropneumoniae lahko v okolju preživi nekaj dni, če je obdan s sluzjo oziroma organsko snovjo, v čisti vodi in pri 4 °C pa do 30 dni (Gottschalk in Taylor, 2006; Taylor, 2006f).

Vigre in sod. (2002) so ugotovili, da je visoka incidenca okužbe z *A. pleuropneumoniae* med 4. in 12. tednom starosti v povezavi s slabljenjem kolostralne imunosti v tem obdobju.

Ugotovili so tudi, da se *A. pleuropneumoniae* lahko prenese s svinj na pujske v prvih 3 tednih starosti.

Kolostralna protitelesa pri pujskih vztrajajo od 2 tednov do 2 mesecev starosti, odvisno od prvotnega titra (Vigre in sod., 2003).

V akutni fazi bolezni je obolevnost običajno visoka, smrtnost pa je odvisna od virulence seva in od okolja. Prenapolnjeni boksi, neugodne klimatske razmere (hitre spremembe v temperaturi in visoka relativna vlaga in nezadostna ventilacija) lahko vplivajo tako na višjo obolevnost kot tudi smrtnost. Najvišja incidenca izbruhov bolezni je med pitanci, tveganje pa raste z velikostjo črede. Obolevnost in smrtnost se zvišata tudi ob sočasni okužbi z drugimi povzročitelji (virus bolezni Aujeszkega, PRRSV, PCV2,..) (Gottschalk in Taylor, 2006; Taylor, 2006f).

2.8.2. Patogeneza

Po vstopu v organizem se *A. pleuropneumoniae* veže na tonzilarni epitelij; posledica je vakuolizacija in deskvamacija epitelija in infiltracija nevtrofilcev v epitelij tonzil (Chiers in sod., 1999). Bakterija se slabo veže na cilije, epitelij traheje ali bronhov (Gottschalk in Taylor, 2006), dobro pa se veže na alveolarni epitelij (Van Overbeke in sod., 2002). Potrdili so prisotnost fimbrij (tip 4) in fimbrijskih podenot, ki naj bi olajšale bakterijsko vezavo in kolonizacijo (Zhang in sod., 2000). Pri vezavi *A. pleuropneumoniae* na prašičje celice sodeluje tudi LPS (Gottschalk in Taylor, 2006). Abul-Milh in sod. (1999) so ugotovili, da so glikosfingolipidi, ki so prisotni v respiratornih epitelijskih celicah, možni receptorji za vezavo *A. pleuropneumoniae*. *A. pleuropneumoniae* fagocitirajo makrofagi in nevtrofilci. Kot kaže je bakterija odporna na delovanje komplementa predvsem zaradi polisaharidne kapsule (CPS) (serovar 5) in LPS (serovar 1) (Gottschalk in Taylor, 2006). *A. pleuropneumoniae* izloča toksine, ki poškodujejo alveolarne makrofage in nevtrofilce. Sem sodita dva hemolitična eksotoksina (ApxI in ApxII) in nehemolitični eksotoksin (ApxIII), ki pa je močno citotoksičen (Haesebrouck in sod., 1997). Četrty toksin ApxIV (proizveden samo in vivo) je specifičen za vrsto *A. pleuropneumoniae* in ga niso odkrili pri nobeni drugi vrsti *Actinobacillus* (Frey, 2002).

Cirkulirajoča protitelesa se pojavijo 10–14 dni po okužbi. Protitelesa dosežejo vrh 4–6 tednov po okužbi in lahko perzistirajo nekaj mesecev. Protitelesa so usmerjena proti različnim bakterijskim strukturam in produktom, vključno s kapsulo, LPS antigeni, toksini, zunanjimi

membranskimi proteini. Nastajajo tako lokalna IgA kot tudi serumska IgG protitelesa (Gottschalk in Taylor, 2006; Taylor, 2006f).

2.8.3. Klinična znamenja

Klinični potek je lahko perakuten, akuten in kroničen (Gottschalk in Taylor, 2006). Zbolijo lahko vse starostne skupine prašičev, najpogosteje med 12–16 tednom starosti (Marsteller in Fenwick, 1999).

Pri perakutni obliki eden ali več odstavljenecv v boksu ali različnih boksih nenadoma zboli. Telesna temperatura se poviša (41,5 °C) in pujski postanejo apatični in neješči. Nastopi kratko obdobje driske in bruhanja, ni pa izraženih respiratornih motenj. Koža na nosu, ušesih, nogah in kasneje po celem telesu, postane cianotična (Gottschalk in Taylor, 2006; Taylor, 2006f). V terminalni fazi, se pojavi dispneja, dihanje skozi usta, živali sedijo, rektalna temperatura se drastično zniža (Shope, 1964). Malo pred smrtjo se običajno pojavi obilna, krvava pena na ustih in nosnicah. Smrt nastopi znotraj 24–36 ur po pojavu kliničnih znamenj (Haesebrouck in sod., 1996). Nekatere živali poginejo brez vidnih kliničnih znamenj (Gottschalk in Taylor, 2006; Shope, 1964).

Pri akutni obliki je prizadetih več prašičev v enem ali različnih boksih. Telesna temperatura naraste na 40,5-41°C, koža lahko postane rdečkasta, živali so depresivne, nerade vstajajo, zavračajo hrano in vodo; pojavi se dispneja, kašelj in včasih dihanje skozi usta (Gottschalk in Taylor, 2006; Vigre in sod., 2002). Potek bolezni je odvisen od posamezne živali, od obsežnosti pljučnih sprememb in časa začetka terapije (Gottschalk in Taylor, 2006).

Kronična oblika se pojavi po prenehanju akutnih kliničnih znamenj. Telesna temperatura ni oziroma je le malo povišana, pojavlja se občasen kašelj z različno intenzivnostjo, živali se nerade premikajo. Appetit je lahko zmanjšan, kar ima za posledico nižje priraste. Pri sočasnih okužbah z drugimi bakterijami in virusi so lahko klinična znamenja resnejša (Gottschalk in Taylor, 2006; Taylor, 2006f). Pri prvih izbruhih, zlasti v SPF čredah, se lahko pojavijo tudi abortusi (Wilson in Kierstead, 1976; Taylor, 2006f).

Pri nekaterih čredah se pojavlja subklinična oblika bolezni, kjer so živali sicer okužene z *A. pleuropneumoniae*, vendar ne kažejo kliničnih znamenj, na klavnici pa ne zaznamo patoanatomskih sprememb (Gottschalk in Taylor, 2006).

2.8.4. Patoanatomske in patohistološke spremembe

Pnevmonija, ki nastane zaradi okužbe z *A. pleuropneumoniae*, je večinoma bilateralna. Največkrat so prizadeti kardialni in apikalni režnji; na diafragmatskih režnjih pa so spremembe fokalne in omejene (Gottschalk in Taylor, 2006). Pri hudih primerih bolezni so bronhiji in traheja zapolnjeni z rdeče obarvano peno (Bertram, 1988). Prizadeta področja pljuč so temna in čvrsta, pri perakutnih primerih z malo ali brez fibrinoznega plevritisa (Gottschalk in Taylor, 2006; Marsteller in Fenwick, 1999). Fibrinozni plevritis je viden predvsem pri živalih, ki so poginile v akutni fazi bolezni, vsaj 24 ur po okužbi (Gottschalk in Taylor, 2006; Marsteller in Fenwick, 1999; Bertram, 1988). Pri kronično okuženih živalih se pojavlja adhezivni fibrozni plevritis in abscesi v pljučih (Marsteller in Fenwick, 1999). Temno obarvana področja zgodnjih pljučnih sprememb postanejo svetlejša, čvrsta pa samo na najbolj prizadetih mestih (Gottschalk in Taylor, 2006).

Značilne za pljučne spremembe so nekroze, krvavitve, infiltracija nevtrofilcev, limfocitov in makrofagov, vaskularna tromboza, edem in fibrinozni eksudat (Bertram, 1988; Marois in sod., 2009). Pri kronični obliki bolezni so nekrotična žarišča obdana z obročem iz fibroznega tkiva, značilen pa je tudi fibrozni plevritis (Gottschalk in Taylor, 2006; Frank in sod., 1992).

2.8.5. Diagnostika

Pri akutnih izbruhih APP lahko na bolezen posumimo že na podlagi kliničnih znamenj. Pri postavitvi diagnoze nam je v veliko pomoč tudi patoanatomska diagnostika, nujna pa je tudi bakteriološka potrditev bolezni (Taylor, 2006f).

A. pleuropneumoniae lahko izoliramo iz tkiva ali izločkov na agarju s 5 % ovčje krvi. Da pospešimo rast na gojišču nasadimo še kulturo *Staphylococcus epidermis* ali *Staphylococcus aureus* in nikotinamid adenin dinukleotid (NAD). Po aerobni inkubaciji preko noči se v bližini *Staphylococcus epidermis* ali *Staphylococcus aureus* pojavijo majhne kolonije, obdane s cono popolne hemolize. Pri nekaterih serovarih (npr. serovara 7 in 12) je cona hemolize manj intenzivna. Ko biokemično odkrijemo atipične izolate (npr. ureaza negativne) oziroma ko izolatov ne moremo tipizirati, je priporočljivo narediti test PCR (Gottschalk in Taylor, 2006).

Kar nekaj metod je opisanih, ki se uporabljajo za serotipizacijo *A. pleuropneumoniae*: aglutinacija, precipitacija, protitočna imunoelktroforeza, indirektna hemaglutinacija, koaglutinacija, imunodifuzija in imunofluorescenca. Najpogostejše težave pri serološki

klasifikaciji *A. pleuropneumoniae* so navzkrižne reakcije med serovari 3, 6, in 8; med serovari 1, 9, in 11 ter serovari 4 in 7 (Lacouture in sod., 1997). Rutinsko se uporablja test koaglutinacije, vendar je zaradi navzkrižnih reakcij potreben potrditveni test, kot je npr. agar gel difuzijski test ali indirektna hemaglutinacija (Gottschalk in Taylor, 2006; Mittal in sod., 1983). Lacouture in sod. (1997) so za serotipizacijo *A. pleuropneumoniae* uporabili monoklonska protitelesa.

Bakteriološka diagnoza je manj zanesljiva pri kronični obliki bolezni. Iz kroničnih pljučnih sprememb je težko izolirati *A. pleuropneumoniae*. Boljši so serološki testi, ki se uporabljajo za direktno dokazovanje *A. pleuropneumoniae* iz pljučnega tkiva: imunofluorescenca, precipitacija, koaglutinacija, lateks aglutinacija, ELISA in protitočna imunoelektroforeza. Bakterijsko nukleinsko kislino lahko ugotavljamo s številnimi metodami, vključno z označenimi DNA lovkami v tkivu ali z metodo PCR (Gottschalk in Taylor, 2006).

Dokaz *A. pleuropneumoniae* v subklinično okuženi čredi je še bolj zahteven. Aktinobacili so običajno lokalizirani v tonzilah in manj pogosto v nosni votlini, skupaj s številnimi NAD-odvisnimi bakterijskimi vrstami, ki običajno niso patogene, lahko pa motijo identifikacijo *A. pleuropneumoniae* (Kielstein in sod., 2001). Gagné in sod. (1998) so razvili imunomagnetno ločitveno (separativno) tehniko (IMS) za selektivno izolacijo *A. pleuropneumoniae* serovar 1 iz tonzil. Izolacija *A. pleuropneumoniae* s pomočjo IMS ima signifikantno višjo občutljivost kot standardne tehnike izolacije, vendar pa je IMS dolgotrajna in draga metoda (Fittipaldi in sod., 2003).

Za dokaz *A. pleuropneumoniae* na tonzilah se lahko uporabljajo tudi molekularne tehnike. V zadnjih letih so na voljo komercialni kiti PCR (Gottschalk in Taylor, 2006). Fittipaldi in sod. (2003) so ocenjevali 8 testov PCR za ugotavljanje *A. pleuropneumoniae* na tonzilah. Večina testov PCR je pokazala dobro specifičnost, čeprav je nekaj testov dalo lažno pozitivne rezultate. Test PCR je bil občutljivejši kot standardna izolacija, pri serološko negativnih čredah pa *A. pleuropneumoniae* niso zaznali niti s testi PCR. Jessing in sod. (2003) so razvili multiplex PCR za simultano identifikacijo in serotipizacijo *A. pleuropneumoniae* serovarov 2, 5 in 6. Uporabili so regije DNA, ki so serovar specifične in sodelujejo pri biosintezi kapsularnih polisaharidov.

Serološke metode so zelo pomembne pri diagnostiki subkliničnega poteka okužbe z *A. pleuropneumoniae*. Razvili so kar nekaj testov za ugotavljanje protiteles zoper toksine ali somatske in/ali kapsularne antigene (Gottschalk in Taylor, 2006). Večina testov, ki zaznajo

protitelesa proti toksinom ApxI, ApxII, ApxIII ima nizko specifičnost, saj nekateri mikroorganizmi kot npr. *Actinobacillus suis*, *Actinobacillus rossii* in *Escherichia coli* proizvajajo sorodne toksine (Gottschalk in Taylor, 2006; Nielsen in sod., 2000). Dreyfus in sod. (2004) so izdelali indirektni test ELISA, kjer so uporabili rekombinantni ApxIV. Analiza serumov prašičev eksperimentalno in naravno okuženih z *A. pleuropneumoniae* ter prašičev prostih okužbe je pokazala, da je ta test ELISA 100 % specifičen in 93,8 % občutljiv. Pogosto se uporabljajo tudi testi ELISA, ki za antigen uporabljajo O-verigo LPS. Pokazali so visoko čredno občutljivost (98 %) in specifičnost (95 %) (Grøndahl-Hansen in sod., 2003). Ti testi ELISA lahko ugotavljajo skupine serovarov: 1, 9 in 11; 2; 3, 6 in 8; 4 in 7; 10; ter 12 (Gottschalk in Taylor, 2006).

2.8.6. Terapija

Terapija z antibiotiki je pri klinično obolelih živalih učinkovita v začetni fazi bolezni, ko še lahko prepreči pogin. Antibiotike se aplicira parenteralno (subkutano ali intramuskularno) v visokih dozah, saj prizadete živali ne morejo piti niti jesti. Običajno je potrebno aplikacijo ponoviti, odvisno od farmakokinetičnih lastnosti antibiotika. Terapija s hrano in vodo je možna tam, kjer so živali še sposobne normalno piti in jesti. Najboljše rezultate pri izbruhu bolezni daje kombinacija parenteralnega in peroralnega zdravljenja (Gottschalk in Taylor, 2006).

A. pleuropneumoniae je in vitro občutljiv na penicilin, ampicilin, cefalosporine, kloramfenikol, kolistin, sulfonamide, kotrimazol (trimetoprim in sulfametoksazol) in gentamicin (Gottschalk in Taylor, 2006; Gilbride in Rosendal, 1984). Kot učinkovite so se izkazali tudi tilmikosin (Paradis in sod., 2004), tiamulin, enrofloksacin in florfenikol (Gjestvang in sod., 2008; Fraile in sod., 2008).

Rezistenca na antibiotike je odvisna od njihove uporabe. V ZDA in na Danskem je kar 90 % izolatov bilo rezistentnih na tetracikline (Taylor, 2006f). Gilbride in Rosental (1984) sta ugotovila, da je 40 sevov *A. pleuropneumoniae* (od 51) rezistentnih na streptomycin, 23 na novobiocin, 3 na penicilin, ampicilin, karbencilin, meticilin in tetracikline.

2.8.7. Preventivni ukrepi in nadzor bolezni

Eliminacija *A. pleuropneumoniae* je težavna. Najprej je potrebno ugotoviti, kakšne so ekonomske izgube in se nato odločiti za nadzor ali eliminacijo bolezni. Pogine lahko zmanjšamo s pravočasno terapijo obolelih živali. Bolezen se zdravi v zgodnji fazi, zdravljenje

živali pa do zakola izoliramo od ostalih. Kjer to ni mogoče, je potrebno izboljšati dejavnike okolja, kot sta temperatura in ventilacija, ter uporabiti trdne pregrade med boksi. Nepretrgana medikacija ali aplikacija zdravil v presledkih sta praktična, vendar neprimerna za daljši čas. Strateško zdravljenje je usmerjeno predvsem na rizična obdobja, ki jih ugotovimo s pomočjo patoanatomske diagnostike, kliničnih pregledov in črednih seroloških profilov. Tveganje okužbe bomo zmanjšali s sistemom »vse noter-vse ven«, z ločenim zgodnjim odstavljanjem in z večjimi boksi. Živali kupujemo samo iz farm prostih *A. pleuropneumoniae*, da se izognemo vnosu novih serovarov in rezistentnih sevov. V kronično okuženih čredah je potrebno novo kupljene živali pred vnosom v čredo vakcinirati (Gottschalk in Taylor, 2006; Van Overbeke in sod., 2001).

Cepiva, ki so specifična za določen serovar, lahko zmanjšajo smrtnost pri okužbi s homolognim serovarom, ne dajo pa zaščite pri okužbi s heterolognimi serovari (Van Overbeke in sod., 2001). »Druga generacija vakcin« zagotavlja visoko zaščito zoper 12 serovarov (1–12) tako eksperimentalno kot tudi v hlevskih pogojih. Vakcinacija prašičev samo z RTX toksini ščiti le pred poginom, kombinacija RTX toksinov in zunanjega proteina 42 kDa (OMP) pa varuje tudi pred spremembami na pljučih (Van den Bosch in Frey, 2003). Prašiče vakcinirane s temi vakcinami je možno ločiti od naravno okuženih prašičev.

Z vakcinacijo naj bi zmanjšali obolevnost, smrtnost, stroške zdravljenja, zvišali dnevni prirast in izboljšali konverzijo krme. V program ukrepov zoper *A. pleuropneumoniae* sodi tudi dezinfekcija (Gottschalk in Taylor, 2006).

2.8.8. Eradikacija

Metoda depopulacije in ponovne naselitve prašičev, ki izvirajo iz certificiranih rej prostih *A. pleuropneumoniae*, je draga. Uspešna je tudi metoda ločenega zgodnjega odstavljanja. Pri čredah z nizkim odstotkom serološko pozitivnih živali (manj kot 30 % seroprevalenca) se lahko uporabi metoda »testiranje in izločitev živali«, ki v bistvu temelji na serološkem testiranju svinj pred prasitvijo in odstavitvijo pujskov pri 2 tednih starosti. Pujske se loči od potencialno okužene črede. Seropozitivne svinje se izloča, dokler celotna plemenska čreda ni seronegativna. Pujski, ki so seronegativni do 12. tedna starosti, so primerni za obnovo črede. Ta program lahko traja 6-12 mesecev. Med izvajanjem programa se celotni čredi polaga medicirana krma (Gottschalk in Taylor, 2006).

Gjestvang in sod. (2008) so ugotovili, da je bil program delne depopulacije in intramuskularne aplikacije enrofloksacina ter polaganje medicirane krme (tiamulin) uspešen pri eradikaciji serovara 2, manj uspešen pa pri serovaru 6 in 8.

V Danskih SPF sistemih se uporablja delna depopulacija v povezavi s strateškim zdravljenjem (Szancer, 2008).

2.9. *Haemophilus parasuis*

Glässerjeva bolezen (prašičji poliserozitis in poliartritis), ki jo povzroča *H. parasuis*, je včasih veljala za sporadično bolezen mladih prašičev izpostavljenim stresu. Danes je ena od pomembnih bakterijskih bolezni, ki prizadene prašiče po celem svetu (Rapp-Gabrielson in sod., 2006; Kielstein in Rapp-Gabrielson, 1992). Ekonomske izgube, ki so posledica okužbe, nastanejo predvsem zaradi stroškov zdravljenja z antibiotiki in poginov v akutni fazi bolezni (Nedbalcova in sod., 2006).

2.9.1. Etiologija

H. parasuis je prvi opisal Glässer leta 1910, prva pa sta ga izolirala Schermer in Ehrlich leta 1922. Z biokemičnimi preiskavami so ugotovili, da je etiološki povzročitelj Glässerjeve bolezni podoben bakteriji *Haemophilus suis*, ki potrebuje za rast na gojišču faktorja X (železov porfirin) in V (nikotinamid adenin dinukleotid-NAD) (Oliveira in Pijoan, 2004). Biberstein in White (1969) sta dokazala, da *H. parasuis* za rast potrebuje le faktor V.

H. parasuis je majhna, negibljiva, pleomorfna paličasta bakterija (Rapp-Gabrielson in sod., 2006; Oliveira in Pijoan, 2004). *H. parasuis*, ki za svojo rast potrebuje faktor V, raste na čokoladnem agarju, Levinthal agarju, PPLO (angl.: pleuropneumonia-like organism) agarju z dodatkom NAD. Na krvnem agarju raste le v okolici bakterije *Staphylococcus aureus* in po 24-48 urah zrastejo majhne, prosojne in nehemolitične kolonije (Nedbalcova in sod., 2006, Rapp-Gabrielson in sod., 2006).

Kielstein in Rapp-Gabrielson (1992) sta s pomočjo imunodifuznega testa (ID) prepoznala 15 serovarov. Serotipizacija izolatov iz Japonske, Nemčije, Avstralije, Združenih držav Amerike, Kanade, Španije in Danske je pokazala, da so najbolj prevalentni serovari 4, 5 in 13 (Rapp-Gabrielson in sod., 2006).

V zadnjem času se za serotipizacijo *H. parasuis* uporablja tudi test indirektna hemaglutinacije (IHA) (Tadjine s sod., 2004) s katerim naj bi zmanjšali delež netipiziranih izolatov. Za razlikovanje izolatov so vpeljali test ERIC-PCR (angl.: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus polymerase chain reaction) (Rafiee in sod., 2000).

2.9.2. Epidemiologija

Prašič je naravni gostitelj bakterije *H. parasuis* (Rapp-Gabrielson in sod., 2006). Bakterija se pri zdravih prašičih najpogosteje izolira iz nosnega in trahealnega brisa (Rapp-Gabrielson in sod., 2006; Smart in sod., 1989; Vahle s sod., 1995) ter iz pljuč prašiča s pnevmonijo (Rapp-Gabrielson in sod., 2006; Vahle s sod., 1997).

Potek bolezni pri okužbi s *H. parasuis* je resnejši v SPF čredah, kjer izbruhe bolezni spremljata visoka obolevnost in smrtnost živali (Nedbalcova in sod., 2006). Ekonomske izgube zaradi okužb se pri SPF prašičih pojavijo, kadar take živali prestavijo v konvencionalne črede ali kadar se povzročitelja vnese v naivno SPF čredo (Smart in sod., 1993). V konvencionalnih čredah *H. parasuis* sodeluje pri PRDC (Nedbalcova in sod., 2006). V zadnjih letih je pogosta izolacija *H. parasuis* iz pljuč prašičev s pljučnico, kar naj bi bilo v povezavi z višjo prevalenco mikoplazemskih pljučnic in virusnih povzročiteljev kot so PRRSV, virus PI in PRCV (Rapp-Gabrielson in sod., 2006). *H. parasuis* pa lahko tudi sam povzroči pljučnico (Solano in sod., 1997).

Razlike v virulenci med serovari so pri SPF ali CDCD (angl.: cesarean-derived, colostrum-deprived) prašičih dokazali z inokulacijo 15 različnih serovarov. Najbolj virulentni serovari so bili 1, 5, 10, 12, 13 in 14, ki so pri okuženih prašičih povzročili pogin; medtem ko so serovari 2, 4, 8 in 15 povzročili poliserozitis, serovari 3, 6, 7, 9 in 11 niso povzročili nobenih kliničnih simptomov ali patoanatomskih sprememb (Kielstein in Rapp-Gabrielson, 1992).

2.9.3. Patogeneza

Vahle in sod. (1997) so CDCD prašiče okužili intranazalno z virulentnim sevom *H. parasuis*. *H. parasuis* so nato uspeli izolirati iz nosne votline in traheje, občasno pa tudi iz pljuč in krvi. Ugotovili so, da okužba s *H. parasuis* povzroča propad cilijev in akutno nabreklost celic v nazalni in trahealni sluznici ter da so bile spremembe izrazitejše na področjih z infiltrati nevtrofilcev. Postavili so hipotezo, da poškodbe sluzničnega epitelija in vnetje povzroča več toksinov, ki jih izloča *H. parasuis*.

Nekatere študije so pokazale, da predhodna okužba nosne votline z *B. bronchiseptica* spodbudi naselitev s *H. parasuis* (Brockmeier, 2004).

Bakteriemija zaradi *H. parasuis* se pri prašičih pojavlja v zgodnji fazi okužbe in spremlja razmnoževanje bakterije na različnih seroznih površinah, kar ima za posledico poliserozitis in poliartritis (Vahle in sod., 1995).

2.9.4. Klinična znamenja

Običajno obolijo pujski med 4. in 6. tednom starosti. V endemično okuženih čredah *H. parasuis* prizadene starejše živali. V teh čredah se bolezen pojavlja sporadično, potek bolezni je blažji in spremembe običajno omejene le na pljuča (Oliveira in Pijoan, 2002).

Pri naivnih čredah oziroma prašičih je potek bolezni hiter; klinična znamenja pa se pojavijo kmalu po okužbi (Rapp-Gabrielson in sod., 2006) in so večinoma nespecifična (Nedbalcova in sod., 2006). Pri eksperimentalni okužbi CDCD prašičev s *H. parasuis* se je 36 ur po okužbi rektalna temperatura dvignila na 41,6 °C (Vahle in sod., 1995). Poleg povišane telesne temperature, apatije in neješčnosti, se lahko pojavijo še naslednji simptomi: dispneja, otekli sklepi, šepanje, tremor, inkoordinacija, cianoza, ležanje in smrt (Rapp-Gabrielson in sod., 2006; Nedbalcova in sod., 2006). Abortusi pri svinjah in kronično šepanje pri merjascih so lahko posledica akutne okužbe. V konvencionalnih čredah kronična okužba povzroči slabši prirast prašičev, kašelj, dispnejo in šepanje živali (Rapp-Gabrielson in sod., 2006).

2.9.5. Patoanatomske in patohistološke spremembe

Pri raztelesbi pogosto zasledimo serofibrinozni ali fibrinopurulentni eksudat na seroznih površinah, npr. na peritoneumu, perikardu, plevri ali sklepnih površinah (predvsem karpalni in tarzalni sklep) (Rapp-Gabrielson in sod., 2006; Nedbalcova in sod., 2006). Redkeje se pojavlja akutna septikemična oblika bolezni, ki se kaže v cianozi, subkutanem in pljučnem edemu in smrti, brez tipičnih seroznih vnetij (Rapp-Gabrielson in sod., 2006). Pri histopatološkem pregledu v eksudatu najdemo fibrin, nevtrofilce in v manjšem obsegu tudi makrofage (Rapp-Gabrielson in sod., 2006; Nedbalcova in sod., 2006). Pri resnejših obolenjih se razvije meningitis, meningoencefalitis, ki ga spremlja povečano izločanje cerebrospinalne tekočine, in artritis (Nedbalcova in sod., 2006). Smart je s sod. (1989) v 11-letni retrospektivni študiji ugotovil, da se je pri merjascih, ki so dokazano oboleli za Glässerjevo boleznijo, največkrat pojavljal peritonitis (76 %), perikarditis in plevritis (74 %), artritis (62 %) in meningitis (45 %). Segalés je s sod. (1997) pri eksperimentalno okuženih prašičih s *H.*

parasuis serovar 5 ugotovil pri 50 % okuženih prašičev purulentno bronhopnevmonijo in v enem primeru tudi kataralni rinitis. Pri eksperimentalni okužbi CDCD prašičev s *H. parasuis* se je purulentni rinitis pojavil že 12 ur po okužbi (Vahle in sod., 1995).

2.9.6. Diagnostika

Diagnoza temelji na epidemioloških podatkih črede, kliničnih znamenjih in patoanatomskem izvidu (Rapp-Gabrielson in sod., 2006).

Izolacija *H. parasuis* iz kliničnih vzorcev je zahtevna; velikokrat so prisotni kontaminanti (Nedbalcova in sod., 2006). *H. parasuis* običajno naseljuje zgornji respiratorni trakt, zato njegova izolacija še ne potrdi sistemske okužbe. Za postavitve diagnoze je zato potrebna izolacija *H. parasuis* iz perikarda, plevre, peritoneja ali cerebrospinalne tekočine in sklepov (Oliveira in Pijoan, 2002). Po uspešni izolaciji je potrebno narediti biokemične teste, da se *H. parasuis* loči od ostalih nehemolitičnih, NAD-odvisnih bakterij, kot so *Actinobacillus minor*, *Actinobacillus indolicus*, *Actinobacillus porcinius* in druge. Test PCR se lahko uporablja kot nadomestilo za biokemične teste (Oliveira in sod., 2001). Poleg izolacije se za diagnozo okužbe s *H. parasuis* uporablja tudi imunohistokemične preiskave, vendar pa nekatera poliklonska protitelesa, ki se uporabljajo v diagnostiki *H. parasuis*, navzkrižno reagirajo z *A. pleuropneumoniae* (Segalés in sod., 1997).

Za serotipizacijo se najpogosteje uporabljajo: test ID, test IHA in test agar gel precipitacije (AGPT) (Nedbalcova in sod., 2006; Oliveira in Pijoan, 2002); za genotipizacijo pa metoda ERIC-PCR (Oliveira in Pijoan, 2002; Rafiee in sod., 2000).

Test RVK in ELISA se uporabljata za dokazovanje protiteles proti *H. parasuis* (Nedbalcova in sod., 2006).

2.9.7. Terapija

Visoke doze antibiotikov je potrebno aplicirati parenteralno takoj, ko se pojavijo klinična znamenja; zdraviti je potrebno celotno skupino prašičev, ne samo tistih s kliničnimi znamenji bolezni (Rapp-Gabrielson in sod., 2006). Večina sevov *H. parasuis* je in vitro občutljivih na ampicilin, ceftiofur, ciprofloksacin, eritromicin, florfenikol, penicilin, spektinomycin, tetraciklin, tiamulin ali tilmikosin (Aarestrup in sod., 2004). Nasprotno pa so bili španski izolati občutljivi le na florfenikol, rezistentni pa na penicilin, ampicilin, oksitetracikline, eritromicin, tilmikosin, tiamulin in trimetoprim (Martín de la Fuente in sod., 2007).

2.9.8. Preventiva in vpliv *H. parasuis* na gostiteljev imunski sistem

Eliminacija *H. parasuis* z zgodnjo odstavitvijo pujskov običajno ni uspešna, saj pride do kolonizacije nosne sluznice že pred 1 tednom starosti (Rapp-Gabrielson in sod., 2006). Clark in sod. (1994) so ugotovili, da lahko eliminacijo *H. parasuis* dosežemo le s parenteralno ali oralno aplikacijo visokih doz antibiotikov sesnim pujskom. Vendar če naivne pujske v kasnejši fazi proizvodnje mešamo s pujski, ki so okuženi s *H. parasuis*, ima to lahko za posledice velike ekonomske izgube. Vnos novih plemenskih živali v čredo z drugačnim zdravstvenim statusom mora temeljiti na izolaciji in aklimatizaciji živali, da se razvije zaščitna imunost zaradi vakcinacije ali prekužitve (Rapp-Gabrielson in sod., 2006).

Uspešna preventiva proti okužbi s *H. parasuis* temelji na uporabi komercialnih ali avtogenih vakcinah (Nedbalcova in sod., 2006). Komercialne vakcine zagotavljajo zadovoljivo homologno zaščito zoper seve *H. parasuis* iz iste skupine serovarov (Oliveira in sod., 2004). Za avtogene vakcine se priporoča uporaba izolatov iz možganov, manj primerni so izolati pridobljeni iz sklepov, neprimerni pa izolati iz pljuč zaradi njihove visoke heterogenosti (Oliveira in Pijoan, 2002). S pomočjo genotipizacije se lahko določijo skupine genetsko sorodnih sevov, ki so v čredi in se jih vključi v avtogeno vakcino (Rapp-Gabrielson in sod., 2006; Oliveira in sod., 2004). Baumann in Bilkei (2002) sta ugotovila, da imajo vakcinirani in nevakcinirani pujski vakciniranih mladic do 10. tedna starosti višje titre protiteles kot pujski nevakciniranih mladic. Ugotovila sta tudi, da je pri prašičih vakciniranih mladic signifikantno manjši delež bolezenskih sprememb na pljučih in sklepih ter višji dnevni prirast.

Poleg vakcinacije in zdravljenja z antibiotiki je pomembna tudi eliminacija ostalih povzročiteljev, nikakor pa se ne sme združevati prašičev iz različnih faz proizvodnje (Rapp-Gabrielson in sod., 2006).

3. MATERIAL IN METODE

3.1. Material

3.1.1. Podatki o farmi

Na farmi poteka intenzivna reja prašičev; na eni lokaciji so združene vse proizvodne faze od pripusta do klavne teže: pripustišče, čakališče, porodnišnica, vzrejališče in pitališče. Na isti lokaciji imajo tako vse kategorije prašičev: plemenske svinje, plemenske merjasce, sesne pujske, odstavljenice in pitance. Del pitancev (pri starosti 12 tednov oziroma teži 25–30 kg) proizvedenih na farmi pa redijo tudi izbrani partnerski rejci.

Sesnim pujskom antibiotike intramuskularno aplicirajo 1., 3. in 12. dan starosti; odstavljenecem pa pri 4 tednih starosti antibiotike 5 dni dodajajo v vodo. Glede na zdravstveno stanje, pa po potrebi prašiči pri 12 tednih starosti dobivajo še antibiotike s krmo.

Ob začetku jemanja vzorcev je bilo na farmi 44.275 prašičev, od tega 4.857 plemenskih svinj, 2.183 plemenskih mladic in 77 plemenskih merjascev. Pujske so odstavljali v starosti 24 do 28 dni, v pitanje so šli pri starosti 11 do 12 tednov (teža okoli 22, 23 kg). Živali redijo do teže okoli 115 kg, ko gredo v zakol.

Sesni pujski so bili 10. do 14. dan starosti vakcinirani proti *M. hyopneumoniae*, plemenske svinje so 10 do 14 dni pred pripustom vakcinirali proti rdečici, kolibacilozi, klostridijskemu enteritisu pujskov, atrofičnemu rinitisu; mladice tudi proti parvovirozi.

3.1.2. Serumi

Vzorci smo zbirali od decembra 2007 do julija 2008.

Na protitelesa proti PCV2, virusu PI, PRCV, PRRSV, *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis* smo v tem obdobju pregledali 30 serumov pitancev, 36 serumov plemenskih svinj in 342 serumov prašičev (9 odvzemov po 38 serumov). Vzorce krvi smo 5 do 6 ur pustili na sobni temperaturi in 1 dan v hladilniku na temperaturi okoli 4 °C.

3.1.3. Testi

Pri preiskavah serumov smo uporabili komercialne teste ELISA različnih proizvajalcev:

ELISA INGEZIM INFLUENZA PORCINA (Ingenasa, Španija) je indirektna ELISA za ugotavljanje specifičnih protiteles proti virusu Influence A v prašičjem serumu.

Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) Antibody Test Kit CHEKIT* APP-ApxIV (IDEXX laboratories, Švica) je indirektna ELISA za ugotavljanje protiteles proti vsem serotipom *A. pleuropneumoniae* v prašičjem serumu in plazmi.

ELISA INGEZIM MHYO COMPAC (Ingenasa, Španija) je bloking ELISA za ugotavljanje specifičnih protiteles proti *M. hyopneumoniae* v prašičjem serumu.

ELISA INGEZIM CIRCO IgG (Ingenasa, Španija) je indirektna ELISA za ugotavljanje specifičnih protiteles proti PCV2 v prašičjem serumu.

ELISA INGEZIM CORONA DIFERENCIAL 2.0 (Ingenasa, Španija) je bloking ELISA za ugotavljanje in razločevanje protiteles proti virusu TGE in proti PRCV.

Haemophilus parasuis Antibody Test Kit (ELISA) Swinecheck® HPS (Biovet Inc., Kanada) je ELISA za ugotavljanje specifičnih protiteles proti *H. parasuis* v prašičjem serumu.

ELISA INGEZIM PRRS UNIVERSAL (Ingenasa, Španija) je indirektna ELISA za ugotavljanje specifičnih protiteles proti ameriškim in evropskim sevom PRRSV.

3.2. Metode

3.2.1. Odvzem vzorcev serumov

Krvne vzorce pitancev smo odvzeli na klavni liniji. Plemenskim svinjam in pujskom smo kri jemali na farmi iz V. cavae cranialis. Pujskom smo prvič vzeli kri pri starosti 2 tednov, nato pa istim živalim odvzeli kri še pri 4., 6., 8., 11., 14., 17., 22. in 28. tednu starosti (9 odvzemov).

3.2.2. Vzorčenje

Za preliminarno ugotavljanje zdravstvenega stanja glede povzročiteljev PRDC pri veliki populaciji zadostuje 30 krvnih vzorcev pitancev s farme, pri čemer lahko s 95 % verjetnostjo ugotovimo, ali je prevalenca okužbe manjša ali višja od 10 % (Cannon in Roe, 1982).

Število vzorcev (število živali) za posamezne povzročitelje smo določili na podlagi formule:

$$P \times (1-P)$$

$$N = \frac{P \times (1-P)}{S.E.^2}$$

$$S.E.^2$$

N = število vzorcev

P = prevalenca

S.E. = standardna napaka

Pri zgoraj omenjenemu ugotavljanju zdravstvenega stanja na povzročitelje PRDC smo ugotovili, da je imelo od 80 % do 100 % pitancev protitelesa proti PCV2, virusu PI, PRCV, *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*.

Tabela 1. Rezultati preiskav serumov pitancev.

Kategorija	Število živali	APP	HP	VPI	<i>M. hyo</i>	PCV2	PRCV	PRRSV
		Št.poz./%	Št.poz./%	Št.poz./%	Št.poz./%	Št.poz./%	Št.poz./%	Št.poz./%
pitanci	30	30 / 100	28 / 93,3	30 / 100	24 / 80	30 / 100	30 / 100	0/0

Na podlagi tega podatka smo izračunali po formuli:

$$0,80 \times (1-0,80)$$

$$N = \frac{0,80 \times (1-0,80)}{0,0049}$$

$$0,0049$$

$$N = 33$$

Ugotovili smo, da pri 80 % prevalenci zadostuje, da pregledamo 33 serumov pujskov. Ker smo pričakovali v obravnavanem obdobju 15 % tehnološki pogin, smo se odločili, da v raziskavo uvrstimo 38 živali.

3.2.3. Priprava serumov

Krvne vzorce smo centrifugirali 10 minut pri 2600 g, nato pa smo serum prelili v več manjših epruvet po 1 ml in jih do preiskave zamrznili pri – 20 °C. Pred preiskavo smo jih odtalili na sobni temperaturi in z obračanjem premešali.

3.2.4. Statistična obdelava

Za dokaz, da se seroprevalence pri posameznih odvzemih statistično razlikujejo med seboj, smo uporabili hi-kvadrat test (McNemarjev test):

ODVZEM 2	ODVZEM 1		
	-	+	
-	A	B	A+B
+	C	D	C+D
SKUPAJ	A+C	B+D	n

n = število vzorcev

- = število negativnih vzorcev

+ = število pozitivnih vzorcev

$$\chi^2 = \frac{(B - C)^2}{(B + C)}$$

p = vrednost za hi-kvadrat porazdelitev pri 1 stopinji prostosti

Vrednost p smo izračunali s pomočjo programa Microsoft Office Excel z uporabo funkcije CHIDIST.

Če je $p < 0,05$, se rezultati odvzema signifikantno razlikujejo.

3.2.5. Testi

Pri preiskavah serumov smo uporabili komercialne teste ELISA različnih proizvajalcev.

3.2.5.1. Encimskoimunski test (ELISA)

Pri delu smo dosledno upoštevali navodila proizvajalcev.

Mikroplošče smo spirali s pomočjo polavtomatskega spiralnika za mikroplošče (Micronic; Microwash 12). Mikroplošče smo inkubirali v termostatu (Ehret).

Vrednost optične gostote smo pri zahtevani valovni dolžini izmerili na spektrofotometru (Anthos htll).

3.2.5.1.1. Encimskoimunski test (ELISA) INGEZIM CIRCO IgG (Ingenasa, Španija)

INGEZIM CIRCO IgG je indirektna ELISA za ugotavljanje specifičnih protiteles proti PCV2 v prašičjem serumu.

Princip testa:

Na polistirensko mikroploščo je vezan antigen (PCV rekombinantni protein). Če so v serumu specifična protitelesa proti PCV2, se bodo vezala na antigen, če pa jih v serumu ni, do vezave ne bo prišlo. Ko dodamo specifična monoklonska protitelesa proti prašičjim imunoglobulinom (konjugirana s peroksidazo) - konjugat, se bodo vezala na protitelesa iz seruma. Če serum ne vsebuje specifičnih protiteles, se konjugat nanje ne bo vezal in se bo s spiranjem odstranil. Prisotnost oziroma odsotnost konjugata lahko zaznamo s pomočjo specifičnega substrata, ki se v prisotnosti peroksidaze razvije kolorimetrično reakcijo.

Opis postopka:

Najprej smo pripravili raztopino za spiranje tako, da smo enemu delu koncentrirane raztopine za spiranje dodali 24 delov destilirane vode. Razredčevalc za vzorce smo pripravili tako, da smo enemu delu koncentriranega razredčevalca dodali 4 dele destilirane vode. Na mikroploščo, kjer je vezan antigen, smo dodali v dve jamici po 100 µl pozitivnega kontrolnega seruma in v dve jamici po 100 µl negativnega kontrolnega seruma. V ostale jamice smo nanесли po 100 µl seruma v razredčini 1:200 (5 µl seruma in 1 ml razredčevalca za vzorce). Mikroploščo smo inkubirali 1 uro na sobni temperaturi in jo nato 4-krat sprali z raztopino za spiranje. V vse jamice smo nanесли 100 µl konjugata in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Mikroploščo smo 6-krat sprali in v vse jamice dodali 100 µl substrata. Po 10 minutah na sobni temperaturi smo dodali v vse jamice po 100 µl »stop« raztopine in izmerili vrednost optične gostote (angl.: optical density; OD) na spektrofotometru pri valovni dolžini 450 nm.

Ker smo kontrolne serume analizirali v duplikatih, smo njihov OD izračunali kot aritmetično sredino OD vrednosti v obeh jamicah.

Za vsak vzorec smo izračunali »cut off« vrednost:

Negativna »cut off« = OD negativne kontrole + 0,2

Pozitivna »cut off« = OD negativne kontrole + 0,25

Po navodilu proizvajalca testa smo šteli kot pozitivne na protitelesa proti PCV tiste vzorce, pri katerih je bil OD večji kot pozitivna »cut off« in kot negativne tiste vzorce, pri katerih je bil OD nižji kot negativna »cut off«.

3.2.5.1.2. Encimskoimunski test (ELISA) INGEZIM INFLUENZA PORCINA (Ingenasa, Španija)

INGEZIM INFLUENZA PORCINA je indirektna ELISA za ugotavljanje specifičnih protiteles proti virusu influence A v prašičjem serumu.

Princip testa:

Na polistirensko mikroploščo je vezan antigen. Če so v serumu specifična protitelesa proti virusu, se bodo vezala na antigen, če pa jih v serumu ni, do vezave ne bo prišlo. Ko dodamo konjugat, se ta veže na specifična protitelesa iz seruma. Če serum ne vsebuje specifičnih protiteles, se konjugat nanje ne bo vezal in se bo s spiranjem odstranil. Prisotnost oziroma odsotnost konjugata lahko zaznamo s pomočjo specifičnega substrata, ki v prisotnosti peroksidaze razvije kolorimetrično reakcijo. Obarvanje, ki se pojavi, kaže na prisotnost protiteles proti virusu (pozitivna reakcija), odsotnost obarvanja pa na odsotnost specifičnih protiteles v serumu (negativna reakcija).

Opis postopka:

Najprej smo pripravili raztopino za spiranje tako, da smo enemu delu koncentrirane raztopine za spiranje dodali 24 delov destilirane vode. Razredčevalec smo pripravili tako, da smo enemu delu koncentriranega razredčevalca dodali 4 dele destilirane vode.

Na mikroploščo, kjer je vezan antigen, smo dodali v dve jamici po 100 µl pozitivnega kontrolnega seruma in v dve jamici po 100 µl negativnega kontrolnega seruma. V ostale jamice smo nanegli po 100 µl seruma v razredčini 1:100 (5 µl seruma in 495 µl razredčevalca). Mikroploščo smo inkubirali 1 uro v termostatu pri 37 °C in jo nato 4-krat sprali z raztopino za spiranje. V vse jamice smo nanegli 100 µl konjugata, ki smo ga pred uporabo z razredčevalcem redčili 1:100 in inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi. Mikroploščo

smo 5-krat sprali in v vse jamice dodali 100 µl substrata. Po 10 minutah na sobni temperaturi, v temi, smo dodali v vse jamice po 100 µl »stop« raztopine in izmerili vrednost OD na spektrofotometru pri valovni dolžini 450 nm.

Ker smo kontrolne serume analizirali v duplikatih, smo njihov OD izračunali kot aritmetično sredino OD vrednosti v obeh jamicah.

Za vsak vzorec smo izračunali razmerje (S/P vrednost; angl.: sample/positive control):

OD vzorca / OD pozitivne kontrole

Po navodilu proizvajalca testa smo šteli kot pozitivne na protitelesa proti influenci A tiste vzorce, pri katerih je bila S/P vrednost enaka ali večja od 0,2.

Titre vzorcev smo po navodilih proizvajalca izračunali po formuli:

$$\text{Titer} = 2222 \times [(S/P)]^{1,93}$$

3.2.5.1.3. Encimskoimunski test (ELISA) INGEZIM MHYO COMPAC (Ingenasa, Španija)

INGEZIM MHYO COMPAC je bloking ELISA za ugotavljanje specifičnih protiteles proti *M. hyopneumoniae* v prašičjem serumu.

Princip testa:

Na mikroploščo je vezan antigen *M. hyopneumoniae*. Če so v serumu specifična protitelesa proti *M. hyopneumoniae*, se bodo vezala na antigen, če pa jih v serumu ni, do vezave ne bo prišlo. Ko dodamo specifična monoklonska protitelesa proti *M. hyopneumoniae* (konjugirana s peroksidazo)-konjugat, bodo tekmovala s protitelesi iz seruma. Če serum vsebuje specifična protitelesa, ta ne bodo dopustila vezave konjugata na antigen vezan na plošči. Če serum ne vsebuje specifičnih protiteles, se bo konjugat vezal na antigen. Po spiranju, prisotnost oziroma odsotnost konjugata zaznamo s pomočjo substrata, ki v prisotnosti peroksidaze razvije kolorimetrično reakcijo.

Opis postopka:

Najprej smo pripravili raztopino za spiranje tako, da smo enemu delu koncentrirane raztopine za spiranje dodali 24 delov destilirane vode. Na mikroploščo, kjer je vezan antigen, smo dodali v dve jamici po 100 µl pozitivnega kontrolnega seruma in v dve jamici po 100 µl

negativnega kontrolnega seruma. V ostale jamice smo nanесли po 50 μ l razredčevalca in 50 μ l seruma (razredčina 1:2). Mikroploščo smo inkubirali 1 uro na sobni temperaturi in jo nato 4-krat sprali z raztopino za spiranje. V vse jamice smo nanесли 100 μ l konjugata in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Mikroploščo smo 6-krat sprali in v vse jamice dodali 100 μ l substrata. Po 10 minutah na sobni temperaturi smo dodali v vse jamice po 100 μ l »stop« raztopine in izmerili vrednost OD na spektrofotometru pri valovni dolžini 450 nm.

Ker smo kontrolne serume analizirali v duplikatih, smo njihov OD izračunali kot aritmetično sredino OD vrednosti v obeh jamicah.

Za vsak vzorec smo izračunali »cut off« vrednost:

Negativna »cut off« = 0,45 x OD negativne kontrole

Pozitivna »cut off« = 0,40 x OD negativne kontrole

Po navodilu proizvajalca testa smo šteli kot pozitivne na protitelesa proti *M. hyopneumoniae* tiste vzorce, pri katerih je bil OD enak ali nižji kot pozitivna »cut off« in kot negativne tiste vzorce, pri katerih je bil OD enak ali višji kot negativna »cut off«.

3.2.5.1.4. Encimskoimunski test (ELISA) INGEZIM PRRS UNIVERSAL (Ingenasa, Španija)

ELISA INGEZIM PRRS UNIVERSAL (Ingenasa, Španija) je indirektna ELISA za ugotavljanje specifičnih protiteles proti ameriškim in evropskim sevom PRRSV.

Princip testa:

Na polistirensko mikroploščo je vezan antigen (očiščen antigen, dobljen z izražanjem ORF7 iz ameriških in evropskih sevov PRRSV v *Escherichia coli*). Če so v serumu specifična protitelesa proti virusu, se bodo vezala na antigen, če pa jih v serumu ni, do vezave ne bo prišlo. Ko dodamo specifičen peroksidazen konjugat, se ta veže na specifična protitelesa iz seruma. Če serum ne vsebuje specifičnih protiteles, se konjugat nanje ne bo vezal in se bo s spiranjem odstranil. Prisotnost oziroma odsotnost konjugata lahko zaznamo s pomočjo specifičnega substrata, ki v prisotnosti peroksidaze razvije kolorimetrično reakcijo. Obarvanje, ki se pojavi, kaže na prisotnost protiteles proti virusu (pozitivna reakcija), odsotnost obarvanja pa na odsotnost specifičnih protiteles v serumu (negativna reakcija).

Opis postopka:

Najprej smo pripravili raztopino za spiranje tako, da smo enemu delu koncentrirane raztopine za spiranje dodali 24 delov destilirane vode.

Na mikroploščo, kjer je vezan antigen, smo dodali v dve jamici po 100 µl pozitivnega kontrolnega seruma in v dve jamici po 100 µl negativnega kontrolnega seruma. V ostale jamice smo nanесли po 100 µl seruma v razredčini 1:100 (5 µl seruma in 0,5 ml razredčevalca seruma DE01-01). Mikroploščo smo inkubirali 1 uro v termostatu pri 37 °C in jo nato 4-krat sprali z raztopino za spiranje. V vse jamice smo nanесли 100 µl konjugata, ki smo ga pred uporabo z razredčevalcem DE13-01 redčili 1:100 in inkubirali 45 minut pri sobni temperaturi. Mikroploščo smo 5-krat sprali in v vse jamice dodali 100 µl substrata, ki smo ga pripravili tako, da smo 1 del substrata zmešali z 9 deli substratovega pufra. Po 15 minutah na sobni temperaturi smo dodali v vse jamice po 100 µl »stop« raztopine in izmerili vrednost OD na spektrofotometru pri valovni dolžini 405 nm.

Ker smo kontrolne serume analizirali v duplikatih, smo njihov OD izračunali kot aritmetično sredino OD vrednosti v obeh jamicah.

Za vsak vzorec smo izračunali »cut off« vrednost:

0,15 x OD pozitivne kontrole

Po navodilu proizvajalca testa smo šteli kot pozitivne na protitelesa proti PRRS tiste vzorce, pri katerih je bil OD višji kot »cut off« in kot negativne tiste vzorce, pri katerih je bil OD enak ali nižji kot »cut off«.

3.2.5.1.5. *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) Antibody Test Kit CHEKIT* APP-ApxIV (IDEXX laboratories, Švica)

Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) Antibody Test Kit CHEKIT* APP-ApxIV (IDEXX laboratories, Švica) je hitra, enostavna, občutljiva in specifična metoda za ugotavljanje protiteles proti vsem serotipom *A. pleuropneumoniae* v prašičjem serumu in plazmi. Test lahko loči vakcinirane (negativen rezultat testa) od okuženih živali (pozitiven rezultat testa).

Princip testa:

Jamice mikrotitrskih plošč so prevlečena z rekombinantnim bakterijskim antigenom ApxIV. Protitelesa specifična za ApxIV se vežejo na antigen v jamicah mikroplošče. S spiranjem se odstrani nevezan material. Doda se s peroksidazo označen antiprašičji IgG konjugat, ki se veže na protitelesa specifična za ApxIV. Nevezan konjugat se odstrani s spiranjem in doda

substrat. Intenzivnost obarvanja (optična gostota) je odvisna od količine protiteles specifičnih za ApxIV, ki se nahajajo v serumu.

Opis postopka:

Najprej smo pripravili raztopino za spiranje (CHEKIT-Wash Solution) tako, da smo enemu delu koncentrirane raztopine za spiranje dodali 9 delov destilirane vode.

Na mikroploščo smo v dve jamici nanesti po 100 µl pozitivnega kontrolnega seruma in v dve jamici po 100 µl negativnega kontrolnega seruma. V ostale jamice smo nanesti po 100 µl seruma. Kontrolne serume in vzorce smo redčili 1:10 (15 µl seruma in 135 µl razredčevalca (CHEKIT-APP-ApxIV sample diluent)). Pokrito mikroploščo smo inkubirali 1 uro v termostatu pri 37 °C in jo nato 3-krat sprali z raztopino za spiranje. V vse jamice smo nanesti 100 µl konjugata (CHEKIT-APP-ApxIV-Anti-Swine-IgG-PO-conjugate) in pokrito mikroploščo inkubirali 1 uro v termostatu pri 37 °C. Mikroploščo smo 3-krat sprali in v vse jamice dodali 100 µl substrata. Po 15 minutah na sobni temperaturi smo dodali v vse jamice po 100 µl »stop« raztopine (CHEKIT-Stop-Solution-TMB) in izmerili vrednost OD na spektrofotometru pri valovni dolžini 450 nm.

Ker smo kontrolne serume analizirali v duplikatih, smo njihov OD izračunali kot aritmetično sredino OD vrednosti v obeh jamicah.

Vzorci smo ovrednotili po formuli:

$$\text{Vrednost (\%)} = \frac{\text{OD vzorca} - \text{OD negativne kontrole}}{\text{OD pozitivne kontrole} - \text{OD negativne kontrole}} \times 100$$

Po navodilu proizvajalca testa smo šteli kot pozitivne na protitelesa proti vsem serotipom *A. pleuropneumoniae* tiste vzorce, pri katerih je bila vrednost enaka ali višja kot 40 %. Vzorce, katerih vrednost je bila nižja od 30 %, smo šteli za negativne.

3.2.5.1.6. *Haemophilus parasuis* Antibody Test Kit (ELISA) Swinecheck® HPS (Biovet Inc., Kanada)

Haemophilus parasuis Antibody Test Kit (ELISA) Swinecheck® HPS je ELISA za ugotavljanje specifičnih protiteles proti *H. parasuis* (HPS) v prašičjem serumu.

Princip testa:

Vzorci prašičjih serumov in kontrole se redči in se jih nanese v jamice mikroplošče, kjer je vezan antigen (HPS) (lihi stolpec) in v jamice, kjer je vezan celični lizat, ki služi kot negativna kontrola (sodi stolpec). Specifična protitelesa proti HPS v serumu se bodo vezala na antigen. Po spiranju se doda konjugat proti prašičjim imunoglobulinom (konjugirana s peroksidazo). Po inkubaciji in spiranju se doda substrat. Če je encim prisoten, reagira s substratom in razvije se zeleno obarvanje. Pri negativnih vzorcih bo obarvanje šibko (bledo zeleno), pri pozitivnih vzorcih pa močno zeleno.

Opis postopka:

Najprej smo razredčili 10-kratno koncentrirano raztopino za spiranje (npr. 50 ml koncentrirane raztopine za spiranje in 450 ml destilirane vode). Vzorce in kontrolne serume smo testirali kot duplikate. Vzorce smo redčili v razmerju 1:50 z razredčeno raztopino za spiranje. Mikroplošča je bila sestavljena iz stripov z antigenom (Ag) HPS (lihi stolpec) in iz stripov brez antigena (sodi stolpec) – celični lizat, ki služi kot negativna kontrola. V luknjico z antigenom in v luknjico brez antigena smo napipetirali po 100 µl pozitivne kontrole, po 100 µl negativne kontrole in po 100 µl vzorca. Nato smo inkubirali na temperaturi 23 ± 2 °C za 20 minut. Mikroploščo smo 4-krat sprali z raztopino za spiranje. V vse jamice smo nanесли 100 µl konjugata, ki smo ga pred uporabo z raztopino za spiranje redčili 1:1200 in inkubirali na temperaturi 23 ± 2 °C za 20 minut. Mikroploščo smo ponovno 4-krat sprali z raztopino za spiranje in v vse jamice dodali 100 µl substrata. Po inkubaciji v temi na temperaturi 23 ± 2 °C 20 minut smo dodali v vse jamice po 100 µl »stop« raztopine in izmerili vrednost OD na spektrofotometru pri valovni dolžini 405 nm.

Vzorci smo ovrednotili po formuli:

$$\text{RAZMERJE} = \frac{\text{OD vzorca (Ag)} - \text{OD vzorca (brez Ag)}}{\text{OD pozitivna kontrola (Ag)} - \text{OD pozitivna kontrola (brez Ag)}}$$

Po navodilu proizvajalca testa smo šteli kot negativne na protitelesa proti HPS vzorce, ki imajo razmerje nižje kot 0,6. Vzorce, ki so imeli razmerje enako ali večje kot 0,9, smo šteli za pozitivne.

3.2.5.1.7. ELISA INGEZIM CORONA DIFERENCIAL 2.0 (Ingenasa, Španija)

ELISA Ingezim Corona Diferencial 2.0 (Ingenasa, Španija) je bloking ELISA za ugotavljanje in razločevanje protiteles proti virusu TGE in proti PRCV.

Princip testa:

S pomočjo monoklonskih protiteles je v jamicah mikroplošče vezan TGE virusni rekombinantni antigen. Preiskovani serum se napipetira v dve jamici. Po inkubaciji se doda v eno jamico specifična monoklonska protitelesa (konjugat A) proti skupnemu epitopu obeh korona virusov (TGEV in PRCV). Če serum vsebuje protitelesa proti enemu od korona virusov, se bodo vezala na ploščo, medtem ko se konjugat A ne bo. Če serum ne vsebuje specifičnih protiteles, se bo vezal konjugat A. V drugo jamico dodamo specifična monoklonska protitelesa (konjugat B) proti specifičnemu epitopu TGEV. Če so v serumu prisotna protitelesa proti TGEV, se konjugat B ne bo vezal na antigen. Po spiranju lahko dokažemo prisotnost oziroma odsotnost označenih monoklonskih protiteles z dodatkom substrata, ki v prisotnosti peroksidaze razvije barvno reakcijo. S pomočjo različnih kombinacij rezultatov v obeh jamicah lahko določimo, ali preiskovani serum vsebuje protitelesa proti TGEV ali proti PRCV, ali pa ne vsebuje protiteles proti virusoma.

Opis postopka:

Najprej smo pripravili raztopino za spiranje tako, da smo enemu delu koncentrirane raztopine za spiranje dodali 24 delov destilirane vode.

V 4 jamice smo napipetirali negativno kontrolo. V dve jamici (lihi in sodi stolpec) smo napipetirali pozitivno PRCV kontrolo, pozitivno TGE kontrolo in preiskovane serume tako, da smo najprej napipetirali 50 µl razredčevalca (DE17-01) in 50 µl seruma (kontrolne in vzorce). Pokrito ploščo smo inkubirali 1 uro v termostatu pri 37° C. Mikroploščo smo 3-krat sprali z raztopino za spiranje. Nanesli smo 100 µl konjugata A (TGEV + PRCV) v lihi stolpec in 100 µl konjugata B (TGEV) v sodi stolpec. Pokrito ploščo smo inkubirali 30 minut v termostatu pri 37° C. Mikroploščo smo 6-krat sprali z raztopino za spiranje in v vse jamice dodali 100 µl substrata. Po 10 minutni inkubaciji v temi smo dodali v vse jamice po 100 µl »stop« raztopine in izmerili vrednost OD na spektrofotometru pri valovni dolžini 450 nm.

Vzorci smo ovrednotili po navodilih proizvajalca:

1. Pozitivna/negativna CUT OFF za prašičji koronavirus

CUT OFF (1) = 60 % OD (negativne kontrole) v jamicah, kjer je konjugat A

2. Pozitivna CUT OFF za TGEV

CUT OFF (2) = 60 % OD (pozitivne PRCV kontrole) v jamicah, kjer je konjugat B

3. Negativna CUT OFF za TGEV

CUT OFF (3) = 70 % OD (pozitivne PRCV kontrole) v jamicah, kjer je konjugat B

Najprej smo preverili prisotnost ali odsotnost protiteles proti prašičjemu koronavirusu (PRCV ali TGEV): upoštevali smo samo vrednosti v jamicah s konjugatom A. Vzorci, ki so imeli OD višji kot CUT OFF 1, so bili negativni na protitelesa proti kateremu koli prašičjem koronavirusu (PRCV ali TGEV). Vzorci, ki so imeli OD nižji kot CUT OFF 1 so bili pozitivni na prašičji koronavirus (PRCV ali TGEV). V tem primeru smo nadaljevali z interpretacijo rezultatov, kjer smo upoštevali samo vrednosti v jamicah s konjugatom B. Vzorci, ki so imeli OD nižji kot CUT OFF 2 so bili pozitivni na specifična TGEV protitelesa. Vzorci z OD vrednostmi višjimi kot CUT OFF 3 so bili negativni na specifična TGEV protitelesa, vendar pozitivni na specifična PRCV protitelesa.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati preiskav serumov plemenskih svinj

Pri plemenskih svinjah je bila seroprevalenca proti VPI, APP in PRCV 100 %, proti PCV2 94 %, proti *M. hyopneumoniae* 83,3 % in proti *H. parasuis* 36 %. Protiteles proti PRRSV nismo dokazali (tabela 2).

Tabela 2. Rezultati preiskav serumov plemenskih svinj.

Kategorija	Število živali	APP	HP	VPI	<i>M.hyo</i>	PCV2	PRCV	PRRSV
		Št.poz./%	Št.poz./%	Št.poz./%	Št.poz./%	Št.poz./%	Št.poz./%	Št.poz./%
Pl. svinje	36	36 / 100	13 / 36	36 / 100	30 / 83,3	34 / 94	36 / 100	0/0

4.2. Rezultati preiskav serumov pujskov pri 9 odvzemih

4.2.1. Tabelarni in grafični prikaz seroloških profilov za posamezne povzročitelje PRDC

4.2.1.1. Tabelarni in grafični prikaz serološkega profila za *A. pleuropneumoniae* (APP)

Seroprevalenca pri pujskih je bila 2. in 4. teden starosti 100 %, 6. in 8. teden se je znižala na 97,4 %, 11. teden je padla na 60,5 % in bila najnižja 14. teden (50 %). V 17. tednu je narasla na 84,2 % in bila 22. in 28. teden starosti ponovno 100 %.

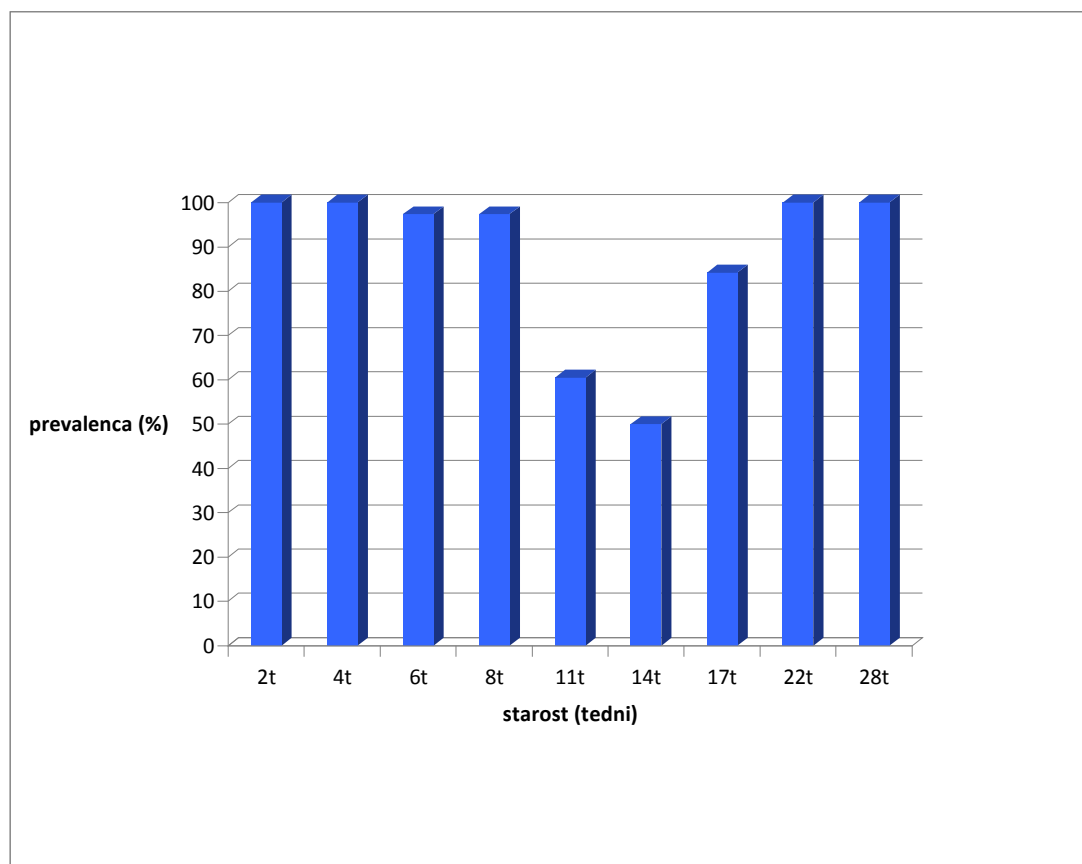
Tabela 3. Rezultati preiskav serumov posameznih pujskov od 2. tedna do 28. tedna starosti (1. do 9. odvzem) na protitelesa proti APP

Oznaka prašiča	Starost (odvzem)								
	2 t- 1. odv.	4 t- 2. odv.	6 t- 3. odv.	8 t- 4. odv.	11 t- 5. odv.	14 t- 6. odv.	17 t- 7. odv.	22 t- 8. odv.	28 t- 9. odv.
555	+	+	+	+	+	+	+	+	+
633	+	+	+	+	-	-	+	+	+
611	+	+	+	+	+	+	+	+	+
580	+	+	+	+	+	+	+	+	+
663	+	+	+	+	-	-	-	+	+
571	+	+	+	+	-	+	+	+	+
582	+	+	+	+	+	+	+	+	+
603	+	+	+	+	-	-	-	+	+
556	+	+	+	+	+	+	+	+	+
601	+	+	+	+	+	-	+	+	+
632	+	+	+	+	-	-	+	+	+
508	+	+	+	+	+	-	-	+	+
614	+	+	+	+	+	+	+	+	+
615	+	+	+	-	+	+	+	+	+
532	+	+	+	+	+	+	+	+	+
503	+	+	+	+	+	+	+	+	+
630	+	+	+	+	-	-	+	+	+
547	+	+	+	+	+	-	-	+	+
747	+	+	+	+	+	+	+	+	+
516	+	+	+	+	+	-	-	+	+
558	+	+	+	+	+	+	+	+	+
575	+	+	+	+	+	+	+	+	+
710	+	+	+	+	-	-	+	+	+
525	+	+	-	+	-	-	+	+	+
568	+	+	+	+	+	-	+	+	+
565	+	+	+	+	-	+	+	+	+
577	+	+	+	+	+	+	+	+	+
583	+	+	+	+	+	+	+	+	+
631	+	+	+	+	-	+	+	+	+
664	+	+	+	+	-	-	+	+	+
561	+	+	+	+	-	+	+	+	+
573	+	+	+	+	+	-	+	+	+
557	+	+	+	+	-	+	+	+	+
521	+	+	+	+	-	-	-	+	+
625	+	+	+	+	+	-	+	+	+
609	+	+	+	+	+	+	+	+	+
584	+	+	+	+	+	-	+	+	+
560	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Število poz.(+)/%	38/100	38/100	37/97,4	37/97,4	23/60,5	19/50,0	32/84,2	38/100	38/100

(+) = pozitiven rezultat, (-) = negativen rezultat

(t) = teden, (odv.) = odvzem

Graf 1. Serološki profil za APP



Pri APP je bila signifikantna razlika med seroprevalencami med 8. in 11. tednom starosti in med 14. in 17. tednom starosti ($p < 0,05$).

4.2.1.2. Tabelarni in grafični prikaz serološkega profila za *H. parasuis*

Seroprevalenca pri pujskih je bila v 2. tednu starosti le 5,2 % in je nato v 4., 6. in 8. tednu padla na 0 %. Seroprevalenca je pri 11 tednov starih pujskih narasla na 26,3 %, pri 14 tednov starih na 63,1 %, pri 17 tednov starih na 65,7 % in pri 22 ter 28 tednov starih prašičih na 94,7 %.

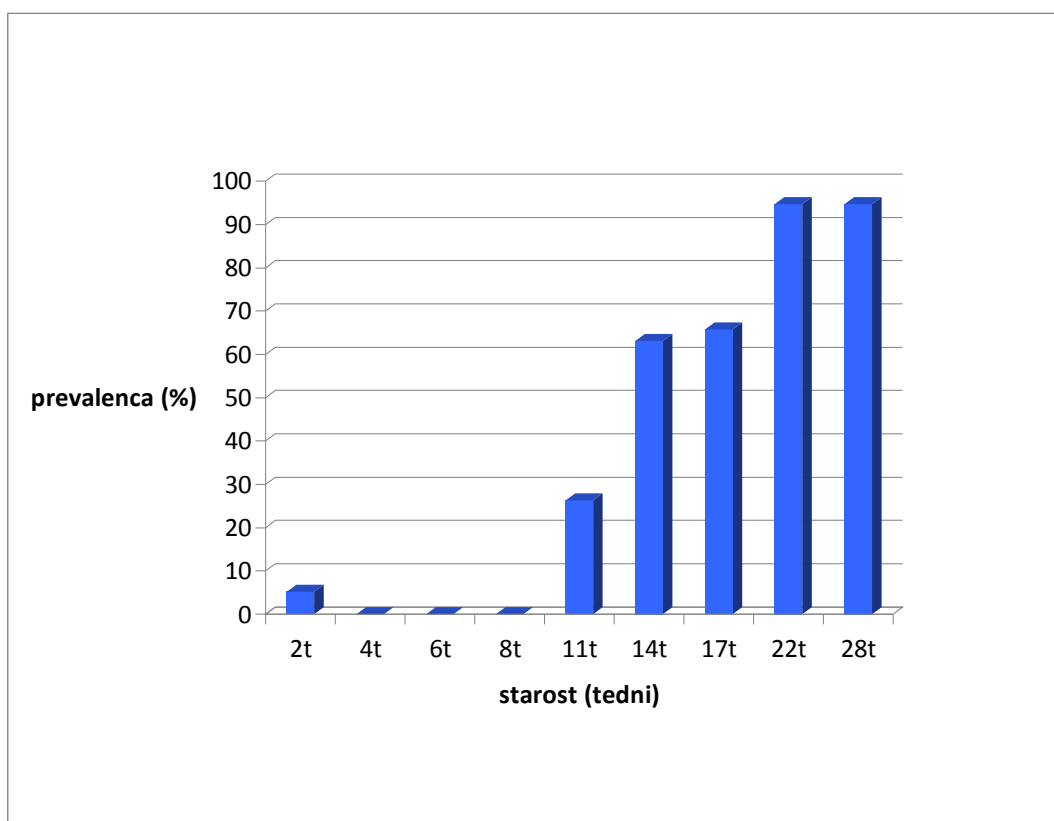
Tabela 4. Rezultati preiskav serumov posameznih pujskov od 2. tedna do 28. tedna starosti (1. do 9. odvzem) na protitelesa proti *H. parasuis*

Oznaka prašiča	Starost (odvzem)								
	2t- 1. odv.	4t- 2. odv.	6t- 3. odv.	8t- 4. odv.	11t- 5. odv.	14t- 6. odv.	17t- 7. odv.	22t- 8. odv.	28t- 9. odv.
555	-	-	-	-	+	+	+	+	+
633	-	-	-	-	-	+	+	+	+
611	-	-	-	-	+	+	+	+	+
580	-	-	-	-	+	+	+	+	+
663	-	-	-	-	-	-	-	-	+
571	-	-	-	-	-	+	+	+	-
582	-	-	-	-	-	-	-	+	+
603	-	-	-	-	-	-	-	-	-
556	-	-	-	-	+	+	+	+	+
601	-	-	-	-	-	+	+	+	+
632	-	-	-	-	-	+	+	+	+
508	-	-	-	-	-	+	+	+	+
614	-	-	-	-	-	+	+	+	+
615	-	-	-	-	-	+	+	+	+
532	-	-	-	-	-	-	-	+	+
503	-	-	-	-	+	+	+	+	+
630	-	-	-	-	-	-	+	+	+
547	-	-	-	-	-	-	-	+	+
747	-	-	-	-	-	-	-	+	+
516	-	-	-	-	+	+	+	+	+
558	+	-	-	-	+	+	+	+	+
575	-	-	-	-	-	+	+	+	+
710	-	-	-	-	-	-	-	+	+
525	-	-	-	-	+	+	+	+	+
568	-	-	-	-	-	-	-	+	+
565	-	-	-	-	-	-	-	+	+
577	-	-	-	-	-	-	-	+	+
583	-	-	-	-	-	+	+	+	+
631	-	-	-	-	-	-	-	+	+
664	-	-	-	-	+	+	+	+	+
561	-	-	-	-	-	+	+	+	+
573	-	-	-	-	-	+	+	+	+
557	-	-	-	-	+	+	+	+	+
521	+	-	-	-	-	+	+	+	+
625	-	-	-	-	-	-	-	+	+
609	-	-	-	-	-	+	+	+	+
584	-	-	-	-	-	+	+	+	+
560	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Število poz.(+)/%	2/5,2	0/0	0/0	0/0	10/26,3	24/63,1	25/65,7	36/94,7	36/94,7

(+) = pozitiven rezultat, (-) = negativen rezultat

(t) = teden, (odv.) = odvzem

Graf 2. Serološki profil za *H. parasuis*



Pri *H. parasuis* je bila signifikantna razlika med seroprevalencami med 8. in 11. tednom starosti, med 11. in 14. tednom starosti in med 14. in 17. tednom starosti ($p < 0,05$).

4.2.1.3. Tabelarni in grafični prikaz serološkega profila za virus PI

Seroprevalenca proti virusu PI je bila v 2. tednu starosti 100 %, v 4. in 17. tednu starosti 94,7 %. Seroprevalenca je bila najnižja v 6. tednu starosti (81,5 %), najvišja (100 %) pa v 8., 11., 14., 22. in 28. tednu starosti.

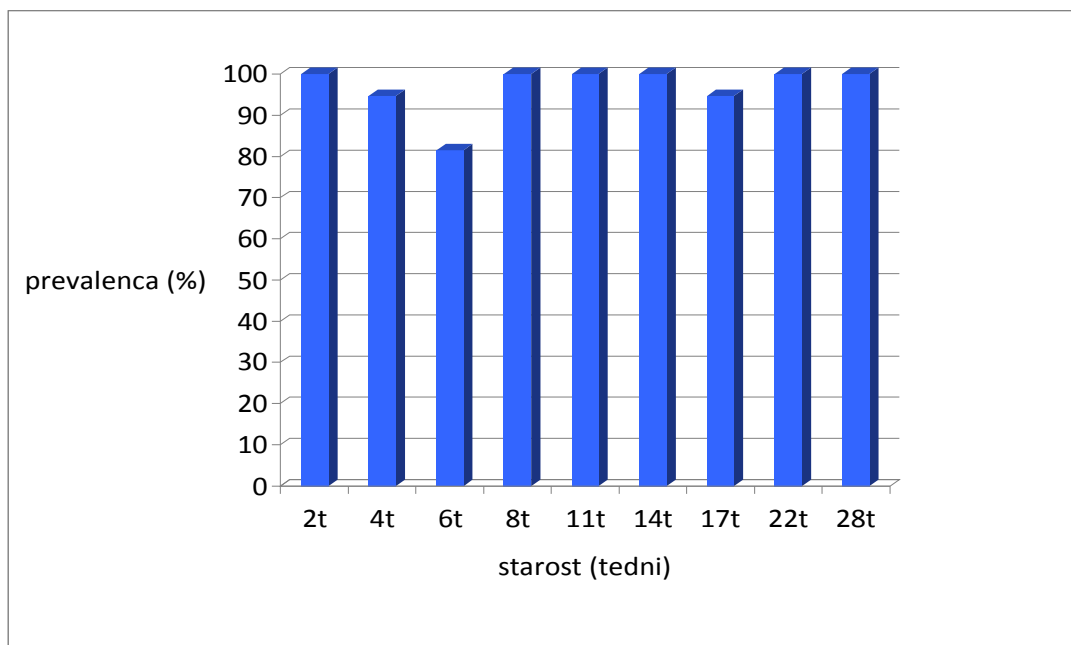
Tabela 5. Rezultati preiskav serumov posameznih pujskov od 2. tedna do 28. tedna starosti (1. do 9. odvzem) na protitelesa proti virusu PI

Oznaka prašiča	Starost (odvzem)								
	2t- 1. odv.	4t- 2. odv.	6t- 3. odv.	8t- 4. odv.	11t- 5. odv.	14t- 6. odv.	17t- 7. odv.	22t- 8. odv.	28t- 9. odv.
555	+	+	+	+	+	+	+	+	+
633	+	+	-	+	+	+	+	+	+
611	+	+	+	+	+	+	+	+	+
580	+	+	+	+	+	+	+	+	+
663	+	+	+	+	+	+	+	+	+
571	+	+	+	+	+	+	-	+	+
582	+	+	-	+	+	+	+	+	+
603	+	+	+	+	+	+	+	+	+
556	+	+	+	+	+	+	+	+	+
601	+	+	+	+	+	+	+	+	+
632	+	+	+	+	+	+	+	+	+
508	+	+	+	+	+	+	+	+	+
614	+	+	+	+	+	+	+	+	+
615	+	+	+	+	+	+	+	+	+
532	+	+	+	+	+	+	+	+	+
503	+	+	+	+	+	+	+	+	+
630	+	+	-	+	+	+	+	+	+
547	+	+	+	+	+	+	+	+	+
747	+	-	-	+	+	+	+	+	+
516	+	+	-	+	+	+	+	+	+
558	+	+	+	+	+	+	+	+	+
575	+	+	+	+	+	+	+	+	+
710	+	-	+	+	+	+	+	+	+
525	+	+	+	+	+	+	+	+	+
568	+	+	+	+	+	+	+	+	+
565	+	+	+	+	+	+	+	+	+
577	+	+	+	+	+	+	+	+	+
583	+	+	+	+	+	+	+	+	+
631	+	+	-	+	+	+	+	+	+
664	+	+	-	+	+	+	+	+	+
561	+	+	+	+	+	+	+	+	+
573	+	+	+	+	+	+	+	+	+
557	+	+	+	+	+	+	+	+	+
521	+	+	+	+	+	+	-	+	+
625	+	+	+	+	+	+	+	+	+
609	+	+	+	+	+	+	+	+	+
584	+	+	+	+	+	+	+	+	+
560	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Število poz.(+)/%	38/100	36/94,7	31/81,5	38/100	38/100	38/100	36/94,7	38/100	38/100

(+) = pozitiven rezultat, (-) = negativen rezultat

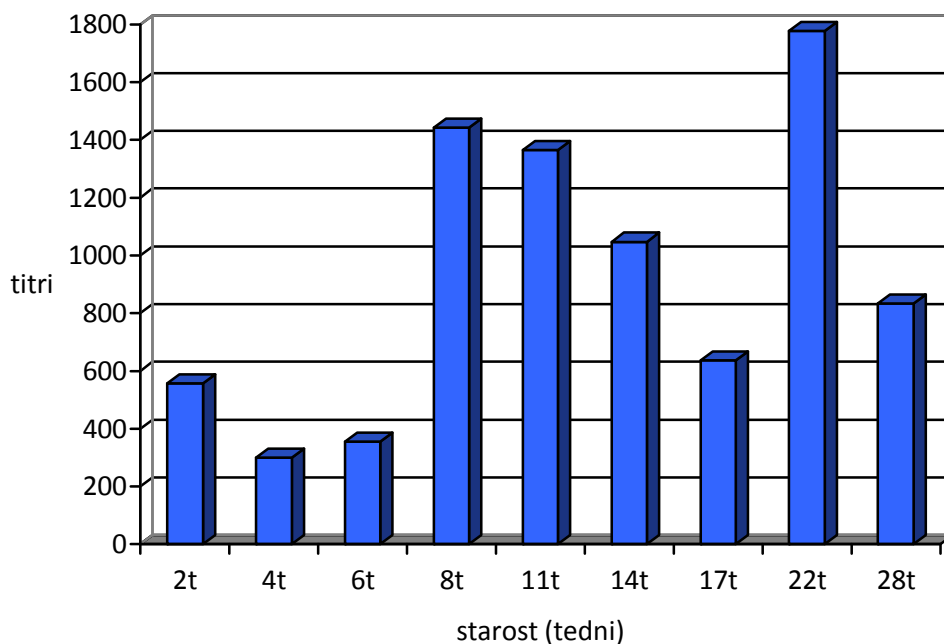
(t) = teden, (odv.) = odvzem

Graf 3. Serološki profil za virus PI



Najnižji titer protiteles smo zasledili med 4. in 6. tednom starosti. Najvišji titer protiteles so dosegli v 8. tednu starosti; titer je nato postopoma začel padati vse do 17. tedna starosti.

Graf 4. Serološki profil za virus PI glede na izračunane titre pri testu ELISA



Pri virusu PI je bila signifikantna razlika med seroprevalencami samo med 6. in 8. tednom starosti ($p < 0,05$).

4.2.1.4. Tabelarni in grafični prikaz serološkega profila za *M. hyopneumoniae*

Seroprevalenca je bila v 2. tednu starosti 31,5 % in bila najnižja (0 %) v 6. in 8. tednu starosti. Seroprevalenca je bila v 11. tednu 2,6 % in se je nato s starostjo višala; v 28. tednu je bila 86,8 %.

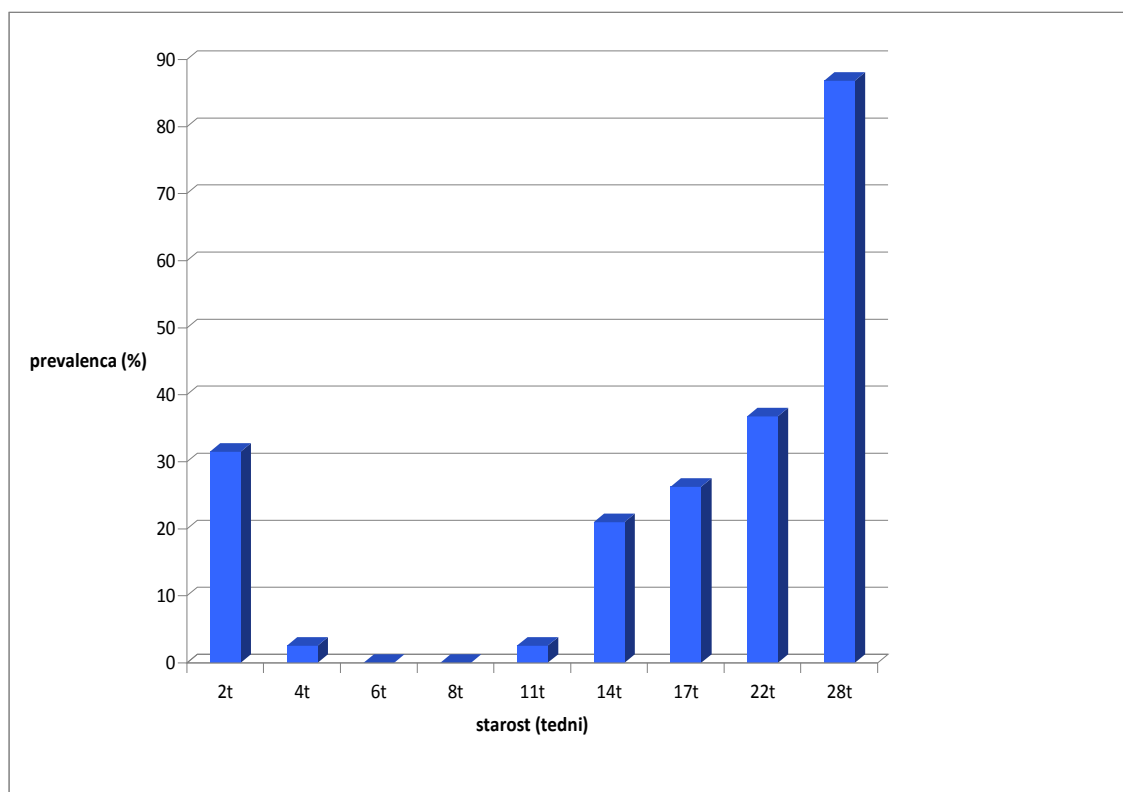
Tabela 6. Rezultati preiskav serumov posameznih pujskov od 2. tedna do 28. tedna starosti (1. do 9. odvzem) na protitelesa proti *M. hyopneumoniae*

Oznaka prašiča	Starost (odvzem)								
	2t- 1. odv.	4t- 2. odv.	6t- 3. odv.	8t- 4. odv.	11t- 5. odv.	14t- 6. odv.	17t- 7. odv.	22t- 8. odv.	28t- 9. odv.
555	-	-	-	-	-	-	-	-	+
633	-	-	-	-	-	-	-	-	-
611	+	-	-	-	-	-	-	-	-
580	+	-	-	-	-	-	-	-	-
663	+	-	-	-	-	-	-	-	+
571	-	-	-	-	+	+	+	+	+
582	-	-	-	-	-	-	-	-	+
603	-	-	-	-	-	-	+	+	+
556	-	-	-	-	-	+	+	+	+
601	-	-	-	-	-	+	+	+	+
632	-	-	-	-	-	-	-	-	+
508	+	-	-	-	-	+	+	+	+
614	-	-	-	-	-	-	-	-	+
615	-	-	-	-	-	-	-	-	+
532	-	-	-	-	-	+	+	+	+
503	-	-	-	-	-	-	-	+	+
630	-	-	-	-	-	-	-	-	+
547	-	-	-	-	-	-	-	-	-
747	-	-	-	-	-	-	-	+	+
516	+	+	-	-	-	-	-	-	+
558	-	-	-	-	-	+	+	+	+
575	+	-	-	-	-	-	-	-	+
710	-	-	-	-	-	-	+	+	+
525	-	-	-	-	-	-	-	-	+
568	-	-	-	-	-	-	-	+	+
565	-	-	-	-	-	-	-	-	+
577	+	-	-	-	-	-	-	-	+
583	+	-	-	-	-	-	-	-	+
631	+	-	-	-	-	-	-	-	+
664	+	-	-	-	-	-	-	-	+
561	-	-	-	-	-	+	+	+	+
573	-	-	-	-	-	-	-	-	+
557	-	-	-	-	-	+	+	+	+
521	-	-	-	-	-	-	-	-	-
625	+	-	-	-	-	-	-	-	+
609	-	-	-	-	-	-	-	+	+
584	+	-	-	-	-	-	-	-	+
560	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Število poz.(+)/%	12/31,5	1/2,6	0/0	0/0	1/2,6	8/21,0	10/26,3	14/36,8	33/86,8

(+) = pozitiven rezultat, (-) = negativen rezultat

(t) = teden, (odv.) = odvzem

Graf 5. Serološki profil za *M. hyopneumoniae*



Pri *M. hyopneumoniae* je bila signifikantna razlika med seroprevalencami ugotovljena med 2. in 4. tednom, med 11. in 14. tednom ter med 22. in 28. tednom starosti ($p < 0,05$).

4.2.1.5. Tabelarni in grafični prikaz serološkega profila za PCV2

Seroprevalenca je bila v 2. tednu starosti 84,2 %, v 4. tednu starosti je padla na 71 % in bila najnižja v 6. tednu starosti (50 %). Seroprevalenca je ponovno narasla v 8. tednu starosti na 86,8 %, v 14., 17., 22. in 28. tednu pa na 100 %.

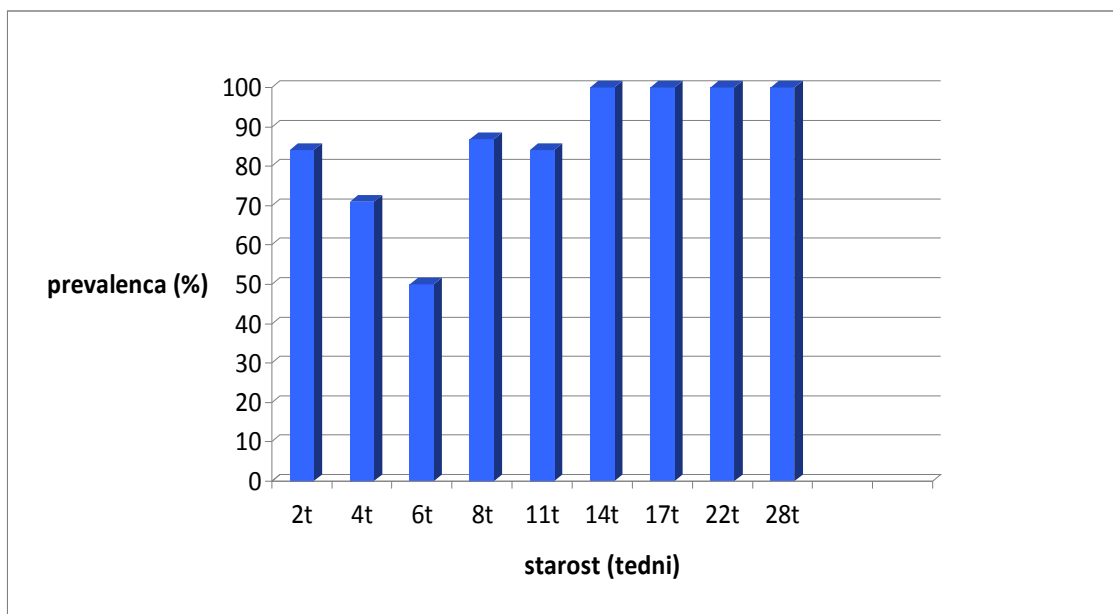
Tabela 7. Rezultati preiskav serumov posameznih pujskov od 2. tedna do 28. tedna starosti (1. do 9. odvzem) na protitelesa proti PCV2

Oznaka prašiča	Starost (odvzem)								
	2t- 1. odv.	4t- 2. odv.	6t- 3. odv.	8t- 4. odv.	11t- 5. odv.	14t- 6. odv.	17t- 7. odv.	22t- 8. odv.	28t- 9. odv.
555	-	-	-	+	+	+	+	+	+
633	+	+	-	+	+	+	+	+	+
611	+	+	-	+	+	+	+	+	+
580	-	-	-	-	+	+	+	+	+
663	+	+	+	+	-	+	+	+	+
571	+	+	+	+	+	+	+	+	+
582	-	-	-	-	+	+	+	+	+
603	+	+	+	+	+	+	+	+	+
556	+	+	+	+	-	+	+	+	+
601	+	+	+	+	+	+	+	+	+
632	+	+	+	+	+	+	+	+	+
508	+	-	-	+	+	+	+	+	+
614	+	-	-	+	+	+	+	+	+
615	+	+	-	+	+	+	+	+	+
532	+	+	+	+	+	+	+	+	+
503	+	-	-	+	+	+	+	+	+
630	+	+	+	+	+	+	+	+	+
547	+	+	+	+	-	+	+	+	+
747	+	+	+	+	-	+	+	+	+
516	+	+	+	+	+	+	+	+	+
558	+	+	+	+	+	+	+	+	+
575	+	+	-	+	+	+	+	+	+
710	+	-	-	-	+	+	+	+	+
525	+	+	-	-	+	+	+	+	+
568	+	+	+	+	+	+	+	+	+
565	+	+	+	+	+	+	+	+	+
577	-	-	-	+	+	+	+	+	+
583	+	+	-	+	+	+	+	+	+
631	+	+	+	+	+	+	+	+	+
664	+	+	-	+	+	+	+	+	+
561	+	+	+	+	+	+	+	+	+
573	-	-	-	+	+	+	+	+	+
557	+	+	+	-	-	+	+	+	+
521	+	-	-	+	+	+	+	+	+
625	+	+	+	+	+	+	+	+	+
609	+	+	+	+	-	+	+	+	+
584	-	-	-	-	+	+	+	+	+
560	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Število poz.(+)/%	32 / 84,2	27 / 71,0	19 / 50,0	33 / 86,8	32 / 84,2	38 / 100	38 / 100	38 / 100	38 / 100

(+) = pozitiven rezultat, (-) = negativen rezultat

(t) = teden, (odv.) = odvzem

Graf 6. Serološki profil za PCV2



Pri PCV2 je bila signifikantna razlika med seroprevalencami ugotovljena med 4. in 6. tednom in med 6. in 8. tednom starosti ($p < 0,05$).

4.2.1.6. Tabelarni in grafični prikaz serološkega profila za PRCV

Seroprevalenca je bila v 4., 11. in 14. tednu starosti 97,3 %, pri vseh ostalih odvzemih pa 100 %.

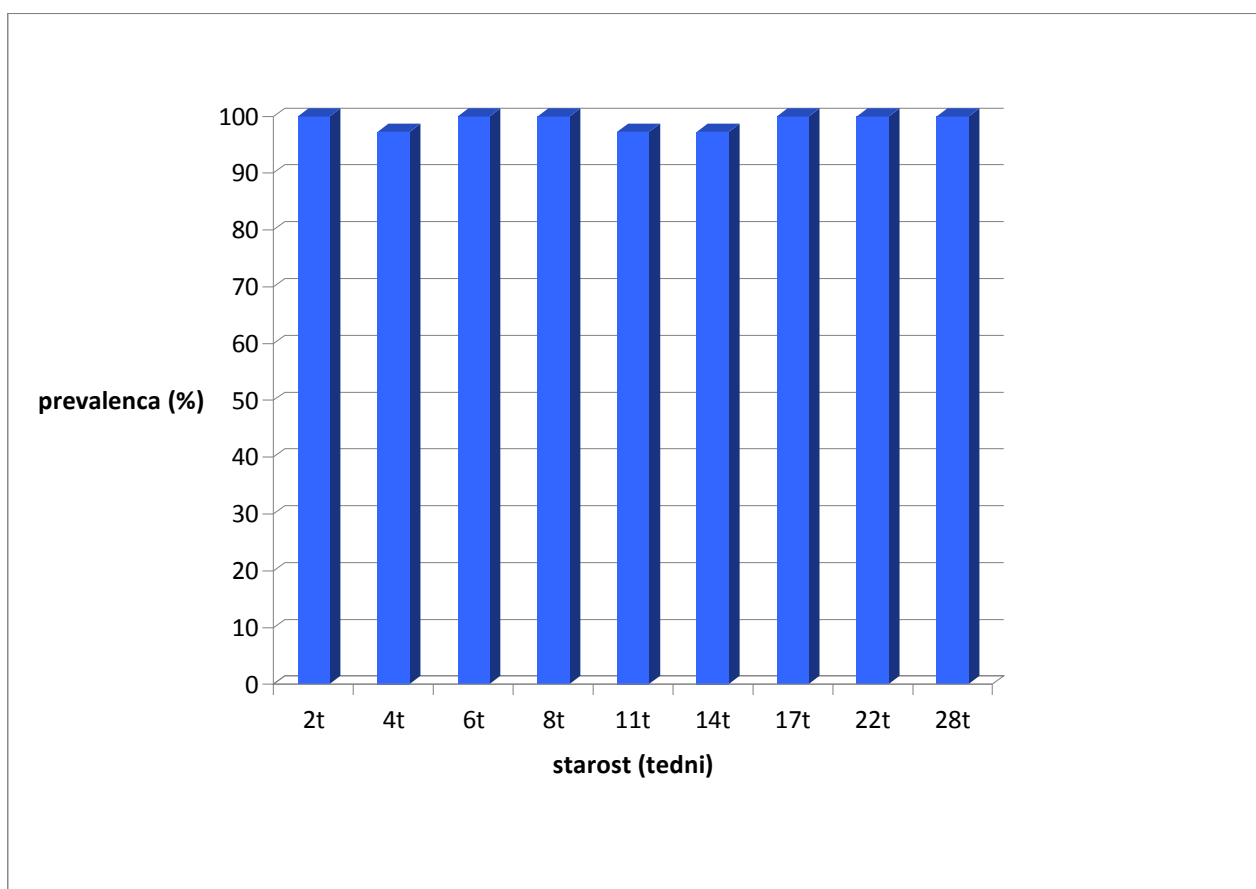
Tabela 8. Rezultati preiskav serumov posameznih pujskov od 2. tedna do 28. tedna starosti (1. do 9. odvzem) na protitelesa proti PRCV

Oznaka prašiča	Starost (odvzem)								
	2t- 1. odv.	4t- 2. odv.	6t- 3. odv.	8t- 4. odv.	11t- 5. odv.	14t- 6. odv.	17t- 7. odv.	22t- 8. odv.	28t- 9. odv.
555	+	+	+	+	+	+	+	+	+
633	+	+	+	+	+	+	+	+	+
611	+	+	+	+	+	+	+	+	+
580	+	+	+	+	+	+	+	+	+
663	+	+	+	+	-	+	+	+	+
571	+	+	+	+	+	+	+	+	+
582	+	+	+	+	+	+	+	+	+
603	+	+	+	+	+	-	+	+	+
556	+	+	+	+	+	+	+	+	+
601	+	+	+	+	+	+	+	+	+
632	+	+	+	+	+	+	+	+	+
508	+	+	+	+	+	+	+	+	+
614	+	+	+	+	+	+	+	+	+
615	+	+	+	+	+	+	+	+	+
532	+	+	+	+	+	+	+	+	+
503	+	+	+	+	+	+	+	+	+
630	+	+	+	+	+	+	+	+	+
547	+	+	+	+	+	+	+	+	+
747	+	+	+	+	+	+	+	+	+
516	+	+	+	+	+	+	+	+	+
558	+	+	+	+	+	+	+	+	+
575	+	+	+	+	+	+	+	+	+
710	+	+	+	+	+	+	+	+	+
525	+	+	+	+	+	+	+	+	+
568	+	+	+	+	+	+	+	+	+
565	+	+	+	+	+	+	+	+	+
577	+	+	+	+	+	+	+	+	+
583	+	+	+	+	+	+	+	+	+
631	+	-	+	+	+	+	+	+	+
664	+	+	+	+	+	+	+	+	+
561	+	+	+	+	+	+	+	+	+
573	+	+	+	+	+	+	+	+	+
557	+	+	+	+	+	+	+	+	+
521	+	+	+	+	+	+	+	+	+
625	+	+	+	+	+	+	+	+	+
609	+	+	+	+	+	+	+	+	+
584	+	+	+	+	+	+	+	+	+
560	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Število poz.(+)/%	38/100	37/97,3	38/100	38/100	37/97,3	37/97,3	38/100	38/100	38/100

(+) = pozitiven rezultat, (-) = negativen rezultat

(t) = teden, (odv.) = odvzem

Graf 7. Serološki profil za PRCV



Pri PRCV med posameznimi odvzemi nismo ugotovili significantnih razlik.

4.2.1.7. Tabelarni in grafični prikaz serološkega profila za PRRSV

Seroprevalenca proti PRRSV (2,5 %) je od 11. tedna starosti začela naraščati in v 22. tednu dosegla najvišjo vrednost (97,4 %).

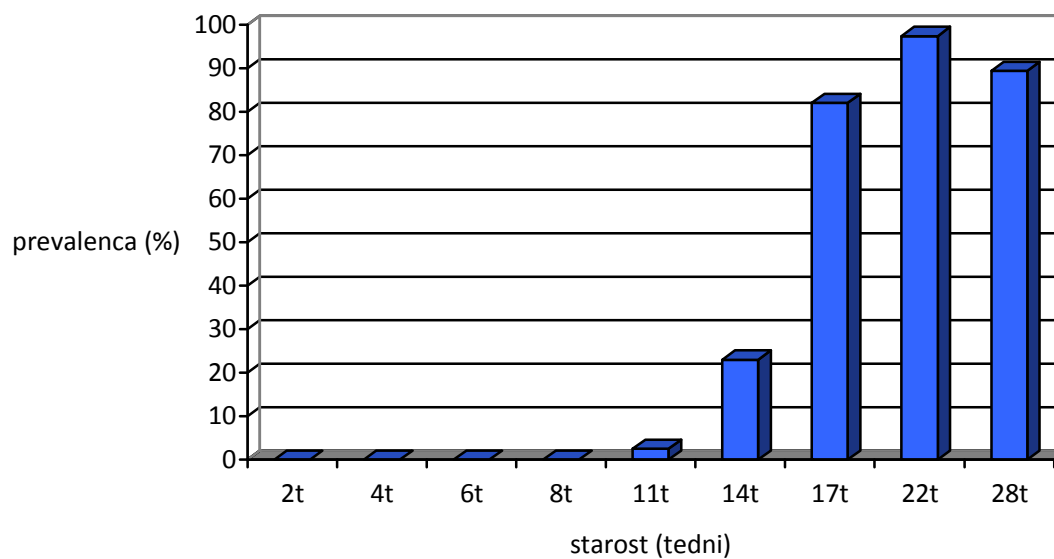
Tabela 9. Rezultati preiskav serumov posameznih pujskov od 2. tedna do 28. tedna starosti (1. do 9. odvzem) na protitelesa proti PRRSV

Oznaka prašiča	Starost (odvzem)								
	2t- 1. odv.	4t- 2. odv.	6t- 3. odv.	8t- 4. odv.	11t- 5. odv.	14t- 6. odv.	17t- 7. odv.	22t- 8. odv.	28t- 9. odv.
555	-	-	-	-	-	-	+	+	+
633	-	-	-	-	-	-	+	+	+
611	-	-	-	-	-	-	-	+	+
580	-	-	-	-	-	-	+	+	+
663	-	-	-	-	-	-	+	+	+
571	-	-	-	-	-	-	+	+	+
582	-	-	-	-	-	-	+	+	+
603	-	-	-	-	-	-	-	+	+
556	-	-	-	-	-	-	+	+	+
601	-	-	-	-	-	-	+	+	+
632	-	-	-	-	-	-	+	+	+
508	-	-	-	-	-	-	+	+	+
614	-	-	-	-	-	+	+	+	+
615	-	-	-	-	-	+	+	+	+
532	-	-	-	-	-	+	+	+	+
503	-	-	-	-	-	+	+	+	+
630	-	-	-	-	-	-	+	-	-
547	-	-	-	-	-	-	+	+	-
747	-	-	-	-	-	-	+	+	+
516	-	-	-	-	-	-	+	+	-
558	-	-	-	-	-	-	+	+	+
575	-	-	-	-	-	+	+	+	-
710	-	-	-	-	-	+	+	+	+
525	-	-	-	-	-	-	+	+	+
568	-	-	-	-	-	+	+	+	+
565	-	-	-	-	-	-	+	+	+
577	-	-	-	-	-	-	-	+	+
583	-	-	-	-	-	+	+	+	+
631	-	-	-	-	-	-	+	+	+
664	-	-	-	-	-	-	-	+	+
561	-	-	-	-	-	-	+	+	+
573	-	-	-	-	-	-	+	+	+
557	-	-	-	-	+	+	+	+	+
521	-	-	-	-	-	-	-	+	+
625	-	-	-	-	-	-	+	+	+
609	-	-	-	-	-	-	+	+	+
584	-	-	-	-	-	-	+	+	+
560	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Število poz.(+)/%	0/0	0/0	0/0	0/0	1/2,6	9/23,6	33/86,8	37/97,3	34/89,4

(+) = pozitiven rezultat, (-) = negativen rezultat

(t) = teden, (odv.) = odvzem

Graf 8. Serološki profil za PRRSV



Pri PRRSV med posameznimi odvzemi nismo ugotavljali significantnih razlik, saj je med zbiranjem krvnih vzorcev na farmi prišlo do okužbe s PRRSV.

5. RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1. RAZPRAVA

PRDC je ekonomsko pomemben sklop bolezni, saj vpliva na obseg prašičje proizvodnje; zanj so značilni manjši dnevni prirasti, daljše pitanje živali in slabša konverzija krme, povečata se obolevnost in smrtnost živali (Thacker, 2001) ter zvišajo stroški zdravljenja. Obenem se zaradi bolečine, stresa in neprimerne okolja poslabša odpornost in dobrobit živali, ki je tudi v intenzivni proizvodnji prašičev vedno bolj pomembna.

Za zmanjšanje izgub, ki so posledica PRDC, se lahko poslužujemo različnih metod, kot so vakcinacije proti posameznim povzročiteljem po navodilih proizvajalca, prekuževanje ali zdravljenje. Ena izmed metod je tudi izdelava serološkega profila, s katerim ugotavljamo prisotnost povzročiteljev in potek okužbe v čredi, določimo najprimernejši čas za vakcinacijo in spremljamo uspešnost vakcinacije, eliminacije ali eradikacije bolezni.

Na Veterinarski fakulteti smo na Inštitutu za zdravstveno varstvo prašičev že v obdobju od leta 2002 do 2005 s serološkimi metodami testirali serume plemenskih živali na protitelesa nekaterih povzročiteljev PRDC na večjih farmah v Sloveniji. Ugotovili smo protitelesa proti PRRSV, virusu PI, PRCV in *A. pleuropneumoniae* (Golarin Oven in Valenčak, 2006). V letih 1996 in 1999 pa smo na osmih velikih farmah ugotovili tudi prisotnost protiteles proti *M. hyopneumoniae* (Strajn, 2001).

V naši raziskavi smo se tokrat osredotočili le na eno večjo farmo, kjer smo želeli izdelati serološki profil za izbrane (pomembne) povzročitelje PRDC. S serološkimi preiskavami smo pri pitancih ugotavljali, kateri povzročitelji PRDC se v seroprevalenci nad 10 % pojavljajo na tej farmi (tabela 1). Seroprevalenca proti PCV2, virusu PI, *A. pleuropneumoniae* in PRCV je bila 100 %, proti *H. parasuis* 93,3 % in proti *M. hyopneumoniae* 80 %. Protiteles proti PRRSV nismo dokazali.

Pri plemenskih svinjah in njihovih potomcih smo nato ugotavljali protitelesa v serumu samo proti tistim povzročiteljem PRDC, pri katerih je bila seroprevalenca višja kot 10 %. Med zbiranjem krvnih vzorcev, ki je potekalo od decembra 2007 do julija 2008, je na farmi prišlo do okužbe s PRRSV, zato smo vzorce plemenskih svinj in pujskov testirali tudi na protitelesa proti PRRSV (tabela 2, tabela 3). Pri plemenskih svinjah protiteles proti PRRSV nismo dokazali, saj so bili vzorci odvzeti pred okužbo farme, pri pujskih pa smo protitelesa proti

PRRSV dokazali pri 5. odvzemu, kjer je bila seroprevalenca še nizka (2,5 %), vendar se je z vsakim odvzemom višala, kar je posledica širjenja okužbe s PRRSV (tabela 3).

V raziskavi smo uporabili t.i. »zaporedno« metodo serološkega profila, ki je dolgotrajnejša, vendar bolj natančna, saj se krvni vzorci jemljejo istim živalim v določenem časovnem razmiku (Andreasen in sod., 2000). Pujskom smo tako prvič odvzeli kri pri starosti 2. tednov, nato pa še pri 4., 6., 8., 11., 14., 17., 22. in 28. tednu starosti.

5.1.1. Testi ELISA

Za ugotavljanje seroloških reaktorjev smo uporabili komercialne teste ELISA. Večino testov ELISA, ki smo jih uporabili pri našem delu, proizvajalci definirajo kot čredne teste. To pomeni, da test uporabljamo za pregled celotne črede in ni primeren in zanesljiv za pregledovanje posameznih živali. Naša raziskava je zajela tako plemenske živali, kot tudi pujske, odstavljenice in pitance.

Teste ELISA pogosto uporabljamo, saj so enostavni za izvedbo, stroški preiskave pa so relativno nizki. Vendar pa imajo lahko omenjeni testi manjšo občutljivost in specifičnost. Pri ugotavljanju protiteles proti *M. hyopneumoniae* imajo testi ELISA običajno dobro specifičnost pri prepoznavanju negativnih vzorcev, zato je malo lažno pozitivnih rezultatov; občutljivost teh testov pa je nižja (med 37 in 49 %), zato lahko dobimo velik delež lažno negativnih rezultatov (Thacker, 2006; Sørensen in sod., 1997). Protein *M. hyopneumoniae* z molekulsko maso 74 kDa, proti kateremu uporabljamo monoklonska protitelesa v zgoraj omenjenem testu ELISA, je skupen vsem trem prašičjim mikoplazmam: *M. hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis* in *Mycoplasma flocculare*. Feld in sodelavci (1992) so dokazali, da so samo serumi z *M. hyopneumoniae* okuženih prašičev sposobni blokirati vezavo monoklonskih protiteles.

Za dokaz protiteles proti *A. pleuropneumoniae* smo uporabili test ELISA, ki dokazuje protitelesa proti faktorju ApxIV, ki ga izloča vseh 15 serovarov *A. pleuropneumoniae*. Samo sevi *A. pleuropneumoniae*, ki jih najdemo v živem organizmu – prašiču, proizvajajo faktor ApxIV. To nam omogoča, da lahko ločimo protitelesa nastala zaradi okužbe z *A. pleuropneumoniae* od protiteles nastalih zaradi vakcinacije. Vakcine so proizvedene na gojiščih, zato ne vsebujejo faktorja ApxIV. Dreyfus in sod. (2004) so uporabili test ELISA z rekombinantnim ApxIV in dokazali, da je test 100 % specifičen in 93,8 % občutljiv. Vendar pa s tem testom ne moremo razločiti s katerimi serovari *A. pleuropneumoniae* so živali okužene, tako da ne vemo ali gre za nizko ali visoko virulenten serovar.

Tudi pri dokazu protiteles proti virusu PI smo uporabili test ELISA, ki dokazuje le protitelesa proti virusu influence A, ne razlikuje pa med podtipi tega virusa. Ta test ni tako občutljiv in specifičen kot test inhibicije hemaglutinacije, ki je priznan kot zlati standard (Lang in sod., 2006). Testi ELISA, ki so danes na voljo (zlasti testi ELISA za ugotavljanje protiteles proti podtipu H3N2), slabše razlikujejo med podtipi virusov influence A. Zato smo se tudi v naši raziskavi osredotočili le na protitelesa proti virusu influence A.

Za ugotavljanje protiteles proti PRCV smo uporabili test bloking ELISA, ki s pomočjo monoklonskih protiteles loči TGEV in PRCV. Seroneutralizacijski test, ki se je uporabljal za diagnostiko TGEV, pri ugotavljanju protiteles proti PRCV ne pride v poštev, saj oba virusa sprožita tvorbo nevtralizacijskih protiteles, ki so kvalitativno in kvantitativno enaka (Saif in Sestak, 2006). S tem testom v zgodnji fazi okužbe (od 7. do 14. dne) ne zaznamo nizkih titrov protiteles (Sestak in sod., 1999).

5.1.2. Plemenske svinje

Pri plemenskih svinjah je bila v naši raziskavi seroprevalenca proti virusu PI, *A. pleuropneumoniae* in PRCV 100 %, proti PCV2 94 %, proti *M. hyopneumoniae* 83,3 % in proti *H. parasuis* 36 %. Protiteles proti PRRSV nismo dokazali (tabela 2), saj so bili vzorci odvzeti pred okužbo farme.

Večina z *A. pleuropneumoniae* endemično okuženih plemenskih čred je 100 % serološko pozitivnih (Marsteller in sod., 1999). Na Danskem je bila ugotovljena 76 % seroprevalenca proti *A. pleuropneumoniae*, serovaru 2, 41 % proti serovaru 6, 43 % proti serovaru 7 in 20 % proti serovaru 12. (Sørensen in sod., 2006). V Sloveniji smo v letih od 1997 do 2001 ugotovili, da se seroprevalence proti različnim serovarem *A. pleuropneumoniae* gibljejo od 10,1 % do 86,6 % (Golarin, 2002), v letih od 2002 do 2005 pa smo ugotovili 100 % seroprevalenco na ApxIV faktor, enako kot v tej raziskavi (Golarin Oven in Valenčak, 2006). Kljub temu da s testom ELISA, ki smo ga uporabili, dokazujemo okužbo s katerikoli serovarem *A. pleuropneumoniae*, nam predhodni rezultati v letih 1997–2001 dokazujejo, da so pri nas prisotni predvsem patogeni serovari.

Ségales (2002) poroča, da je v večini evropskih držav PI prisotna enzootično s čredno prevalenco od 44 do 100 %. V Belgiji je seroprevalenca proti virusu PI, podtip H1N1 92 % (Bochev, 2007). V predhodni študiji (Golarin Oven, 2007) se je odstotek plemenskih svinj na velikih farmah v Sloveniji, ki so imela protitelesa proti virusu PI podtipa H1N1, v letih od

2001 do 2003 gibal od 7 % do 85 %. V letu 2006 se je število pozitivnih seroloških reaktorjev dvignilo na povprečno 49,6 % (od 28,3 % do 73,6 %). Na farmi, kjer je potekala raziskava, je imelo leta 2006 31,6 % svinj protitelesa proti virusu PI, podtip H1N1. Delež plemenskih svinj v letih od 2001 do 2003, ki so imela protitelesa proti podtipu H3N2, se je gibal od 17 % do 55 %, na omenjeni farmi je znašal 39 %. V naši raziskavi je bila pri plemenskih svinjah proti influenci A seroprevalenca 100 %, kar je več kot v prejšnjih letih, vendar gre tukaj za dokaz protiteles proti različnim podtipom virusa influence A, saj so prašiči lahko okuženi z enim, oziroma dvema ali več podtipi virusa PI istočasno.

PRCV se v večini evropskih držav pojavlja enzootično (Wesley in sod., 1990). V Belgiji so pri 95 % farm našli protitelesa proti PRCV (Flori in sod., 1995). V Kanadi so v 15 čredah s plemenskimi svinjami ugotovili 83 % seroprevalenco proti PRCV (Jabrane in sod., 1992). Na Danskem je 61,5 % pozitivnih čred (od 408 testiranih) imelo v povprečju 90 % serološko pozitivnih prašičev; 78,5 % pozitivnih čred pa 100 % serološko pozitivnih prašičev (Flori in sod., 1995). V Sloveniji je bila v letih od 2002 do 2005 na velikih farmah seroprevalenca proti PRCV 90,2 % (Golarin Oven in Valenčak, 2006), kar je nekoliko manj kot v tej raziskavi (100 % seroprevalenca).

V Kanadi je imelo v 40 testiranih čredah kar 83,2 % prašičev protitelesa proti PCV2, poleg tega so bile vse črede seropozitivne (Cunningham in sod., 2008). Tudi v Belgiji so dokazali protitelesa proti PCV2 v vseh testiranih čredah (Mesu in sod., 2000). V ZDA pa je imelo 50 do 80 % svinj iz 6 plemenskih čred protitelesa proti PCV2 (Opriessnig in sod., 2008). V naši raziskavi je imelo 94 % svinj protitelesa proti PCV2, kar je primerljivo z drugimi državami. Kljub visoki prevalenci protiteles proti PCV2 pri svinjah, je v zadnjem času močno razširjena vakcinacija plemenskih svinj ali pujskov.

Kar 80 % vseh prašičev in 90 % vseh čred ima protitelesa proti *M. hyopneumonia* (Bochev, 2007). Upoštevati pa je treba dejstvo, da je cepljenje proti *M. hyopneumoniae* eno od najbolj pogostih cepljenj pri prašičih v intenzivni proizvodnji. V Bolgariji je bilo v obdobju od leta 2003 do 2005 100 % farm seropozitivnih na *M. hyopneumoniae*, seroprevalenca na posameznih farmah pa se je gibala med 4,5 in 100 %. V Veliki Britaniji je okuženih 90 %, v Španiji 100 % in v Belgiji 88 % čred (Bochev, 2007). V Sloveniji smo med leti 1996 in 1999 na osmih velikih farmah ugotovili 47 do 80 % serološko pozitivnih živali (Strajn, 2001), v tej študiji pa je imelo 83,3 % svinj protitelesa proti *M. hyopneumoniae*. Nepojasnen je pojav, da

svinje postajajo z leti serološko negativne. Yagihashi in sod. (1993) so ugotovili, da je 72 % svinj iz običajnih rej pozitivnih in da število seroloških svinj upada z naraščanjem števila gnezd.

Na Danskem je 70 % čred seropozitivnih na *H. parasuis*; v okuženih čredah ima 56 % prašičev protitelesa proti *H. parasuis* (Sørensen in sod., 2006). V naši raziskavi ima 36 % svinj protitelesa proti *H. parasuis*.

5.1.3. Pujski od 2. do 28. tedna starosti

V naši raziskavi so imeli vsi pujski v 2. in 4. tednu starosti protitelesa proti *A. pleuropneumoniae*. Seroprevalenca je bila med 6. in 8. tednom starosti nekoliko nižja (97,4 %), najnižja pa je bila pri 14 tednov starih prašičih (50,0 %). Pri 17. tednu starosti se je ponovno dvignila na 84,2 %, med 22. in 28. tednom starosti pa je bila 100 % (graf 1). Po podatkih iz literature kolostralna protitelesa vztrajajo od 5. do 12. tedna starosti. 10 do 14 dni po okužbi se pojavijo cirkulirajoča protitelesa, ki dosežejo svoj vrh 4 do 6 tednov po okužbi in vztrajajo nekaj mesecev (Gottschalk in Taylor, 2006). Vigre in sod. (2003) so v svoji raziskavi s pomočjo serološkega profila dokazali kolostralna protitelesa proti *A. pleuropneumoniae* pri pujskih od 2. do 8. tedna starosti. Incidenca okužb z *A. pleuropneumoniae* je najvišja med 4. in 12. tednom starosti, kar je posledica izgube kolostralne imunosti (Vigre in sod., 2002). V naši raziskavi je bila seroprevalenca pri svinjah 100 %, kolostralna protitelesa pa so vztrajala do 8. tedna starosti (97,4 % seroprevalenca), nato se je seroprevalenca v 11. tednu znižala na 60,5 % in v 14. tednu na 50 %. V 17. tednu se je seroprevalenca ponovno dvignila, kar je posledica okužbe in razvoja aktivne imunosti. Prašiči so se najverjetneje začeli okuževati v 14. tednu starosti, ko je bila seroprevalenca najnižja.

V naši raziskavi je imelo v 2. tednu starosti le 5,2 % pujskov protitelesa proti *H. parasuis*. V 4., 6. in 8. tednu starosti pri pujskih nismo dokazali protiteles proti *H. parasuis*. Seroprevalenca je nato v 11. tednu starosti narasla na 26,3 % in se nato dvigovala do 22. tedna starosti (94,7 %) (graf 2). Slaba kolostralna imunost pri pujskih je najbrž posledica nižje seroprevalence (36 %) pri plemenskih svinjah. Po podatkih iz literature se nivo kolostralnih protiteles zniža po odstavitvi pujskov, pri starosti 5 do 6 tednov (Nedbalcova in sod., 2006). V naši raziskavi so se pujski s *H. parasuis* okužili okoli 8. tedna starosti (0 % seroprevalenca), saj šele pri 11. tednu starosti zasledimo protitelesa zaradi okužbe (26,3 % seroprevalenca). Pri

22. tednu starosti je večina prašičev imela protitelesa kot posledica okužbe (94,7 % seroprevalenca).

Seroprevalenca proti virusu PI se je gibala med 81,5 % in 100 %. V 2. tednu starosti je bila seroprevalenca 100 %, 4. teden 94,7 %, najnižjo vrednost (81,5 %) pa smo ugotovili v 6. tednu starosti, nato se je ponovno dvignila na 100 %, z izjemo 17. tedna, ko je bila nekoliko nižja (94,7 %) (graf 3). Titer protiteles proti virusom PI pri pujskih je odvisen od pogostosti okužb pri svinji; čez čas (4–14 tednov) nivo protiteles v serumu pade (Olsen in sod., 2006). V naši raziskavi smo pri vseh plemenskih svinjah dokazali protitelesa proti virusu influence A, zato so tudi vsi pujski v 2. tednu starosti imeli kolostralna protitelesa. Protitelesa proti hemaglutininom lahko v serumu zasledimo 7–10 dni po okužbi, najvišji titer dosežejo 2–3 tedne po okužbi, po 8–9 tednih pa začne titer padati (Olsen in sod., 2006). V naši raziskavi smo prišli do podobnih ugotovitev. Najnižji titer protiteles smo zasledili med 4. do 6. tednom starosti, ko so se prašiči okužili z virusom PI. Titer protiteles je bil najvišji v 8. tednu starosti, kar je 2–4 tedne po okužbi; titer je nato postopoma začel padati vse do 17. tedna starosti, kar je 9 tednov po okužbi.

Seroprevalenca proti *M. hyopneumoniae* je bila v 2. tednu starosti 31,5 % in je nato v 6. in 7. tednu padla na 0 %. V 11. tednu je ponovno narasla na 2,6 % in se nato dvigovala vse do 28. tedna, ko je dosegla 86,8 % (graf 4). Protitelesa, ki jih v 2. tednu starosti zasledimo pri pujskih, so kolostralna protitelesa. Na farmi pujske med 10. in 14. dnevom starosti vakcinirajo proti *M. hyopneumoniae*, vendar se kljub vakcinaciji seroprevalenca pri pujskih zniža. Thacker in Thanawongnuwech (2002) poročata, da pogosto ne zasledimo serumskih protiteles po enkratni vakcinaciji proti *M. hyopneumoniae*. Po vakcinaciji serumska protitelesa, če ne pride do okužbe z *M. hyopneumoniae*, padejo in prašiči postanejo v 4–6 tednih seronegativni, kar se je zgodilo tudi v našem primeru. Wallgren in sod. (1998) poročajo, da ima le do 25 % prašičev pri starosti 10 do 12 tednov protitelesa proti *M. hyopneumoniae*, ob klanju pa je kar 90 % prašičev seropozitivnih na *M. hyopneumoniae*. V naši raziskavi je imelo v 11. tednu starosti le 2,6 % živali protitelesa proti *M. hyopneumoniae*, v 28. tednu starosti pa 86,8 % prašičev, kar sovпада s podatki iz literature. Leon in sod. (2001) so v svoji raziskavi ugotovili, da se je pri večini prašičev serokonverzija pojavila kmalu po prestavitvi živali v pitališče. Na naši farmi živali prestavijo v pitališče pri 11. tednih starosti; v 14. tednu starosti pa je imelo 21 % prašičev protitelesa proti *M. hyopneumoniae*. Ugotavljamo, da živali kljub vakcinaciji po določenem času niso več zaščitene, zato pride do okužbe in nastanka protiteles.

Seroprevalenca proti PCV2 je iz 84,2 % (v 2. tednu) padla na 50,0 % (v 6. tednu). V 8. tednu je narasla na 86,8 % in v 14. tednu na 100 % in taka ostala vse do 28. tedna starosti (graf 5). Seroprevalenca pri plemenskih svinjah je bila 94 %, zato tudi seroprevalenca pri pujskih v 2. tednu starosti ni bila 100 %, ampak le 84,2 %. Po podatkih iz literature so kolostralna protitelesa proti PCV2 prisotna do 5. ali 6. tedna starosti pri pujskih z nizkimi vrednostmi protiteles ob odstavitvi, do 8. ali 9. tedna starosti pri pujskih s srednjimi vrednostmi protiteles ob odstavitvi in do 11. ali 13. tedna starosti pri pujskih z visokimi vrednostmi protiteles ob odstavitvi (Opriessnig in sod., 2004a). V naši raziskavi je bila najnižja seroprevalenca v 6. tednu starosti, kar kaže na nizke vrednosti protiteles ob odstavitvi. Serokonverzija se običajno pojavi med 7. in 12. tednom starosti in protitelesa proti PCV2 lahko vztrajajo vse do 28. tedna starosti (Ségales in sod., 2006). Laroche in sod. (2003) so pri kanadskih prašičih s pomočjo serološkega profila ugotovili, da kolostralna protitelesa vztrajajo od 3. do 11. tedna starosti, medtem ko se serokonverzija pojavlja pri 15. tednu starosti. Prašiči na naši farmi so se najverjetneje okužili okoli 6. tedna starosti, seroprevalenca se je v 8. in 11. tednu dvignila in se gibala med 86,8 % in 84,2 % in nato v 14. tednu narasla na 100 % in vztrajala vse do 28. tedna starosti. Pri prašičih iz naše raziskave je prišlo do serokonverzije med 8. in 14. tednom starosti.

Seroprevalenca proti PRCV je bila pri večini odvzemov 100 %, le v 4., 11. in 14. tednu je bila 97,3 % (graf 6). Tudi pri plemenskih svinjah je bila seroprevalenca 100 %. Po podatkih iz literature naj bi kolostralna protitelesa izginila do 2. meseca starosti (Saif in Sestak, 2006); lahko pa so navzoča tudi do treh ali štirih mesecev starosti (Taylor, 2006e). Prašiči naj bi se s PRCV okužili med 20. in 26. tednom starosti, potem ko ni več prisotnih kolostralnih protiteles (Saif in Sestak, 2006). Iz našega serološkega profila ne moremo določiti do kdaj so bila prisotna kolostralna protitelesa in kdaj so se živali okužile, saj se je seroprevalenca gibala med 97,3 in 100 %.

Seroprevalenca proti PRRSV, ki je bila pri 11. tednu starosti 2,5 %, je nato začela naraščati in v 22. tednu dosegla najvišjo vrednost (97,4 %). Pri plemenskih svinjah in pitancih je bila seroprevalenca v času odvzema vzorcev 0 %. V času jemanja vzorcev za izdelavo serološkega profila so na farmo vnesli PRRSV. V naši raziskavi pujski nimajo kolostralnih protiteles, saj njihove matere v času jemanja vzorcev niso bile okužene s PRRSV. Prva protitelesa zaradi okužbe se pojavijo med 11. in 14. tednom starosti, ko seroprevalenca naraste iz 2,5 % na 23 %. Živali so se najverjetneje začele okuževati okoli 10. tedna starosti. V raziskavah konvencionalnih čred v Kanadi so ugotovili, da je imelo 12–44 % prašičev kolostralna

protitelesa do 3. tedna starosti, 2–16 % pa do 5. tedna starosti (Zimmerman in sod., 2006). Specifična protitelesa IgM se v serumu pojavijo 5. do 7. dan po okužbi, protitelesa IgG pa se v serumu pojavijo med 7. in 10. dnem po okužbi, dosežejo vrh med 2. in 4. tednom in vztrajajo nekaj mesecev. V naši raziskavi je bila seroprevalenca najvišja v 22. tednu starosti (97,4 %), kar pomeni, da je imela večina prašičev protitelesa proti PRRSV. Serološki profil za PRRS ne kaže pravega poteka okužbe s PRRSV na farmi, saj se je virus vnesel na farmo v času naše študije. Glede na to, da pri pitancih nismo zasledili protiteles na PRRSV, nam v študijo ni bilo potrebno vključiti te preiskave. Tekom naše naloge pa se je epizootiološka situacija na farmi spremenila (kar smo ugotovili s pregledi vzorcev na protitelesa proti PRRSV, ki so potekali izven naše študije), zato smo naknadno testirali naše vzorce tudi na protitelesa proti PRRSV.

Pujski se rodijo brez serumskih protiteles, zato dobijo specifično zaščito s kolostrumom matere (IgG, IgA, in IgM). Vsa zaščitna protitelesa, ki jih imajo pujski v prvih tednih življenja so kolostralna (Roth in Thacker, 2006).

Pri naši nalogi smo specifična protitelesa proti posameznim povzročiteljem PRDC pričakovali pri sesnih pujskih, ob odstavitvi ter v času pitanja. Na farmi pujske odstavljajo okoli 4. tedna starosti, v pitališče pa jih prestavijo med 11. in 12. tednom starosti. Do 4. tedna starosti so imeli skoraj vsi pujski specifična kolostralna protitelesa proti *A. pleuropneumoniae* (100 % seroprevalenca), virusu PI (94,7 % seroprevalenca) in PRCV (97,3 % seroprevalenca); proti PCV2 je imelo protitelesa 71 % pujskov. Nismo pa dokazali specifičnih kolostralnih protiteles proti *H. parasuis*, kar je bilo proti našim pričakovanjem.

V 28. tednu starosti, pred klanjem, so imeli večinoma vsi pitanci specifična protitelesa proti vsem testiranim povzročiteljem PRDC. Seroprevalenca na posamezne povzročitelje se je gibala med 86,8 % (*M. hyopneumoniae*) in 100 % (*A. pleuropneumoniae*, virus PI, PCV2 in PRCV).

Specifična kolostralna protitelesa smo pri endemično prisotnih boleznih (virus PI, PCV2, PRCV, *A. pleuropneumoniae*, *M. hyopneumoniae*, *H. parasuis*) pričakovali do največ 8 tedna starosti. Kolostralna protitelesa smo do 8. tedna starosti zasledili le pri *A. pleuropneumoniae*, virusu PI, PCV2 in *M. hyopneumoniae*. Specifičnih kolostralnih protiteles proti *H. parasuis* nismo dokazali, najverjetneje zaradi nižje seroprevalence (36 %) pri plemenskih svinjah.

Med 8. in 11. tednom starosti prašičev smo pričakovali nizko prevalenco ali odsotnost specifičnih protiteles za endemično prisotne bolezni (virus PI, PCV2, PRCV, *A. pleuropneumoniae*, *M. hyopneumoniae*, *H. parasuis*). Po 11. tednu starosti smo pričakovali razvoj aktivne imunosti (dvig seroprevalence). V 8. tednu starosti so bili pujski brez specifičnih protiteles proti *M. hyopneumoniae* in *H. parasuis*; po 11. tednu starosti pa je prišlo do dviga seroprevalence. Pri *A. pleuropneumoniae* je bila najnižja seroprevalenca ugotovljena šele pri 14. tednu starosti; pri virusu PI in PCV2 pa že pri 6. tednu starosti, zato se je pri teh dveh povzročiteljih aktivna imunost pojavila prej (8. teden starosti).

Pričakovali smo tudi, da se bo seroprevalenca pri posameznih odvzemih večinoma signifikantno razlikovala, kar pa v vseh primerih nismo uspeli dokazati. Pri *A. pleuropneumoniae* je bila signifikantna razlika v seroprevalenci med 8. in 11. tednom starosti (iz 97,4 % na 60 %) in med 14. in 17. tednom starosti (iz 50 % na 84,2 %). Med 8. in 11. tednom starosti je prišlo do padca specifičnih kolostralnih protiteles, med 14. in 17. tednom pa je dvig seroprevalence verjetno posledica okužbe z *A. pleuropneumoniae*.

Pri *H. parasuis* je bila signifikantna razlika v seroprevalenci med 8. in 11. tednom starosti (iz 0 % na 26,3 %), med 11. in 14. tednom starosti (iz 26,3 % na 63,1 %) in med 14. in 17. tednom starosti (iz 65,7 % na 94,7 %), kar je posledica verjetno okužb s *H. parasuis*.

Pri virusu PI je bila signifikantna razlika v seroprevalenci samo med 6. in 8. tednom starosti (iz 81,5 % na 100 %), kar je verjetno posledica okužbe z različnimi podtipi virusa PI, saj so živali lahko okužene z enim, dvema ali večimi podtipi virusa PI istočasno. Domnevamo, da bi se seroprevalence pri posameznih odvzemih bolj signifikantno razlikovale, če bi naredili serološke profile za posamezne podtipe (H1N1, H3N2, H1N2) PI.

Pri *M. hyopneumoniae* je bila signifikantna razlika v seroprevalenci ugotovljena med 2. in 4. tednom (iz 31,5 % na 2,6 %), med 11. in 14. tednom (iz 2,6 % na 21 %) ter med 22. in 28. tednom starosti (iz 36,8 % na 86,8 %). Med 2. in 4. tednom starosti je prišlo do padca specifične kolostralne imunosti, tudi zaradi vakcinacije proti *M. hyopneumoniae*; med 11. in 14. tednom starosti pa so se začela pojavljati prva protitelesa verjetno kot posledica okužbe, ki so se signifikantno dvignila med 22. in 28. tednom starosti.

Pri PCV2 je bila signifikantna razlika v seroprevalenci ugotovljena med 4. in 6. tednom (iz 71 % na 50 %) in med 6. in 8. tednom starosti (iz 50 % na 86,8 %). V prvem primeru je razlika verjetno posledica padca specifičnih kolostralnih protiteles, v drugem pa posledica okužbe s PCV2.

Pri PRCV med posameznimi odvzemi nismo ugotovili signifikantnih razlik, zato ne moremo določiti, do kdaj so bila prisotna specifična kolostralna protitelesa in kdaj so se živali začele okuževati s PRCV.

5.1.4. Uporaba serološkega profila za ukrepe proti povzročiteljem PRDC na omenjeni farmi

Program vakcinacije zoper povzročitelje PRDC mora biti narejen za vsako farmo (rejo) posebej (Bruguera in sod., 2002). S pomočjo izdelanega serološkega profila lahko za farmo, na kateri smo izvedli študijo, pripravimo program ukrepov. Za večino povzročiteljev PRDC na omenjeni farmi lahko glede na serološki profil določimo najprimernejši čas za vakcinacijo oziroma terapijo. Najprimernejši čas za vakcinacijo je 2 do 3 tedne pred okužbo, da organizem do takrat ustvari imunost. Serokonverzija se običajno pojavi 1–2 tedna po okužbi. Časa vakcinacije za omenjeno farmo s pomočjo izdelanega serološkega profila ne moremo določiti za PRCV in PRRSV, saj pri PRCV med posameznimi odvzemi nismo ugotovili signifikantnih razlik, pri PRRS pa se je virus vnesel na farmo v času naše študije. Za PRCV komercialna vakcina tudi ni na voljo. Menimo pa, da zaradi visoke prekuženosti živali, PRCV v čredi ne povzroča težav.

Serološki profil za PRRSV, ki smo ga izdelali na farmi, je bil učinkovit zlasti pri diagnostiki PRRSV. V tem primeru smo pokazali prednost »zaporedne« metode, saj smo z njeno uporabo bolezen odkrili. Če bi uporabili »presečno« metodo (enkratni odzem) in bi vzorčili pred vnosom PRRSV na farmo, okužbe ne bi zaznali.

Pri okužbi farme s PRRSV se je potrebno najprej posvetiti plemenski čredi. Po izvedenih ukrepih pa bi ponovna izvedba serološkega profila delovala kot indikatorski sistem preverjanja uspešnosti utrditve plemenske črede (enotna stopnja imunosti pri vseh živalih v čredi), ki privede do eliminacije PRRS na farmi.

Da preprečimo širjenje PRRS, je potrebno izolirati plemensko čredo in izvesti vakcinacijo ali serumizacijo. V našem primeru bi prašičem lahko aplicirali razredčen serumom, ki bi vseboval hlevski sev PRRSV. Zapora črede naj traja vsaj 6 mesecev, da se vzpostavi imunost in da se virus odstrani iz črede; v tem času se na farmo ne sme vnašati novih živali. Med izvajanjem in po koncu programa priporočamo serološki monitoring, ki ga izvajamo enkrat mesečno. Uporabimo nekoliko drugačen serološki profil, saj jemljemo krvne vzorce po kategorijah: plemenskim svinjam, sesnim pujskom, odstavljenecem in pitancem. Po stabilizaciji črede morajo biti plemenske svinje serološko pozitivne, vendar brez klicenoscev,

sesni pujski zaščiteni s kolostralnimi protitelesi, pitanci pa serološko negativni. Sčasoma postanejo vse kategorije živali serološko negativne. Tudi nove živali, ki se jih vnaša v čredo, morajo biti serološko negativne (Torremorell in Christianson, 2002).

Pri PI je bila na farmi najnižja seroprevalenca pri pujskih v 6. tednu starosti. Olsen in sod. (2006) ugotavljajo, da pujskom nevakciniranih svinj titer kolostralnih protiteles zoper virus PI v šestem tednu starosti pade pod 1: 40. Pujskom vakciniranih svinj pa pade pod 1: 40 šele po 16. tednu starosti. Večina vakcin, ki so na voljo, se uporablja za vakcinacijo svinj. Z vakcinacijo svinj tako nadziramo bolezen pri sesnih pujskih in odstavljenicah. Na omenjeni farmi svetujemo vakcinacijo svinj, ki je cenejša, saj cepimo manjše število živali, ob tem pa dosežemo zaščito mlajših kategorij prašičev, pri katerih so posledice okužbe z virusom PI hujše.

Pri PCV2 je bila najnižja seroprevalenca na farmi pri pujskih v 6. tednu starosti, specifična protitelesa proti PCV2 pa je imelo 94 % plemenskih svinj. Tudi v tem primeru priporočamo vakcinacijo svinj. Z vakcinacijo svinj povišamo titer kolostralnih protiteles in podaljšamo čas trajanja kolostralne imunosti in zaščite do 10.–12. tedna starosti. Na ta način preprečimo izgube zaradi PMWS, do katerih pride ob tej starosti.

Pri *A. pleuropneumoniae* je bila najnižja seroprevalenca na farmi pri prašičih v 14. tednu starosti. S pomočjo izdelanega serološkega profila ugotavljamo, da je najprimernejši čas za vakcinacijo pitancev med 11. in 14. tednom starosti. Kot je iz serološkega profila razvidno, traja kolostralna zaščita tako dolgo, da je primernejša vakcinacija pitancev. S cepljenjem svinj in dvigom kolostralnih protiteles ne moremo več vplivati na zaščito prašičev v tem obdobju.

Pri *H. parasuis* pujski praktično niso imeli kolostralnih protiteles; specifična protitelesa nastala zaradi okužbe s *H. parasuis* zasledimo okoli 11. tedna starosti. V tem primeru imamo dve možnosti: lahko vakciniramo pujske okoli 8.–9. tedna starosti ali pa vakciniramo plemenske svinje in tako pri pujskih podaljšamo kolostralno imunost. Baumann in Bilkei (2002) sta ugotovila, da imajo pujski vakciniranih mladic višje titre protiteles kot pujski nevakciniranih mladic. Protitelesa so prisotna do 10. tedna starosti.

Serološki profil nam v našem primeru ne da končnega odgovora. Nujni so podatki o pojavnosti Glässerjeve bolezni na farmi in oceni škode, ki jo povzroča. Povzročitelj *H. parasuis* je ubikvitaren v skoraj vseh rejah prašičev, vendar je klinična manifestacija odvisna od mnogih okoljskih dejavnikov. Glede na prisotnost PRRSV, ki poveča dovzetnost za

endemične bolezni in poslabša njihov potek, menimo, da je ukrepanje proti Glässerjevi bolezni nujno.

Pri *M. hyopneumoniae* smo s pomočjo serološkega profila ugotovili, da specifična protitelesa zasledimo med 11. in 14. tednom starosti in so verjetno posledica okužbe. Zaradi tega predlagamo ponovno cepljenje proti *M. hyopneumoniae*, da zaščitimo prašiče do klavne starosti.

Poleg specifičnih ukrepov se priporoča tudi izvajanje splošnih preventivnih ukrepov, kot so:

- karantena živali;
- izvajati način »all in–all out« (AIAO) – vse noter–vse ven, kjer je le mogoče;
- omejitev gibanja prometa na farmi;
- zagotavljanje sveže pitne vode;
- čiščenje in dezinfekcija prostorov in orodja, ki se uporablja na farmi ali za transport prašičev;
- redna deratizacija na farmi;
- zmanjšati prenaseljenost hlevov;
- organizirati rejo tako, da bo premikanje in mešanje živali minimalno;
- izboljšati bivanjske pogoje (primeren prostor, kvadratura, ...);
- zagotoviti dobro ventilacijo in primerno temperaturo prostorov;
- zgodnje odstranjevanje obolelih prašičev (poseben prostor za bolne prašiče ali evtanazija).

Z našo raziskavo smo ugotovili, da za pripravo ukrepov na neki farmi zadostuje izvedba serološkega profila po principu »presečne« metode, ko v enem dnevu različnim starostnim skupinam odvzamemo krvne vzorce. Vendar pa je »presečna« metoda uporabna s predpostavko, da se na farmo ne vnese novih povzročiteljev. V našem primeru so na farmo vnesli PRRSV. Poleg tega je potrebno »presečno« metodo ponavljati v rednih presledkih, saj s tem preverimo uspešnost izvedenih ukrepov.

Menimo, da lahko pri »zaporedni« metodi zmanjšamo število odvzemov, saj med posameznimi odvzemi nismo vedno ugotovili signifikantnih razlik: če kri odvzamemo plemenskim svinjam, zadostuje pri pujskih odvzem pri 6. in 14. tednu starosti; v nasprotnem primeru pa zadostuje odvzem pri 4., 6. in 14. tednu starosti, kar zagotavlja hitro in učinkovito

diagnozo bolezni. Na ta način se zmanjšajo izgube, pravočasno pa lahko tudi izvedemo ostale ukrepe.

Na podlagi proizvodnih rezultatov in ocene izgub najprej naredimo vrstni red ukrepanja. Vedno se lotimo najprej tiste bolezni, ki povzroča največ izgub, v primeru naše farme je to PRRS, šele nato sledijo druge bolezni: v našem primeru PCV2 in *H. parasuis*. PRRSV zmanjša imunski odziv organizma in dvigne prevalenco endemičnih bolezni na farmi ter poslabša potek bolezni ob sočasni okužbi z drugimi povzročitelji PRDC. Na drugem mestu je PCV2, ki je ekonomsko pomemben, vendar enostavno rešljiv, stroški vakcinacije pa so manjši v primerjavi s škodo, ki jo virus lahko povzroči. Z vakcinacijo svinj ali pujskov se zdravstveno stanje živali izboljša. *H. parasuis* je ubikvitaren, tako da je eradikacija praktično nemogoča, stroški vakcinacije pa so relativno nizki.

Mesec ali dva po vakcinaciji priporočamo ponoven odvzem krvi in serološko testiranje.

Priporočljivo je, da poleg izdelave serološkega profila v vsaki reji spremljamo tudi klinična znamenja pri živalih, opravimo patoanatomske sekcije in po potrebi tudi druge diagnostične metode, kot je npr. metoda PCR. Zelo pomembno je spremljanje podatkov o proizvodnji, ki nas velikokrat najprej opozorijo, da je na farmi nekaj narobe.

5.2. SKLEPI

- Na izbrani farmi smo pri plemenskih svinjah dokazali protitelesa proti virusu PI, PCV2, PRCV, *A. pleuropneumoniae*, *M. hyopneumoniae* in *H. parasuis*; seroprevalenca je bila med 36 % in 100 %.

- Do 4. tedna starosti so imeli skoraj vsi pujski specifična kolostralna protitelesa proti *A. pleuropneumoniae*, virusu PI, PRCV, PCV2. Protiteles proti *H. parasuis* nismo ugotovili, kar je najbrž posledica slabe prekuženosti pri svinjah. Tudi vsi pitanci (starost 28 tednov) so imeli specifična protitelesa proti vsem testiranim povzročiteljem PRDC.

- V 8. tednu starosti so bili pujski brez specifičnih protiteles proti *M. hyopneumoniae* in *H. parasuis*; po 11. tednu starosti pa je prišlo do dviga seroprevalence. Pri *A. pleuropneumoniae* je bila najnižja seroprevalenca ugotovljena šele pri 14. tednu starosti; pri virusu PI in PCV2

pa že pri 6. tednu starosti, zato se je pri teh dveh povzročiteljih aktivna imunost pojavila prej (8. teden starosti).

- Seroprevalenca se med posameznimi odvzemi ni vedno signifikantno razlikovala. Pri *A. pleuropneumoniae* je bila signifikantna razlika v seroprevalenci med 8. in 11. tednom starosti. Pri *H. parasuis* je bila signifikantna razlika v seroprevalenci med 8. in 11. tednom starosti, med 11. in 14. tednom starosti in med 14. in 17. tednom starosti. Pri virusu PI je bila signifikantna razlika v seroprevalenci med 6. in 8. tednom starosti. Pri *M. hyopneumoniae* je bila signifikantna razlika v seroprevalenci med 2. in 4. tednom starosti, med 11. in 14. tednom starosti in med 22. in 28. tednom starosti. Pri PCV2 je bila signifikantna razlika v seroprevalenci med 4. in 6. tednom in med 6. in 8. tednom starosti. Pri PRCV pri posameznih odvzemih nismo ugotovili signifikantnih razlik.

- S pomočjo izdelanega serološkega profila in glede na novo nastalo epidemiološko situacijo v času študije, bi lahko na farmi ukrepali na sledeči način:

- PRRSV: utrditev plemenske črede z imunizacijo,
- PCV2: vakcinacija svinj,
- *H. parasuis*: vakcinacija svinj ali pujskov,
- *A. pleuropneumoniae*: vakcinacija pitancev,
- virus PI: vakcinacija svinj,
- *M. hyopneumoniae*: ponovna vakcinacija med 11. in 14. tednom starosti,
- PRCV: ni potrebnih specifičnih ukrepov,
- preprečevanje vnosa novih povzročiteljev PRDC na farmo.

- Izvedba serološkega profila »presečne« metode z enkratnim odvzemom vzorcev je primerna ob izvajanju striktnih ukrepov preprečevanja vnosa novih povzročiteljev.

- »Presečno« metodo je potrebno zaradi preverjanja uspešnosti izvedenih ukrepov ponavljati v rednih presledkih.

- Pri »zaporedni« metodi lahko zmanjšamo število odvzemov vzorcev iz devet na tri.

6. POVZETEK (SUMMARY)

6.1. POVZETEK

Prašičji respiratorni bolezenski kompleks (PRDC) prizadene predvsem pitance; najpogosteje se pojavlja pri 10 do 22 tednov starih prašičih (Holko in sod., 2004). Zanj so značilni manjši dnevni prirasti, zmanjšan apetit, daljše pitanje živali, povišana telesna temperatura, kašelj, težko dihanje (Thacker in Thanawongnuwech, 2002). Pri hudi obliki PRDC se smrtnost signifikantno poveča (Choi in sod., 2003).

Med primarne povzročitelje PRDC sodijo: virus reproduktivnega in respiratornega sindroma (PRRSV), virus prašičje influence (PI), virus bolezni Aujeszkega, prašičji respiratorni korona virus (PRCV), prašičji cirkovirus tip 2 (PCV2), *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) (Choi in sod., 2003; Thacker, 2001). Med sekundarne povzročitelje, ki jih omenjajo v povezavi s PRDC, pa sodijo: *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*), *Streptococcus suis*, *Actinobacillus suis* (Brockmeier in sod., 2002a; Ohlinger in sod., 2002).

PRDC je prisoten v vseh državah EU. Ukrepi povezani s PRDC se razlikujejo od reje do reje (Bochev, 2007).

S serološkim profilom ugotavljamo v čredi število živali s specifičnimi protitelesi v krvnem serumu v času odvzema vzorcev. Isti serum živali lahko testiramo na specifična protitelesa različnih respiratornih povzročiteljev (Andreasen in sod., 2000).

V naši raziskavi smo se osredotočili le na eno večjo farmo, kjer smo želeli izdelati serološki profil in pripraviti ukrepe za izbrane (pomembne) povzročitelje PRDC. Na protitelesa proti PCV2, virusu PI, PRCV, PRRSV, *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae* in *H. parasuis* smo pregledali 30 serumov pitancev, 36 serumov plemenskih svinj in 342 serumov prašičev (9 odzemov po 38 serumov – kri smo jemali pri starosti 2., 4., 6., 8., 11., 14., 17., 22. in 28. tedna). Zbiranje krvnih vzorcev je potekalo od decembra 2007 do julija 2008. Pri preiskavah serumov smo uporabili komercialne teste ELISA različnih proizvajalcev.

Seroprevalenca pri pitancih proti PCV2, virusu PI, *A. pleuropneumoniae* in PRCV je bila 100 %, proti *H. parasuis* 93,3 % in proti *M. hyopneumoniae* 80 %. Protiteles proti PRRSV nismo dokazali, saj so bili vzorci odvzeti pred vnosom povzročitelja na farmo.

Pri plemenskih svinjah in njihovih potomcih smo ugotavljali protitelesa v serumu samo proti tistim povzročiteljem PRDC, pri katerih je bila seroprevalenca višja kot 10 %. Med zbiranjem krvnih vzorcev je na farmi prišlo do okužbe s PRRSV, zato smo vzorce plemenskih svinj in pujskov testirali tudi na protitelesa proti PRRSV. Pri plemenskih svinjah je bila v naši raziskavi seroprevalenca proti virusu PI, *A. pleuropneumoniae* in PRCV 100 %, proti PCV2 94 %, proti *M. hyopneumoniae* 83,3 % in proti *H. parasuis* 36 %. Protiteles proti PRRSV nismo dokazali.

Vsi pujski so imeli v 2. in 4. tednu starosti protitelesa proti *A. pleuropneumoniae*. Seroprevalenca je bila v 6. in 8. tednu starosti nekoliko nižja (97,4 %), najnižja pa je bila pri 14 tednov starih prašičih (50,0 %). Pri 17. tednu starosti se je ponovno dvignila na 84,2 %, v 22 in 28 tednu starosti pa je bila 100 %. Prašiči so se najverjetneje začeli okuževati v 14. tednu starosti, ko je bila seroprevalenca najnižja. Pri *A. pleuropneumoniae* je bila signifikantna razlika v seroprevalenci med 8. in 11. tednom starosti.

V 2. tednu starosti je imelo le 5,2 % pujskov protitelesa proti *H. parasuis*. V 4., 6. in 8. tednu starosti pri pujskih nismo dokazali protiteles proti *H. parasuis*. Seroprevalenca je nato v 11. tednu starosti narasla na 26,3 % in se nato dvigovala do 22. tedna starosti (94,7 %). Pri *H. parasuis* je bila signifikantna razlika v seroprevalenci med 8. in 11. tednom starosti, med 11. in 14. tednom starosti in med 14. in 17. tednom starosti.

Seroprevalenca proti virusu PI se je gibala med 81,5 % in 100 %. V 2. tednu starosti je bila seroprevalenca 100 %, 4. teden 94,7 %, najnižjo vrednost (81,5 %) pa je dosegla v 6. tednu starosti, nato se je ponovno dvignila na 100 %, z izjemo 17. tedna, ko je bila nekoliko nižja (94,7 %). Pri virusu PI je bila signifikantna razlika v seroprevalenci med 6. in 8. tednom starosti.

Seroprevalenca proti *M. hyopneumoniae* je bila v 2. tednu starosti 31,5 % in je nato v 6. in 7. tednu padla na 0 %. V 11. tednu je nato narasla na 2,6 % in se nato dvigovala do 28. tedna, ko je dosegla 86,8 %. Pri *M. hyopneumoniae* je bila signifikantna razlika v seroprevalenci med 2. in 4. tednom starosti, med 11. in 14. tednom starosti in med 22. in 28. tednom starosti.

Seroprevalenca proti PCV2 je iz 84,2 % (v 2. tednu) padla na 50,0 % (v 6. tednu). V 8. tednu je narasla na 86,8 %, po 14. tednu in vse do konca študije pa je bila 100 %. Prašiči na naši farmi so se najverjetneje okužili okoli 6. tedna starosti. Pri PCV2 je bila signifikantna razlika v seroprevalenci med 4. in 6. tednom in med 6. in 8. tednom starosti.

Seroprevalenca proti PRCV je bila pri večini odvzemov 100 %, le v 4., 11. in 14. tednu je bila 97,3 %. Iz našega serološkega profila ne moremo določiti, do kdaj so bila prisotna kolostralna protitelesa in kdaj so se živali okužile. Pri PRCV med posameznimi odvzemi nismo ugotovili significantnih razlik.

V naši raziskavi pujski niso imeli kolostralnih protiteles proti PRRSV, saj njihove matere v času jemanja vzorcev niso bile okužene s PRRSV. Prva protitelesa zaradi okužbe so se pojavila med 11. in 14. tednom starosti, ko je seroprevalenca narasla iz 2,5 % na 23 %. Živali so se najverjetneje začele okuževati okoli 10. tedna starosti.

Časa vakcinacije za omenjeno farmo s pomočjo izdelanega serološkega profila ne moremo določiti za PRCV in PRRSV.

S pomočjo izdelanega serološkega profila in glede na novo nastalo epidemiološko situacijo v času študije bi lahko na farmi ukrepali na sledeči način:

- PRRSV: utrditev plemenske črede z imunizacijo,
- PCV2: vakcinacija svinj,
- *H. parasuis*: vakcinacija svinj ali pujskov,
- *A. pleuropneumoniae*: vakcinacija pitancev,
- virus PI: vakcinacija svinj,
- *M. hyopneumoniae*: ponovna vakcinacija med 11. in 14. tednom starosti,
- PRCV: ni potrebnih specifičnih ukrepov,
- preprečevanje vnosa novih povzročiteljev PRDC na farmo.

Z našo raziskavo smo ugotovili, da za pripravo ukrepov na neki farmi zadostuje izvedba serološkega profila po principu »presečne« metode, vendar le s predpostavko, da se na farmo ne vnese nobenega novega povzročitelja. »Presečno« metodo je potrebno ponavljati v rednih presledkih, saj s tem ocenimo uspešnost izvedenih ukrepov. Menimo, da lahko pri »zaporedni« metodi zmanjšamo tudi število odvzemov, saj med posameznimi odvzemi nismo vedno ugotovili significantnih razlik.

6.2. SUMMARY

Porcine respiratory disease complex (PRDC) is a multi-factorial respiratory syndrome in swine (Dereu and Somers, 2007). PRDC is common in finishing or fattening pigs around 10 to 20 weeks of age (Holko et al., 2004). It is characterized by decreased daily gain, decreased

feed efficiency, fever, cough, difficult breathing (Thacker and Thanawongnuwech, 2002). At severe form of PRDC, mortality is significantly higher (Choi et al., 2003).

Primary pathogens involved in PRDC are: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), Swine Influenza Virus (SIV), Aujeszky's Disease Virus, Porcine Respiratory Corona Virus (PRCV), Porcine Circovirus Type 2 (PCV2), *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) (Choi et al., 2003; Thacker, 2001). *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*), *Streptococcus suis*, *Actinobacillus suis* are shown to act as secondary pathogens (Brockmeier et al., 2002a; Ohlinger et al., 2002).

PRDC is present in all countries of EU. A control of PRDC is different from herd to herd (Bochev, 2007).

Serum profile is a way to detect number of animals in the herd with circulating antibodies in the pig's blood at the time of sampling. The same serum can be tested against specific antibodies of different respiratory pathogens (Andreasen et al., 2000).

The objective of this study was to make the serum profile to selected (important) pathogens of PRDC for preparation of specific control measures on one Slovenian large farm. 30 serum samples from fatteners, 36 serum samples of breeding sows and 342 serum samples of pigs (38 serum samples; 9 samplings) were tested for antibodies to PCV2, SIV, PRCV, PRRSV, *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis* from December 2007 to July 2008.

Commercial ELISA kits of different producers were used.

In fatteners seroprevalence to PCV2, SIV, *A. pleuropneumoniae* and PRCV was 100 %, to *H. parasuis* 93,3 % and to *M. hyopneumoniae* 80 %. They were seronegative against PRRSV.

Sera of breeding sows and piglets were tested only for those pathogens with seroprevalence higher than 10 % in fatteners. Serum samples of breeding sows and piglets were tested also for antibodies to PRRSV, because in the time of sampling the farm had been infected with PRRSV. In breeding sows seroprevalence to SIV, *A. pleuropneumoniae* and PRCV was 100 %, to PCV2 94 %, to *M. hyopneumoniae* 83,3 % and to *H. parasuis* 36 %. They were seronegative against PRRSV.

All pigs had specific antibodies against *A. pleuropneumoniae* at 2 and 4 weeks of age. The seroprevalence was lower at 6 and 8 weeks of age (97,4 %), and decreased to 50 % at 14 weeks of age. At 17 weeks of age increased to 84,2 % and at 22 and 28 weeks of age to 100 %. There is strong probability that infection with *A. pleuropneumoniae* started at 14 weeks of age when the seroprevalence was the lowest. The seroprevalence against *A. pleuropneumoniae* was significantly different between 8 and 11 weeks of age.

Only 5,2 % of pigs had specific antibodies against *H. parasuis* at 2 weeks of age. Pigs were seronegative against *H. parasuis* at 4, 6 and 8 weeks of age. The seroprevalence increased to 26,3 % at 11 weeks of age and to 97,4 % at 22 weeks of age. The seroprevalence against *H. parasuis* was significantly different between 8 and 11 weeks, 11 and 14 weeks and between 14 and 17 weeks of age.

The seroprevalence against SIV was between 81,5 % and 100 %. The seroprevalence was 100 % at 2 weeks of age, 94,7 % at 4 weeks of age; the lowest seroprevalence was at 6 weeks of age. The seroprevalence then increased to 100 %, only at 17 weeks of age was a little lower (94,7 %). The seroprevalence against SIV was significantly different between 6 and 8 weeks of age.

The seroprevalence against *M. hyopneumoniae* was 31,5 % at 2 weeks of age and decreased to 0 % at 6 and 7 weeks of age. At 11 weeks increased to 2,6 % and 28 weeks of age increased to 86,8 %. The seroprevalence against *M. hyopneumoniae* was significantly different between 2 and 4 weeks, 11 and 14 weeks and between 22 and 28 weeks of age.

At 2 weeks of age the seroprevalence against PCV2 from 84,2 % decreased to 50 % (at 6 weeks of age). At 8 weeks of age increased to 86,8 % and at 14 weeks of age to 100 %. The animals were probably infected around 6 weeks of age. The seroprevalence against PCV2 was significantly different between 4 and 6 weeks and between 6 and 8 weeks of age.

The seroprevalence against PRCV was mainly 100 %, only at 4, 11 and 14 weeks of age was 97,3 %. Serum profile of PRCV does not provide information of seroconversion. There were no significant differences in seroprevalence against PRCV between individual samplings.

In piglets we did not detect colostral antibodies against PRRSV. In time of sampling the breeding sows were not infected with PRRSV. Specific antibodies to PRRSV were detected

between 11 and 14 weeks of age, when the seroprevalence increased from 2,5 % to 23 %. The animals were probably infected around 10 weeks of age.

Serum profile of PRCV and PRRSV does not enable us to estimate the proper time for vaccination.

According to serum profile and epidemiological situation on farm at the time of our study the following measures can be proposed:

- PRRSV: stabilization of breeding herd with immunization,
- PCV2: vaccination of sows,
- *H. parasuis*: vaccination of sows or piglets,
- *A. pleuropneumoniae*: vaccination of sows,
- *M. hyopneumoniae*: second vaccination between 11. –14. weeks of age,
- PRCV: specific measures are not needed,
- prevention of entering other pathogens of PRDC on the farm.

In our study was established, that “cross-sectional” serological testing is sufficient for preparation of control measures for the farm, but only with supposition that no new disease is entering the farm. “Cross-sectional” method must be repeated quarterly or twice a year, to follow the efficiency of performed measures. We believe that at “longitudinal” method the number of samplings can be reduced because there were not always differences in seroprevalence between samplings.

7. ZAHVALA

Za vsestransko pomoč in strokovne nasvete pri nastajanju doktorskega dela se zahvaljujem doc. dr. Zdravku Valenčaku in mentorju prof. dr. Petru Hostniku.

Hvala članom komisije prof. dr. Andreju Pengovu, znan. sod. dr. Branku Krtu in prof. dr. Josipu Madiču za tehten pregled doktorske naloge in nasvete.

Prav tako se zahvaljujem Eci, Marini in Artei za vso spodbudo.

Zahvaljujem se tudi bratu Andreju za slovensko lektoriranje besedila, dr. Janezu Posediju za pomoč pri statistiki ter mag. Brigiti Grecs Smole za pregled literature.

8. REFERENCE

- Aarestrup FM, Seyfarth AM, Angen Ø (2004). Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. *Vet Microbiol* 101:143-5.
- Abul-Milh M, Paradis SE, Dubreuil JD, Jacques M (1999). Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides to glycosphingolipids evaluated by thin-layer chromatography. *Infecti Immuni* 67(10): 4983-7.
- Ahn K, Chae C, Kweon C-H (1997). Immunohistochemical identification of porcine respiratory coronavirus antigen in the lung of conventional pigs. *Vet Pathol* 34: 167-9.
- Albina E (1997). Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Vet Microbiol* 55: 309-16.
- Allan GM, Ellis JA (2000). Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12: 3-14.
- Allan GM, McNeilly F, Ellis J et al (2000). Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol* 145: 2421-9.
- Andreasen M, Nielsen JP, Bækbo P, Willeberg P, Bøtner A (2000). A longitudinal study of serological patterns of respiratory infections in nine infected danish swine herds. *Prev Vet Med* 45: 221-35.
- Artiushin S, Minion FC (1996). Arbitrarily primed PCR analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates demonstrates genetic heterogeneity. *Int J Sys Bacteriol* 46(1): 324-8.
- Asprocer (2007). Directors of Chilean pig producers' association Asprocer (2007). Chile eradicates PRRS. *Pig Int* 37(8): 8-10.
- Bachmann PA (1989). Swine influenza virus. In: Pensaert MB, ed. *Virus infections of porcines*. Vol 2. Amsterdam: Elsevier Science, 193-203.
- Bae I, Jackwood DJ, Benfield SA, Saif LJ, Wesley RD, Hill H (1991). Differentiation of transmissible gastroenteritis virus from porcine respiratory coronavirus and other antigenically related coronaviruses by using cDNA probes specific for the 5' region of the glycoprotein gene. *J Clin Microbiol* 29(1): 215-8.

Bargen LE (2004). A system response to an outbreak of enzootic pneumonia in grow/finish pigs. *Can Vet J* 45: 856-9.

Batista L, Pijoan C, Torremorell M (2002). Experimental injection of gilts with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) during acclimatization.

J Swine Health Prod 10(4): 147-50.

Baumann G, Bilkei G (2002). Effect of vaccinating sows and their piglets on the development of Glasser's disease induced by virulent strain of *Haemophilus parasuis* serovar 5.

Vet Rec 151: 18-21.

Bautista EM, Faaberg KS, Mickelson D, McGruder ED (2002). Functional properties of the predicted helicase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

Virology 298: 258-70.

Benfield DA, Nelson E, Collins JE et al (1992). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 4: 127-33.

Bertram TA (1988). Pathobiology of acute pulmonary lesions in swine infected with *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Can Vet J* 29: 574-7.

Biberstein EL, White DC (1969). A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. *J Med Microbiol* 2: 75-8.

Bierk MD, Dee SA, Rossow KD, Otake S, Collins JE, Molitor TW (2001). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. *Can J Vet Res* 65: 261-6.

Bochev I (2007). Porcine respiratory disease complex (PRDC): a review. I. Etiology, epidemiology, clinical forms and pathoanatomical features. *Bulg J Vet Med* 10(3): 131-46.

Brockmeier SL (2004). Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine. *Vet Microbiol* 99: 75-8.

Brockmeier SL, Halbur PG, Thacker EL (2002a). Porcine respiratory disease complex. In: Brogdan KA, Guthmiller JM, eds. Polymicrobial diseases. Washington: ASM Press, 231-52.

Brockmeier SL, Lager KM, Palmer MV (2002b). Interactions among porcine reproductive and respiratory system virus (PRRSV), *Bordetella bronchiseptica* and *Haemophilus parasuis*

in swine respiratory disease. In: Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress. Ames, 276.

Brockmeier SL, Loving CL, Nicholson TL, Palmer MV (2008). Coinfection of pigs with porcine respiratory coronavirus in *Bordetella bronchiseptica*. Vet Microbiol 128: 36-47.

Brown IH (2000). The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. Vet Microbiol 74: 29-46.

Brown IH (2003). The molecular epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. In: Proceedings of 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases. Rome, 245-9.

Bruguera S, Llopart D, Riera P (2005). Never neglect influenza! Pig Int 35(9): 6-8.

Bruguera S, Torres MI, Llopart D (2006). PRDC-control by vaccination. Int Pig Topics 21(6): 7-13.

Calsamiglia M, Pijoan C (2000). Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. Vet Rec 146: 530-2.

Calsamiglia M, Collins JE, Pijoan C (2000). Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. Vet Microbiol 76: 299-303.

Calsamiglia M, Fraile L, Espinal A et al. (2007). Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Res Vet Sci 8:299-304.

Castrucci MR, Donatelli I, Sidoli L, Barigazzi G, Kawaoka Y, Webster RG (1993). Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. Virology 193: 503-6.

Cavanagh D, Brien DA, Brinton M et al (1994). Revision of the taxonomy of the *Coronavirus*, *Torovirus* and *Arterivirus* genera. Arch Virol 135: 227-37.

Chae C, Kim O, Min K, Choi C, Kim J, Cho WS (2000). Seroprevalence of porcine respiratory coronavirus in selected Korean pigs. Prev Vet Med 46: 293-6.

Chae C (2005). A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases.

Vet J 169: 326-36.

Chiers K, Haesebrouch F, van Overbeke I, Charlier G, Ducatelle R (1999). Early in vivo interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with tonsils of pigs. *Vet Microbiol* 68: 301-6.

Choi YK, Goyal SM, Kang SW, Farnham MW, Joo HS (2002). Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *J Virol Methods* 102: 53-9.

Choi YK, Goyal SG, Joo HS (2003). Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory disease in pigs. *Can Vet J* 44: 735-7.

Christianson WT, Choi CS, Collins JE, Molitor TW, Morrison RB, Joo HS (1993). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can J Vet Res* 53: 262-8.

Christopher-Hennings J, Faaberg KS, Murtaugh MP (2002). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) diagnostics: interpretation and limitations. *J Swine Health Prod* 10(5): 213-8.

Chung WB, Lin MW, Chang WF, Hsu M, Yang PC (1997). Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in intensive farrow-to-finish pig herds. *Can J Vet Res* 61: 192-8.

Clark LK, Hill MA, Kniffen TS et al. (1994). An evaluation of the components of medicated early weaning. *Swine Health Prod* 2(3): 5-11.

Cobellini LG, Schwermer H, Presi P, Thür B, Stärk KDC, Reist M (2006). Analysis of national serological surveys for the documentation of freedom from porcine reproductive and respiratory syndrome in Switzerland. *Vet Microbiol* 118: 267-73.

Collins JE, Benfield A, Christianson WT et al (1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 4: 117-26.

Costantini V, Lewis P, Alsop J, Templeton C, Saif LJ (2004). Respiratory and fecal shedding of porcine respiratory coronavirus (PRCV) in sentinel weaned pigs and sequence of the partial S-gene of the PRCV isolates. *Arch Virol* 149: 957-74.

- Cunningham G, Desroisiers R, Sanford E (2008). Seroprevalence of PCV2 in Canadian swine herds. In: Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress. Durban, 12.
- Darwich L, Segalés J, Mateu E (2004). Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by *Porcine circovirus 2*: an immune riddle. Arch Virol 149: 857-74.
- DeBey MC, Ross RF (1994). Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. Infect Immun 62(12): 5312-8.
- De Diego M, Laviada M, Enjuanes L, Escribano JM (1992). Epitope specificity of protective lactogenic immunity against swine transmissible gastroenteritis virus. J Virol 66(11): 6502-8.
- Dee SA, Joo HS, Henry S et al (1996). Detecting subpopulations after PRRS virus infection in large breeding herds using multiple serologic tests. Swine Health Prod 4(4): 181-4.
- Dee SA, Joo HS, Polson DD et al (1997). Evaluation of the effects of nursery depopulation on the persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and the productivity of 34 farms. Vet Rec 140: 247-8.
- Dee SA, Philips R (1998). Using vaccination and unidirectional pig flow to control PRRSV transmission. Swine Health Prod 6(1): 21-5.
- Dee SA, Bierk MD, Deen J, Molitor TW (2001a). An evaluation of test and removal for the elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 5 swine farms. Can J Vet Res 65: 22-7.
- Dee SA, Torremorell M, Rossow K, Mahlum C, Otake S, Faaberg K (2001b). Identification of genetically diverse sequences (ORF 5) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a swine herd. Can J Vet Res 65: 254-60.
- Dee SA (2004). Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 30 farms by test and removal. J Swine Health Prod 12(3):129-33.
- Dereu A, Somers F (2007). Why choose chlortetracycline in pigs with porcine respiratory disease complex? A review. Pig J 60: 74-9.
- Desrosiers R (2007). Overview of PCVD-the disease in Eastern Canada & US vs. Europe. Adv Pork Prod 18: 35-46.

Done SH, Paton DJ, White MEC (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): a review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects.

Br Vet J 152(2): 153-74.

Done SH, Brown IH (1998). Swine influenza virus infections-an update. Pig J 41: 189-94.

Done SH (2001). The environment, micro-organisms, anatomy and cellular defence of the respiratory tract: an epithelial battleground. Pig J 47: 205-25.

Done SH (2002). Porcine respiratory disease complex (PRDC). Pig J 50: 174-96.

Done S, White M (2003). Porcine respiratory disease and complexes: the story to date.

In Practi (25): 410-7.

Dreyfus A, Schaller A, Nivollet S et al. (2004). Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. Vet Microbiol 99: 227-38.

Drolet R, Thibault S, D'Allaire S, Thompson JR, Done SH (1999). Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): An overview of the disease. Swine Health Prod 7(6): 283-5.

Duan X, Nauwynck HJ, Pensaert MB (1997). Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV).

Vet Microbiol 56: 9-19.

Duan X, Nauwynck HJ, Favoreel HW, Pensaert MB (1998). Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. J Virol 72(5): 4520-3.

Easterday BC, Van Reeth K (1999). Swine influenza. In: Straw BE, D'Allaire S, eds. Diseases of swine. 8th ed. Ames: Blackwell Publishing, 277-85.

Fano E, Pijoan C, Dee S (2005). Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. Can J Vet Res 69: 223-8.

Feld NC, Qvist P, Ahrens P, Friis NF, Meyling A (1992). A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Microbiol 30 (1): 35-46.

Feng W-H, Laster SM, Tompkins M et al (2001). In utero infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus is sufficient to increase susceptibility of piglets to challenge by *Streptococcus suis* tip II. J Virol 75(10): 4889-95.

Fittipaldi N, Broes A, Harel J, Kobisch M, Gottschalk M (2003). Evaluation and field validation of PCR tests for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in subclinically infected pigs. J Clin Microbiol 41(11): 5085-93.

Flori J, Mousing J, Gardner I, Willeberg P, Have P (1995). Risk factors associated with seropositivity to porcine respiratory coronavirus in danish swine herds. Prev Vet Med 25: 51-62.

Fraile L, Perez de Rozas A, Gauset X, Badiola I (2008). Optimization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) treatment taking into account PK7PD parameters under field conditions. In: Proceeding of the 20th International Pig Veterinary Society Congress. Durban, 120.

Frank RK, Chengappa MM, Oberst RD, Hennessy KJ, Henry SC, Fenwick B (1992). Pleuropneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 in growing and finishing pigs. J Vet Diagn Invest 4: 270-8.

Freese WR, Joo HS (1994). Cessation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus spread in a commercial swine herd. Swine Health Prod 2(1): 13-5.

Frey J (2002). Detection, identification and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Methods Mol Biol 216: 87-95.

Gagné A, Lacouture S, Broes A, D'Allaire S, Gottschalk M (1998). Development of an immunomagnetic method for selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils. J Clin Microbiol 36(1): 251-4.

Gilbride KA, Rosendal S (1984). Antibicrobial susceptibility of 51 strains of *Haemophilus pleuropneumoniae*. Can J Comp Med 48: 47-50.

Gjestvang M, Lium B, Framstad T (2008). A field trial to eradicate *Actinobacillus pleuropneumoniae* from seropositive herds using double-dose injections with enrofloxacin (Baytril®) and in-feed medication with tiamulin (Tiamutin®). In: Proceeding of the 20th International Pig Veterinary Society Congress. Durban, 118.

Golar I (2002). Porcine respiratory disease complex (PRDC) in Slovenia, preliminary results. In: Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress. Ames, 325.

Golar Oven I, Valenčak Z (2006). Porcine respiratory disease complex (PRDC) in Slovenia. In: Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress. Copenhagen, 291.

Golar Oven I (2007). Razširjenost prašičje influence na velikih farmah prašičev v Sloveniji. Ljubljana: Veterinarska fakulteta. Magistrska naloga.

Gottschalk M, Taylor DJ (2006). *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Straw BE, Zimmerman JJ, eds. Diseases of swine. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing, 563-76.

Granell EM. Porcine respiratory disease complex (PRDC) in the EU (2006). In: Meeting of the worldwide challenge of PRDC. Copenhagen: Schering-Plough Animal Health, 6-10.

Grøndahl-Hansen J, Barfod K, Klausen J, Andresen LO, Heegaard PMH, Sørensen V (2003). Development and evaluation of a mixed long-chain lipopolysaccharide based ELISA for serological surveillance of infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 6 and 12 in pig herds. Vet Microbiol 96: 41-51.

Gundersen DE, Lee IM, Rehner SA, Davis RE, Kingsbury DT (1994). Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. J Bacteriol 176(17): 5244-54.

Haesebrouck F, Van de Kerkhof A, Dom P, Chiers K, Ducatelle R (1996). Cross-protection between *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotypes-serotypes in pigs. Vet Microbiol 52: 277-84.

Haesebrouck F, Chiers K, Van Overbeke I, Ducatelle R (1997). *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. Vet Microbiol 58: 239-49.

Halbur PG, Paul PS, Vaughn EM, Andrews JJ (1993). Experimental reproduction of pneumonia in gnotobiotic pigs with porcine respiratory coronavirus isolate AR310. J Vet Diagn Invest 5: 184-8.

Halbur PG, Paul PS, Frey ML et al (1996). Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. Vet Pathol 33: 159-70.

Harms PA, Halbur PG, Sorden SD (2002). Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J Swine Health Prod* 10(1): 27-30.

Hege R, Zimmermann W, Scheidegger R, Stärk KDC (2002). Incidence of reinfections with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pig farms located in respiratory-disease-free regions of Switzerland. *Acta Vet Scand* 43:145-56.

Heinen P (2003). Swine influenza: a zoonosis.

<http://www.vetscite.org/publish/artecles/000041/print.html> (10.5.2010)

Holko I, Urbanova J, Holkova T, Kmet V (2004). Diagnostics of main bacterial agents of porcine respiratory disease complex (PRDC) using PCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Med Czech* 49(2): 35-41.

Horter DC, Pogranichniy RM, Chang CC, Evans RB, Yoon KJ, Zimmerman JJ (2002). Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Microbiol* 86: 213-28.

Hsu T, Minion FC (1998). Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect Immun* 66(10): 4762-6.

Ito T, Couceiro NSS, Kelm S et al (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 72(9): 7367-73.

Jabrane A, Elazhary Y, Talbot BG, Ethier R, Dubuc C, Assaf R (1992). Porcine respiratory coronavirus in Quebec: serological studies using a competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Can Vet J* 33: 727-33.

Jabrane A, Girard C, Elazhary Y (1994). Pathogenicity of porcine respiratory coronavirus isolated in Quebec. *Can Vet J* Volume 35: 86-92.

Jessing SG, Angen Ø, Inzana TJ (2003). Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5, and 6. *J Clin Microbiol* 41(9): 4095-100.

Jirawattanapong P, Stockhofe-Zurwieden N, van Leengoed L et al (2010). Pleuritis in slaughter pigs: Relations between lung lesions and bacteriology in 10 herds with high pleuritis. *Res Vet Sci* 88(1): 11-5.

Joo HS, Park BK, Dee SA, Pijoan C (1997). Indirect fluorescent IgM antibody response of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

Vet Microbiol 55: 303-7.

Kielstein P, Rapp-Gabrielson VJ (1992). Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts.

J Clin Microbiol 30(4): 862-5.

Kielstein P, Wuthe H-H, Angen Ø, Mutters R, Ahrens P (2001). Phenotypic and genetic characterization of NAD-dependant *Pasteurellaceae* from respiratory tract of pigs and their possible pathogenic importance. Vet Microbiol 81: 243-55.

Kim L, Chang K-O, Sestak K, Parwani A, Saif LJ (2000). Development of a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay for differential diagnosis of transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus from feces and nasal swabs of infected pigs. J Vet Diagn Invest 12: 385-8.

Kobisch M (2001). *M. hyo* detection. Pig Prog 17 (Spec Iss, June): 12-3.

Krakowka S, Rings M, Ellis JA et al. (2003). The Pathogenesis of PCV2 infection and PMWS. In: PCV2 diseases: intimate relationships between host and pathogen & a close-up on Asia. Merial 1st APVS. Seoul, 9-24.

Kristensen CS, Angen Ø, Andreasen M, Takai H, Nielsen JP, Jorsal SE (2004). Demonstration of airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 between simulated pig units located at close range. Vet Microbiol 98: 243-9.

Kume K, Nakai T, Sawata A (1984). Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from the nasal cavities of healthy pigs. Jpn J Vet Sci 46(5): 641-7.

Labarque GG, Nauwynck HJ, Van Reeth K, Pensaert MB (2000). Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. J Gen Virol 81: 1327-34.

Lacouture S, Mittal KR, Jacques M, Gottschalk M (1997). Serotyping *Actinobacillus pleuropneumoniae* by the use of monoclonal antibodies. J Vet Diagn Invest 9: 337-41.

Lager KM, Mengeling WL, Brockmeier SL (1996). Effect of post-coital intrauterine inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on conception in gilts. *Vet Rec* 138: 227-8.

Lager KM, Mengeling WL, Brockmeier SL (1997). Duration of homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet Microbiol* 58: 127-33.

Lang C, Dürrwald R, Herwig V (2006). Serological analysis methods for swine influenza virus in field sera – correlations of hemagglutination inhibition test and ELISA. In: *Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress*. Copenhagen, 129.

Larochelle R, Magar R, D'Allaire S (2003). Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 67(2): 114-20.

Larsen DL, Karasin A, Zuckermann F, Olsen CW (2000). Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. *Vet Microbiol* 74(1-2): 117-31.

Lee BW, Bey RF, Baarsch MJ, Larson ME (1995). Class specific antibody response to influenza A H1N1 infection in swine. *Vet Microbiol* 43: 241-50.

Leon EA, Madec F, Taylor NM, Kobisch M (2001). Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from farrow-to-finish farms. *Vet Microbiol* 78: 331-41.

López Fuertes L, Doménech N, Alvarez B et al (1999). Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res* 64: 33-42.

Maes D (2001). Enzootic pneumonia control. *Pig Prog* 17 (Spec Iss, June): 8-10.

Maldonado J, Van Reeth K, Riera P et al (2006). Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain. *Vet J* 172 (2): 377-81.

Marois C, Gottschalk M, Morvan H, Fablet C, Madec F, Kobisch M (2009). Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 135: 283-91.

Marsteller TA, Fenwick B (1999). *Actinobacillus pleuropneumoniae* disease and serology. Swine Health Prod 7(4): 161-5.

Martín de la Fuente AJ, Tucker AW, Navas J, Blanco M, Morris SJ, Gutiérrez- Martín CB (2007). Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. Vet Microb 120: 184-91.

Mateusen B, Maes D, Hoflack G, Verdonck M, De Kruif A (2001). A comparative study of the preventive use of tilmicosin phosphate (Pulmotil premix®) and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in a pig herd with chronic respiratory disease. J Vet Med B 48: 733-41.

Meng XJ (2000). Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. Vet Microbiol 74: 309-29.

Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC (1996). Alveolar macrophages as a diagnostic sample for detecting natural infection of pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Vet Diagn Invest 8: 238-40.

Mengeling WL (2003). How viruses change. In: Proceedings of 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases. Rome, 3-8.

Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC, Clouser DF (2003). Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccine for porcine reproductive and respiratory syndrome. Vet Microbiol 93: 25-38.

Mesu AP, Labarque GG, Nauwynck HJ, Pensaert MB (2000). Seroprevalence of porcine circovirus types 1 and 2 in the Belgian pig population. Vet Q 22(4): 234-6.

Miller GY, Song Y, Bahnson PB (2001). An economic model for estimating batch finishing system profitability with an application in estimating the impact of preventive measures for porcine respiratory disease complex. J Swine Health Prod 9(4): 169-77.

Mittal KR, Higgins R, Larivière S (1983). Detection of type-specific antigens in the lungs of *Haemophilus pleuropneumoniae*-infected pigs by coagglutination test. J Clin Microbiol 18(6): 1355-7.

Mozdzanowska K, Maiese K, Furchner M, Gerhard W (1999). Treatment of influenza virus-infected SCID mice with nonneutralizing antibodies specific for the transmembrane proteins matrix 2 and neuraminidase reduces the pulmonary virus titer but fails to clear the infection. *Virology* 254: 138-46.

Murtaugh MP, Xiao Z, Zuckermann F (2002). Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol* 15(4): 533-47.

Nedbalcova K, Satran P, Jaglic Z, Ondriasova R, Kucerova Z (2006). *Haemophilus parasuis* and Glässer's disease in pigs: a review. *Vet Med Czech* 51(5): 168-79.

Nicolet J (1988). Taxonomy and serological identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can Vet J* 29: 578-80.

Nielsen R, Andresen LO, Plambeck T, Nielsen JP, Krarup LT, Jorsal SE (1997). Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds. *Vet Microbiol* 54: 35-46.

Nielson R, Van den Bosch J, Plambeck T, Sørensen V, Nielsen JP (2000). Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* 71: 81-7.

Nigrelli AD, Rosignoli C, Faccini S (2008). Gross pathology and pathogens in weaned piglets in Italian swine farms (years 2004-2005). In: Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress. Durban, 560.

Oleksiewicz MB, Bøtner A, Toft P, Normann P, Storgaard T (2001). Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. *J Virol* 75(7): 3277-90.

Oliveira S, Galina L, Pijoan C (2001). Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *J Vet Diagn Invest* 13: 495-501.

Oliveira S, Pijoan C (2002). Diagnosis of *Haemophilus parasuis* in affected herds and use of epidemiological data to control disease. *J Swine Health Prod* 10(5): 221-5.

Oliveira S, Pijoan C (2004). *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Vet Microbiol* 99: 1-12.

Oliveira S, Pijoan C, Morrison R (2004). Evaluation of *Haemophilus parasuis* control in the nursery using vaccination and controlled exposure. J Swine Health Prod 12(3):123-8.

Olsen CW, Brown IH, Easterday BC, Van Reeth K (2006). Swine influenza. In: Straw BE, Zimmerman JJ, eds. Diseases of swine. 9th ed. Ames: Iowa State university Press, 469-82.

Opriessnig T, Yu S, Thacker EL, Halbur PG (2004a). Derivation of porcine circovirus type 2-negative pigs from positive breeding herds. J Swine Health Prod 12: 186-91.

Opriessnig T, Thacker EL, Yu S, Fenaux M, Meng X-J, Halbur PG (2004b). Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. Vet Pathol 41: 624-40.

Opriessnig T, Meng X-J, Halbur PG (2007). Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. J Vet Diagn Invest 19: 591-615.

Opriessnig T, Patterson AR, Elsener J, Meng XJ, Halbur PG (2008). Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. Clin Vaccine Immunol 15(3): 397-401.

Otake S, Dee SA, Rossow KD et al (2002a). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by fomites (boots and coveralls). J Swine Health Prod 10(2): 59-65.

Otake S, Dee SA, Jacobson L, Torremorell M, Pijoan C (2002b). Evaluation of aerosol transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under controlled field conditions. Vet Rec 150: 804-8.

Paradis MA, Vessie GH, Merrill JK et al. (2004). Efficacy of tilmicosin in the control of experimentally induced *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine. Can J Vet Res 68: 7-11.

Pensaert M (1995). Swine influenza. Pigs-Misset 11(June): 8-9.

Podgorska K, Stadejek T, Porowski M, Jablonski A, Pejsak Z (2008). PCV2 viremia and seroconversion in pigs from PMWS affected farm. In: Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress. Durban, 20.

Quintana J, Segalés J, Rosell C (2001). Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec* 149: 357-61.

Rafiee M, Bara M, Stephens CP, Blackall PJ (2000). Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. *Aust Vet J* 78(12): 846-9.

Rapp-Gabrielson VJ, Oliveira SR, Pijoan C (2006). *Haemophilus parasuis*. In: Straw BE, Zimmerman JJ, eds. Diseases of swine. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing, 681-90.

Rautiainen E, Virtala AM, Wallgren P, Saloniemi H (2000). Varying effect of infections with *Mycoplasma hyopneumoniae* on the weight gain recorded in three different multisource fattening pig herds. *J Vet Med B* 47: 461-9.

Razin S, Yogev D, Naot Y (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(4): 1094-156.

Rodríguez-Arriola GM, Segalés J, Calsamiglia M et al. (2002). Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* 63(3): 354-7.

Ropp SL, Mahlum Wees CE, Fang Y et al (2004). Characterization of emerging european-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *J Virol* 78(7): 3684-703.

Rose N, Larour G, Le Digerher G et al. (2003). Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French Farrow-to-finish herds. *Prev Vet Med* 61: 209-25.

Rossow KD, Bautista EM, Goyal SM et al (1994). Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J Vet Diagn Invest* 6: 3-12.

Roth JA, Thacker EL (2006). Immune system. In: Straw BE, Zimmerman JJ, eds. Diseases of swine. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing, 15-35.

Rowland RRR, Lawson S, Rossow K, Benfield DA (2003). Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. *Vet Microbiol* 96(3): 219-35.

Royer RL, Nawagitgul P, Halbur PG, Paul PS (2001). Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *J Swine Health Prod* 9(6): 281-4.

Ruiz-Fons F, Vicence J, Vidal D et al (2006). Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology* 65: 731-43.

Saif LJ, Sestak K (2006). Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus. In: Straw BE, Zimmerman JJ, eds. *Diseases of swine*. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing, 489-516.

Savic B, Ivetic V, Zutic M, Radanovic O, Pavlovic I (2008). Prevalence of infective agents in porcine respiratory disease complex (PRDC) in fattening pigs in Serbia. In: *Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress*. Durban, 385.

Schmoll F, Lang C, Dürrwald R (2006). Restrictions of commercial swine influenza ELISA kits for subtype-specific differentiation of swine influenza A-viruses. In: *Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress*. Copenhagen, 135.

Schmoll F, Lang C, Steinrigl AS, Schulze K, Kauffold J (2008). Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology* 69: 814-21.

Segalés J, Domingo M, Solano GI, Pijoan C (1997). Immunohistochemical detection of *Haemophilus parasuis* serovar 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of experimentally infected swine. *J Vet Diagn Invest* 9: 237-43.

Segalés J (2002). European perspective of respiratory diseases. *Pig Prog* 18 (Spec Iss, June): 4-6.

Segalés J, Calsamiglia M, Domingo M (2003). How we diagnose postweaning multisystemic wasting syndrome. In: *Proceedings of the 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*. Rome, 149-51.

Segalés J, Rosell C, Domingo M (2004). Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol* 98(2):137-49.

Segalés J, Allan GM, Domingo M (2006). Porcine circovirus diseases. In: Straw BE, Zimmerman JJ, eds. *Diseases of swine*. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing, 299-307.

Sestak K, Zhou Z, Shoup DI, Saif LJ (1999). Evaluation of the baculovirus-expressed S glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) as antigen in a competition ELISA to differentiate porcine respiratory coronavirus from TGEV antibodies in pigs.

J Vet Diagn Invest 11: 205-14.

Shibata I, Okada M, Uruno K et al (1998). Experimental dual infection of cesarean-derived pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* and pseudorabies virus. J Vet Med Sci 60(3): 295-300.

Shibata I, Yazawa S, Ono M, Okuda Y (2003). Experimental dual infection of specific pathogen-free pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and pseudorabies virus. J Vet Med B 50: 14-9.

Shope RE (1964). Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology, and pathology. J Exp Med 119: 357-68.

Smart NL, Miniats OP, Rosendal S, Friendship RM (1989). Glasser's disease and prevalence of subclinical infection with *Haemophilus parasuis* in swine in southern Ontario.

Can Vet J 30: 339-43.

Smart NL, Hurnik D, MacInnes JI (1993). An investigation of enzootic Glasser's disease in a specific-pathogen-free grower-finisher facility using restriction endonuclease analysis.

Can Vet J 34: 487-90.

Solano GI, Segalés j, Collins JE, Moltor TW, Pijoan C (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) interaction with *Haemophilus parasuis*.

Vet Microbiol 55: 247-57.

Sørensen V, Ahrens P, Barfod K et al (1997). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. Vet Microbiol 54: 23-34.

Sørensen V, Jorsal SE, Mousing J (2006). Diseases of the respiratory system. In: Straw BE, Zimmerman JJ, eds. Diseases of swine. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing, 149-77.

Stakenborg T, Vicca J, Butaye P et al (2006). A multiplex PCR to identify porcine mycoplasmas present in broth cultures. Vet Res Communi 30: 239-47.

Stärk KDC, Nicolet J, Frey J (1998). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. Appl Environ Microbiol 64(2): 543-8.

Stärk KDC (2000). Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine: a literature review. *Vet J* 159: 37-56.

Stipkovits L, Miller D, Glavits R, Fodor L, Burch D (2001). Treatment of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* with various antibiotics. *Can J Vet Res* 65: 213-22.

Strajn B (2001). Protitelesa proti *Mycoplasma hyopneumoniae* pri plemenskih svinjah na velikih farmah v Sloveniji. Ljubljana: Veterinarska fakulteta. Magistrsko delo.

Sur JH, Doster AR, Christian JS et al (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induce germ cell death by apoptosis. *J Virol* 71(12): 9170-9.

Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ et al (1994). Artificial insemination of gilts with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus-contaminated semen. *Swine Health Prod* 2(6): 19-23.

Swenson SL, Johnson E, Eernisse K (2001). Swine influenza surveillance in the United States: NAHMS 2000. In: Allen D. Lemans Swine Conference: tracking and managing SIV: new perspectives for better management. Minnesota: College of Veterinary medicine. 16-9.

Swenson SL, Foley PL (2004). Swine influenza. In: OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5th ed. Part 2. Paris: Office International des Epizooties, 1111-9.

Szancer J (2008). Attempts to eradicate some respiratory and enteric pathogens in danish pig farms. *Pig J* 61: 1-5.

Šabec D (2002). Barvni atlas o boleznih prašičev. Ljubljana: Littera picta, 22.

Tadjine M, Mittal KR, Bourdon S, Gottschalk (2004). Development of a new serological test for serotyping *Haemophilus parasuis* isolates and determination of their prevalence in North America. *J Clin Microbiol* 42(2): 839-40.

Taylor JD (1996). The lungs. In: Sims LD, Glastonbury JRW eds. Pathology of the pig-a diagnostic guide. Victoria: D.G. Walker Pty, 219-36.

Taylor DJ (2006a). Pig diseases. 8th ed. Suffolk: St Edmundsbury Press, 68-72.

Taylor DJ (2006b). Pig diseases. 8th ed. Suffolk: St Edmundsbury Press, 48-52.

Taylor DJ (2006c). Pig diseases. 8th ed. Suffolk: St Edmundsbury Press, 39-40.

Taylor (2006d). Pig diseases. 8th ed. Suffolk: St Edmundsbury Press, 60-8.

Taylor DJ (2006e). Pig diseases. 8th ed. Suffolk: St Edmundsbury Press, 178-87.

Taylor DJ (2006f). Pig diseases. 8th ed. Suffolk: St Edmundsbury Press, 207-13.

Terrini M (2005). An unexpected serology profile after swine influenza virus (SIV) infection in a porcine respiratory disease complex (PRDC) outbreak. *Pig J* 56: 161-4.

Thacker EL, Halbur PG, Ross RF, Thanawongnuwech R, Thacker BJ (1999). *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol* 37(3): 620-7.

Thacker EL, Thacker BJ, Young TF, Halbur PG (2000). Effect of vaccination of the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine* 18:1244-52.

Thacker EL (2001). Porcine respiratory disease complex-what is it and why does it remain a problem? *Pig J* 48: 66-70.

Thacker EL, Thacker BJ, Janke BH (2001). Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *J Clin Microbiol* 39(7): 2525-30.

Thacker E, Thanawongnuwech R (2002). Porcine respiratory disease complex (PRDC).

Thai J Vet Med 32: 125-34.

Thacker EL (2004). Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*.

J Swine Health Prod 12(5): 252-4.

Thacker EL (2006). Mycoplasmal Diseases. In: Straw BE, Zimmerman JJ, eds. Diseases of swine. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing, 701-17.

Thanawongnuwech R, Young TF, Thacker BJ, Thacker EL (2001). Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. *Vet Immunol Immunol* 79: 115-27.

Tielen M (1995). Respiratory diseases in pigs: prevalence and economical effect.

Pigs-Misset 11(June): 4-5.

Tischer I, Bode L, Peters D, Pociuli S, Germann B (1995). Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine population of different breednig farms. Arch Virol 140: 737-43.

Torremorell M, Christianson WT (2002). PRRS eradication by herd closure.

Adv Pork Prod 13: 169-76.

Torremorell M, Moore C, Christianson WT (2002). Establishment of a herd negative for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRSV-positive sources. J Swine Health Prod 10(4): 153-60.

Trifonov V, Khiabanian H, Rabadan R (2009). Geographic dependance, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus. N Engl J Med 361(2): 115-9.

Vahle JL, Haynes JS, Andrews JJ (1995). Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* in swine: clinical, bacteriologic, and morphologic findings.

J Vet Diagn Invest 7(4): 476-80.

Vahle JL, Haynes JS, Andrews JJ (1997). Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and tracheal mucosa following intanasal inoculation of cesarean derived colostrum deprived (CdCd) swine. Can J Vet Res 61: 200-6.

Valenčak Z, Martinjak M (2005). Attempt to control postweaning multisystemic wasting syndrome on large pig farm with serum therapy. Prax Vet 53 (1/2): 55-70.

Van Alstine WG, Kanitz CL, Stevenson GW (1993). Time and temperature survivability of PRRS virus in serum and tissues. J Vet Diagn Invest 5: 621-2.

Van Alstine WG, Popielarczyk M, Albregts SR (2002). Effect of formalin fixation on the immunohistochemical detection of PRRS virus antigen in experimentally and naturally infected pigs. J Vet Diagn Invest 14: 504-7.

Van den Bosch H, Frey J (2003). Interference of outer membrane protein PalA with protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in vaccinated pigs.

Vaccine 21: 3601-7.

Van Reeth K (2000). Cytokines in the pathogenesis of influenza.

Vet Microbiol 74(1/2): 109-16.

Van Reeth K, Labarque G; Pensaert M (2003). The establishment of an H1N2 influenza virus in the European swine population and its impact on prevention and control. In: Proceedings of 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases. Rome, 250-3.

Van Reeth K, De Vleeschauwer A, Kyriakis C, Pensaert (2006a). Influenza in birds, pigs and humans: old theories versus current viewpoints. In: Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress. Copenhagen, 26-35.

Van Reeth K, Labarque G, Kyriakis CS, Pensaert M (2006b). Specificity of the haemagglutination inhibition (HI) test for the detection of infection with European H1N1, H3N2 and H1N2 swine influenza virus: lessons from experimental studies. In: Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress. Copenhagen, 263.

Van Overbeke I, Chiers K, Ducatelle R, Haesebrouck F (2001). Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with a vaccine containing Apx toxins and transferrin-binding proteins. J Vet Med B 48: 15-20.

Van Overbeke I, Chiers K, Charlier G et al (2002). Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. Vet Microbiol 88: 59-74.

Van Vugt JJFA, Storgaard T, Oleksiewicz MB, Bøtner A (2001). High frequency RNA recombination in porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs preferentially between parental sequences with high similarity. J Gen Virol 82: 2615-20.

Vicca J, Stakenborg T, Maes D et al (2003). Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. Vet Microbiol 97: 177-90.

Vicente J, Segalés J, Höfle U et al. (2004). Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). Vet Res 35: 243-53.

Vigre H, Angen Ø, Barfod K, Lavritsen DT, Sørensen V (2002). Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs under field-like conditions: emphasis on tonsillar colonisation and passively acquired colostral antibodies. Vet Microbiol 89: 151-9.

Vigre H, Ersbøll AK, Sørensen V (2003). Decay of acquired colostral antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. J Vet Med B 50:430-5.

- Wallgren P, Bölske G, Gustafsson S, Mattsson S, Fossum C (1998). Humoral immune responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* in sows and offspring following an outbreak of mycoplasmosis. *Vet Microbiol* 60: 193-205.
- Wesley RD, Woods RD, Hill HT, Biwer JD (1990). Evidence for a porcine respiratory coronavirus, antigenically similar to transmissible gastroenteritis virus, in the United States. *J Vet Diagn Invest* 2: 312-7.
- Wesley RD, Woods RD, McKean JD, Senn MK, Elazhary Y (1997). Prevalence of coronavirus antibodies in Iowa swine. *Can J Vet Res* 61: 305-8.
- Wesley RD (2004). Exposure of sero-positive gilts to swine influenza virus may cause a few stillbirths per litter. *Can J Vet Res* 68: 215-7.
- White MEC (1992). PRRS: clinical update. *Pig Vet J* 29: 179-87.
- Whittaker GR (2001). Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 3(5): 1-13.
- Willis RW, Zimmerman JJ, Yoon K-J et al (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet Microbiol* 55: 231-40.
- Wilson RW, Kierstead M (1976). *Haemophilus parahemolyticus* associated with abortion in swine. *Can Vet J* 17(8): 222.
- Yagihashi T, Kazama S, Tajima M (1993). Seroepidemiology of mycoplasmal pneumonia of swine in Japan as surveyed by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Microbiol* 34: 155-66.
- Young TF, Thacker EL, Erickson BZ, Ross RF (2000). A tissue culture system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. *Vet Microbiol* 71: 269-79.
- Zhang Y, Tennent JM, Ingham A, Beddome G, Prideaux C, Michalski WP (2000). Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 189: 15-8.

Zimmerman J, Benfield DA, Murtaugh MP, Osorio F, Stevenson GW, Torremorell M (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Porcine Arterivirus). In: Straw BE, Zimmerman JJ, eds. Diseases of swine. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing, 387-417.