

Univerza
v Ljubljani
Veterinarska
fakulteta



Marina Štukelj

ELIMINACIJA PRAŠIČJEGA REPRODUKCIJSKEGA IN RESPIRATORNEGA
SINDROMA (PRRS) Z NARAVNO PREKUŽITVIJO, SERUMIZACIJO IN
VAKCINACIJO

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2013



UDK 636.4.09:616.13-002:578.76.577.2(043.3)(497.12)

mag. Marina Štukelj, dr. vet. med.

ELIMINACIJA PRAŠIČJEGA REPRODUKCIJSKEGA IN RESPIRATORNEGA
SINDROMA (PRRS) Z NARAVNO PREKUŽITVIJO, SERUMIZACIJO IN
VAKCINACIJO

Doktorska disertacija

ELIMINATION OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME
(PRRS) WITH NATURAL EXPOSURE, SERUMIZATION AND VACCINATION

Doctoral thesis

Ljubljana, 2013

Mag. Marina Štukelj

Eliminacija prašičjega reproduksijskega in respiratornega sindroma (PRRS) z naravno prekužitvijo, serumizacijo in vakcinacijo

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

Javni zagovor je bil opravljen dne:

Mentor: doc. dr. Zdravko Valenčak

Somentor: viš. zn. sod. dr. Ivan Toplak

Izjava o delu:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in da nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine.

Člani strokovne komisije za oceno zagovora:

Predsednica: doc. dr. Breda Jakovac Strajn

Član: prof. dr. Peter Hostnik

Član: prof. dr. Josip Madić

Numquam invenietur, si contenti fuerimus inventis.

Marcus Lucius Annaeus Seneca

Izvleček

Ključne besede: Prašiči, bolezni – epidemiologija; prašičji reprodukcijski in respiratori sindrom – diagnostika; molekularne diagnostične tehnike – metode; virus prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma – izolacija in čiščenje – klasifikacija; encimskoimunski test; reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo; cepljenje; prašiči; Slovenija

V Sloveniji je približno polovica prašičjih farm okuženih z virusom prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma (PRRS). PRRS vpliva na dobrobit prašičev in na ekonomske parametre.

Namen dela je bil ovrednotiti tri različne metode za dosego eliminacije PRRS z zaporednimi laboratorijskimi testiranjami.

V študijo smo vključili devet na PRRS pozitivnih farm. Poleg uvedbe predpisanih biovarnostnih ukrepov in dvojne zapore reje smo na treh farmah uporabili metodo naravne prekužitve, na treh farmah metodo serumizacije in na treh farmah vakcinacijo. Za serumizacijo smo uporabili inokulum, pripravljen iz serumov tekačev, pozitivnih na virus PRRS iz iste farme. Vakcinacijo smo izvedli s komercialno vakcino. Z ELISA smo pregledovali plemensko čredo in pitance, z metodo RT-PCR pa smo ugotavljali prisotnost nukleinske kisline virusa PRRS. Pozitivnim vzorcem iz šestih farm smo določili nukleotidno zaporedje v odseku gena, ki kodira protein nukleokapside (ORF 7).

Z naravno prekužitvijo smo na dveh farmah eliminirali PRRS, na eni farmi pa ne, ker rejec ni izvajal predpisanih biovarnostnih ukrepov. Eliminacije s serumizacijo nismo dosegli na dveh farmah, ker niso izvajali dvojne zapore reje, niti sistema reje »all in/all out«. Tudi kategorij prašičev niso imeli ločenih po prostorih. Na eni farmi, kjer so izvajali vse predpisane biovarnostne ukrepe, dvanajst mesecev po serumizaciji nismo več dokazali nukleinske kisline virusa PRRS pri nobeni kategoriji prašičev. Eliminacije PRRS z vakcinacijo nismo dosegli na nobeni farmi. Na farmah smo ugotavljali pomanjkljivo izvajanje biovarnostnih ukrepov. Prvič v Sloveniji smo izolirali virus PRRS.

Abstract

Key words: Swine diseases – epidemiology; porcine reproductive and respiratory syndrome – diagnosis; molecular diagnostic techniques – methods; porcine reproductive and respiratory syndrome virus – isolation and purification – classification; enzyme-linked immunosorbent assay; reverse transcriptase polymerase chain reaction; vaccination; swine; Slovenia

In Slovenia, approximately half of the pig farms have been found positive for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). PRRS has economic and welfare effects.

The aim of this study was the evaluation of the three different ways of eliminating PRRS, with consequent laboratory testing.

In the study, nine PRRS-positive farms were included. On all farms, biosecurity measures and double-herd closure were required. Natural exposure was used on three farms; on three other farms, serumization was used; on the last three farms vaccination was used. For serumization, inoculum made from the sera of weaners from the same farm was used. For vaccination, a commercial vaccine was used. Breeding herds and fatteneres were tested with ELISA, while RT-PCR for the detection of PRRS nucleic acid of PRRS was used. The PRRS viruses from six positive farms were direct sequences of the amplified part of ORF 7.

Natural exposure elimination was successful on two farms. Elimination failed on the farms where biosecurity measures were not implemented. Elimination with serumization failed on two farms where they did not implement double-herd closure or all in/all out systems, and pig categories were not separated. On one farm, where all required biosecurity measures were implemented twelve months after serumization, all categories of pigs were without PRRS nucleic acid. Elimination of PRRS on vaccinated farms did not succeed because biosecurity measures in the farms were not implemented. For the first time in Slovenia, the PRRS virus was isolated in a primary cell culture of pulmonary alveolar macrophages.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK.....	5
ABSTRACT	7
KAZALO VSEBINE	9
KAZALO SLIK	13
SEZNAM OKRAJŠAV.....	17
1 UVOD	19
1.1 NAMEN DELA, CILJ IN DELOVNE HIPOTEZE	21
2 PREGLED LITERATURE	23
2.1 ETIOLOGIJA	23
2.1.1 Zgodovina bolezni	23
2.1.2 Taksonomija in značilnosti virusa	23
2.1.3 Organizacija genoma	24
2.1.4 Raznolikost genoma	25
2.2 EPIDEMIOLOGIJA.....	29
2.2.1 Prenos znotraj črede	29
2.2.2 Prenos med čredami	31
2.3 PATOGENEZA	32
2.3.1 Akutna faza	32
2.3.2 Endemična faza	33
2.3.3 Hkratna okužba z drugimi patogenimi mikrobi	34
2.4 KLINIČNA ZNAMENJA	35
2.4.1 Klinična znamenja akutne bolezni.....	36
2.4.2 Klinična znamenja v endemičnem obdobju bolezni	37
2.5 PATOMORFOLOŠKE SPREMEMBE.....	39
2.5.1 Makroskopske spremembe	39
2.5.2 Mikroskopske spremembe	40
2.6 IMUNSKI ODZIV PRI OKUŽBI Z VIRUSOM PRRS.....	40
2.6.1 Protitelesna imunost	42
2.6.2 Celična imunost.....	43

2.6.3	Navzkrižna zaščita	46
2.6.4	Maternalna imunost	48
2.6.5	Imunosupresija.....	48
2.7	DIAGNOSTIKA	49
2.7.1	Dokaz virusa	50
2.7.2	Dokaz protiteles	52
2.8	UKREPI OB POJAVU PRRS	54
2.8.1	Biovarnost.....	54
2.8.2	Kontrola bolezni	58
2.8.3	Eliminacija bolezni	60
2.8.4	Ukrepanje ob pojavu PRRS v svetu.....	66
2.8.5	PRRS v Sloveniji	67
2.8.6	Zakonodaja o PRRS v Evropi in v Sloveniji	68
3	MATERIAL IN METODE.....	69
3.1	MATERIAL.....	69
3.1.1	Farme	69
3.1.2	Serumi.....	72
3.1.3	Inokulum za serumizacijo	72
3.1.4	Vakcina.....	72
3.2	METODE.....	73
3.2.1	Odvzem vzorcev	73
3.2.2	Vzorčenje.....	73
3.2.3	Priprava serumov	73
3.2.4	Zapora reje.....	73
3.2.5	Biovarnostni ukrepi	73
3.2.6	Naravna prekužitev	76
3.2.7	Serumizacija	76
3.2.8	Vakcinacija	76
3.2.9	Testi	76
3.2.10	Statistična obdelava	84
4	REZULTATI.....	85
4.1	REZULTATI S FARME 1	85
4.1.1	Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 1	85
4.1.2	Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 1	88
4.1.3	Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 1	89
4.1.4	Biovarnostni ukrepi na farmi 1	90
4.2	REZULTATI S FARME 2	93
4.2.1	Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 2	93
4.2.2	Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 2	96

4.2.3	Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 2	97
4.2.4	Biovarnostni ukrepi na farmi 2	98
4.3	REZULTATI S FARME 3	101
4.3.1	Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 3	101
4.3.2	Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 3	104
4.3.3	Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 3	105
4.3.4	Biovarnostni ukrepi na farmi 3	106
4.4	REZULTATI S FARME 4	109
4.4.1	Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 4	109
4.4.2	Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 4	116
4.4.3	Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 4	117
4.4.4	Biovarnostni ukrepi na farmi 4	119
4.5	REZULTATI S FARME 5	122
4.5.1	Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 5	122
4.5.2	Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 5	129
4.5.3	Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 5	130
4.5.4	Biovarnostni ukrepi na farmi 5	133
4.6	REZULTATI S FARME 6	136
4.6.1	Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 6	136
4.6.2	Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 6	143
4.6.3	Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 6	144
4.6.4	Biovarnostni ukrepi na farmi 6	146
4.7	REZULTATI S FARME 7	149
4.7.1	Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 7	149
4.7.2	Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 7	152
4.7.3	Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 7	153
4.7.4	Biovarnostni ukrepi na farmi 7	154
4.8	REZULTATI S FARME 8	157
4.8.1	Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 8	157
4.8.2	Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 8	160
4.8.3	Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 8	161
4.8.4	Biovarnostni ukrepi na farmi 8	162
4.9	REZULTATI S FARME 9	165
4.9.1	Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 9	165
4.9.2	Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 9	167
4.9.3	Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 9	169
4.9.4	Biovarnostni ukrepi na farmi 9	169
4.10	REZULTATI METOD ZA DOKAZ VIRUSA.....	172
4.10.1	Molekularne metode.....	172

4.10.2 Izolacija virusa na PAM iz serumov.....	174
5 RAZPRAVA.....	177
5.1 ELIMINACIJA PRRS Z NARAVNO PREKUŽITVIJO	178
5.2 ELIMINACIJA PRRS S SERUMIZACIJO	182
5.3 ELIMINACIJA PRRS Z VAKCINACIJO	187
5.4 SPLOŠNE UGOTOVITVE	191
6 SKLEPI.....	199
7 POVZETEK.....	201
8 SUMMARY	205
9 ZAHVALE	207
10 LITERATURA.....	209

KAZALO SLIK

Slika 1: Sestava viriona PRRS (prirejeno po http://www.porcilis-prrs.com/microbiology-virus-PRRS-structure.asp).	24
Slika 2: Sestava genoma virusa PRRS (prirejeno po http://www.porcilis-prrs.com/microbiology-virus-PRRS-structure.asp).	25
Slika 3: Filogenetsko drevo virusov PRRS razvrščenih v genotip 1 in genotip 2 (prirejeno po Stadejek in sod., 2006).	27
Slika 4: Filogenetsko drevo, kjer so (krepko) označene sekvene genotipa 1 iz Slovenije (prirejeno po Toplak in sod., 2012a).	28
Slika 5: Imunski odziv proti virusu PRRS (prirejeno po F.Osorio. Nebraska University)	41
Slika 6: Lokacija farm v Sloveniji.....	70
Slika 7: Lokacija farm vključenih v študijo.....	71
Slika 8: Farme, na katerih smo izvajali eliminacijo PRRS in glede na virus pozitivne farme, ki smo jih ugotovili v študiji o pojavljanju PRRS v Sloveniji v letu 2010.	75
Slika 9: Prikaz lokacije farme 1 in sosednih gospodarstev s prašiči.	92
Slika 10: Prikaz lokacije farme 2 in sosednih gospodarstev s prašiči.	100
Slika 11: Prikaz lokacije farme 3 in sosednih gospodarstev s prašiči.	108
Slika 12: Prikaz lokacije farme 4 in sosednih gospodarstev s prašiči.	121
Slika 13: Analiza produktov RT-PCR v ORF7 z elektroforezo v agaroznem gelu.....	132
Slika 14: Prikaz lokacije farme 5 in sosednih gospodarstev s prašiči.	135
Slika 15: Prikaz lokacije farme 6 in sosednih gospodarstev s prašiči.	148
Slika 16: Prikaz lokacije farme 7 in sosednih gospodarstev s prašiči.	156
Slika 17: Prikaz lokacije farme 8 in sosednih gospodarstev s prašiči.	164
Slika 18: Prikaz lokacije farme 9 in sosednih gospodarstev s prašiči.	171
Slika 19: Prikaz razvrstitve ugotovljenih sevov PRRS s šestih farm (farme 3, 4, 5, 6, 8, 9) na filogenetskem drevesu.....	173
Slika 20: Prikaz odstotka identičnih nukleotidov med sevi PRRS, ki smo jih ugotovili na šestih različnih farmah.....	174
Slika 21: Pljučni alveolarni makrofagi po 48 urah inkubacije (negativna kontrola).	175
Slika 22: Pljučni alveolarni makrofagi po 48 urah inkubacije. Viden je CPE po inokulaciji s pozitivnim vzorcem (pozitiven rezultat izolacije virusa PRRS).	175

KAZALO TABEL

Tabela 1: Skupno število preiskanih serumov z ELISA in skupno število preiskanih serumov z metodo RT-PCR	72
Tabela 2: Začetna oligonukleotida za pomnoževanje odseka v regiji gena za nukleokapsido (Donadeu in sod., 1999).....	80
Tabela 3: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 1.....	86
Tabela 4: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P pred začetkom ukrepanja) za farmo 1	88
Tabela 5: Rezultati RT-PCR na farmi 1	90
Tabela 6: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 1	91
Tabela 7: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 2.....	94
Tabela 8: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P pred začetkom ukrepanja) za farmo 2	96
Tabela 9: Rezultati RT-PCR na farmi 2	98
Tabela 10: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 2	99
Tabela 11: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 3.....	102
Tabela 12: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P pred začetkom ukrepanja) za farmo 3	104
Tabela 13: Rezultati RT-PCR na farmi 3	106
Tabela 14: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 3	107
Tabela 15: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 4.....	110
Tabela 16: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P pred serumizacijo) za farmo 4.	116
Tabela 17: Rezultati RT-PCR na farmi 4	118
Tabela 18: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 4	120
Tabela 19: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 5.....	123
Tabela 20: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P 3 mesece po I. serumizaciji) za farmo 5	129

Tabela 21: Rezultati RT-PCR na farmi 5.....	131
Tabela 22: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 5.	134
Tabela 23: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 6.	137
Tabela 24: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P pred serumizacijo) za farmo 6.	143
Tabela 25: Rezultati RT-PCR na farmi 6.....	145
Tabela 26: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 6.	147
Tabela 27: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 7.	150
Tabela 28: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P po I. vakcinaciji) za farmo 7....	152
Tabela 29: Rezultati RT-PCR na farmi 7.....	154
Tabela 30: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 7.	155
Tabela 31: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 8.	158
Tabela 32: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P pred vakcinacijo) za farmo 8...	160
Tabela 33: Rezultati RT-PCR na farmi 8.....	162
Tabela 34: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 8.	163
Tabela 35: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 9.	166
Tabela 36: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P pred vakcinacijo) za farmo 9...	168
Tabela 37: Rezultati RT-PCR na farmi 9.....	169
Tabela 38: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 9.	170

SEZNAM OKRAJŠAV

ADE	antibody-dependent enhancement
DPO	dni po okužbi
EAV	virus konjskega arteritisa
ELISA	encimsko imunski test
GP	membranski glikoprotein virusa
ICTV	Mednarodni odbor za taksonomijo
IF	imunofluorescenčni test
IFA	indirektni imunofluorescenčni test
IHC	imunohistokemijska metoda
INF	interferon
IL	interleukini
IP	imunoperoksidazni test
IPMA	indirektni imunoperoksidazni test
LDV	Lactate dehydrogenase-elevating virus
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
NP	nevtralizacijska protitelesa
ORF	bralni okvir
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCV2	prašičji cirkovirus tip 2

PMWS	sindrom multisistemskega poodstavitevnega hujšanja
PRCV	prašičji respiratorni korona virus
PRRS	prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom
RT-PCR	reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo
SHFV	Simian hemorrhagic fever virus
SIV	virus prašičje influence
SPF	brez specifičnih bolezni
TCID ₅₀	50-odstotna infektivna doza
TNFα	dejavnik tumorske nekroze α
VN	virus nevtralizacijski test

1 UVOD

Prašičji reprodukcijski in respiratori sindrom (PRRS) je virusna bolezen, ki je razširjena skoraj po vsem svetu (Taylor, 2006). Brez PRRS so le Argentina, Avstralija, Kuba, Brazilija, Finska, Nova Zelandija, Norveška, Švica, Švedska in Nova Kaledonija (Zimmerman in sod., 2012). PRRS spada med bolezni, ki povzročajo velike ekonomske izgube (Meng, 2000). Motnje v reprodukciji imajo za posledico 12 % izgub, 43 % je izgub zaradi povečanega pogina ter 45 % zaradi slabšega izkoristka krme (Zimmerman, 2008). PRRS stane Združene države Amerike (ZDA) letno več kot 560 milijonov \$, medtem ko so bile letne izgube zaradi klasične prašičje kuge 57,4 milijona \$, zaradi Aujeszki jeve bolezni pa 21,25 milijona \$ (Neumann in sod., 2005). Po zadnjih podatkih naj bi bile izgube zaradi PRRS v letu 2011 v ZDA večje kot 664 milijonov \$ (Morrison, 2012).

Virus PRRS spada v rod *Arterivirus* in v družino *Arteriviridae* (Benfield in sod., 1992). Genom virusa PRRS je molekula RNA, ki jo sestavlja okrog 15.000 nukleotidov. Virus se razmnožuje v citoplazmi celic, najpogosteje v prašičjih alveolarnih makrofagih in makrofagih drugih tkiv (Torremorell in Christianson, 2002), lahko pa tudi na različnih linijah celic opičjih ledvic, kot so CL 2621, MA 104 in MARC 145. Viruse PRRS razvrščamo v genotip 1 (evropski genotip) in genotip 2 (ameriški genotip), znotraj teh dveh genotipov pa so znani številni različni podtipi (Ropp in sod., 2004). Sev Lelystad (genotip 1) in severno-ameriški sev VR 2332 (genotip 2) kažejo sorodnost samo v 55 do 79 % (Taylor, 2006). V študiji, ki je zajela tipizacijo sevov iz vzhodnoevropskih držav so ugotovili, da znotraj genotipa 1 obstajajo skupine podtipov EU 1, EU 2, EU 3, EU 4 (Forsberg in sod., 2002; Stadejek in sod., 2006). Na določenem geografskem območju lahko najdemo podtipe različnih skupin virusa PRRS (Prieto in sod., 2009; Stadejek in sod., 2008).

Na območjih s sodobno rejo prašičev, kjer je promet s prašiči velik, se bolezen pojavlja veliko pogosteje (Leung, 2011). Virus se v rejo vnese največkrat z okuženimi prašiči (56 %), z okuženim semenom (20 %), z različnimi kontaminiranimi predmeti (21 %) in na druge načine (3 %) (Zimmerman in sod., 2006).

Zaradi velikih škod, ki jih povzroča bolezen, je nujno ustrezno ukrepati (Torremorell in Christianson, 2002). Opisani so različni načini ukrepanja: kontrola bolezni, eliminacija bolezni in izkoreninjenje bolezni. Kontrola bolezni pomeni zmanjšanje pogostnosti pojavljanja in

širjenja bolezni pa tudi zmanjšanje obolenosti in smrtnosti zaradi kroženja virusa v čredi, dalje pomeni preprečevanje vertikalnega in horizontalnega prenosa virusa ter spodbujanje razvoja imunosti proti farmskemu sevu virusa in s tem izboljšanje prireje na spremenljivo raven (Dee, 1997; Dee, 1998; Morrison, 2012). Eliminacija bolezni pomeni, da v čredi ni več klinično bolnih živali pa tudi ne virusa, še vedno pa lahko dokažemo protitelesa v plemenski čredici in pri sesnih pujskih (kolostralna protitelesa) (Toma in sod., 1991). Za eliminacijo bolezni obstaja več načinov imunizacije plemenske črede: z naravno prekužitvijo, s serumizacijo ali z vakcinacijo ter dopolnilna metoda delne depopulacije (Torremorell in Christianson, 2002; Taylor, 2006; Zimmerman in sod., 2012). Prva stopnja pri eliminaciji PRRS je stabilizacija plemenske črede. Stabilna plemenska čreda je čreda, kjer nobena plemenska žival ne izloča virusa in imajo vse plemenske živali enotne titre protiteles (Jusa in sod., 1996; Gillespie in Caroll, 1999; Zimmerman, 2008).

Najboljša zaščita pred okužbo z virusom PRRS je homologna, kar pomeni, da prašiče zaščitimo zgolj proti istemu ali pa proti zelo sorodnemu tipu virusa PRRS, ki kroži na farmi. Metodi, ki zagotavlja homologno zaščito, sta naravna prekužitev in serumizacija. Vakcinacija je namreč učinkovita le, kadar je hlevski podtip virusa soroden z virusom v vakcini (Pol in sod., 1992; Scortti in sod., 2006; Martelli in sod., 2007; Kimman in sod., 2009). Proti genotipu 1 je na tržišču več vakcin, vse pa vsebujejo le sev Lelystad, v vakcini za genotip 2 pa je sev VR 2332 (Zimmerman, 2006).

Eliminacija bolezni ni mogoča brez upoštevanja biovarnostnih ukrepov (Torremorell in Christianson, 2002). Promet s prašiči moramo nadzorovati tako, da na farmo vhlevimo samo glede na PRRS preverjeno negativne prašiče in da uporabimo zgolj seme preverjeno negativnih merjascev. Prenos virusa preprečujemo s preoblačenjem delavcev, z nadzorovanem dostavo različnih stvari na farmo, z omejitvijo vstopa obiskovalcev na farmo, s čiščenjem in razkuževanjem orodja in pripomočkov ter vozil za prevoz prašičev. Na farmi je potrebno tudi redno izvajati deratizacijo in dezinfekcijo ter onemogočiti dostop pticam (Torremorell in Christianson, 2002; Taylor 2006, Zimmerman in sod., 2006).

Da bi v okuženi farmi eliminirali PRRS, je nujen ukrep takojimenovana dvojna zapora črede, kar pomeni, da najmanj 200 dni ne smemo na farmo voziti novih prašičev niti dodajati lastnih mladic v plemensko čredo (Torremorell in Christianson, 2002).

V Sloveniji sta bila ugotovljena 44,8 % prevalenca protiteles in pojavljanje velikega števila različnih podtipov virusa PRRS (Toplak in sod., 2010; Toplak, 2011; Toplak in sod., 2012a).

1.1 NAMEN DELA, CILJ IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen naše raziskave je določiti najprimernejšo metodo za eliminacijo PRRS v naših rejah bodisi z naravno prekužitvijo bodisi s serumizacijo ali vakcinacijo. V raziskavo bomo vključili 9 farm, ki imajo do 200 plemenskih prašičev na posamezni farmi. Na farmah bomo najprej serološko potrdili PRRS. Po potrditvi bolezni bomo na vsaki farmi odvzeli kri vsem plemenskim prašičem in ugotovili izhodiščno raven protiteles. Glede na velikost farme in prevalenco protiteles, se bomo na posamezni farmi odločili za najprimernejšo metodo (naravna prekužitev, serumizacija, vakcinacija) z namenom, da dosežemo najprej stabilizacijo plemenske črede in nato eliminacijo PRRS. Vsako od treh metod bomo uporabili na treh farmah. V posamezni rej bomo torej izvedli samo eno metodo, da bi dosegli eliminacijo PRRS. Ne glede na metodo eliminacije se bo rejec zavezal, da bo izvajal dvojno zaporo reje vsaj za obdobje 200 dni in upošteval predpisane biovarnostne ukrepe. V rejah, kjer bomo izvedli serumizacijo, bomo odvzeli kri tekačem različnih starosti. Iz vzorcev, v katerih bomo dokazali virus PRRS, bomo pripravili inokulum.

Tri mesece po začetku izvajanja ukrepov bomo na vseh poskusnih farmah odvzeli kri vsem plemenskim prašičem in jo preiskali glede na protitelesa proti virusu PRRS. S tem bomo dobili serološki profil plemenske črede, na podlagi katerega bomo lahko sklepali o uspešnosti poteka eliminacije. Vsem plemenskim prašičem bomo ponovno odvzeli kri 6 mesecev po začetku izvajanja ukrepov ter jo preiskali glede na protitelesa proti virusu PRRS, iste vzorce bomo preiskali tudi z molekularno metodo za ugotavljanje virusa, da preverimo stabilizacijo plemenske črede. Po treh mesecih bomo ponovno odvzeli kri vsem plemenskim prašičem in pitancem. Eliminacija PRRS je potrjena, ko so titri protiteles pri vseh plemenskih prašičih nizki in homogeni in ko so starejši pitanci serološko negativni.

Izvedli bomo tudi izolacijo virusa na primarni celični kulturi pljučnih alveolarnih makrofagov, ki jih bomo pridobili iz rej, ki so brez specifičnih bolezni prašičev (SPF). Uspešna izolacija nam bo omogočila razmnoževanje hlevskega podtipa virusa PRRS *in vitro*.

Delovne hipoteze:

1. Naravna prekužitev v manjših rejah (reje do 30 plemenskih prašičev) je uspešen način eliminacije PRRS.
2. Serumizacija je učinkovit način eliminacije PRRS.
3. Eliminacija z vakcinacijo je možna samo v primeru, če je vakcinalni sev virusa soroden s hlevskim virusom.
4. Eliminacija PRRS je lahko uspešna le ob strogih biovarnostnih ukrepih.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 ETIOLOGIJA

2.1.1 Zgodovina bolezni

Prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom (PRRS) so prvič ugotovili v Združenih državah Amerike leta 1987 (Hill, 1990). Opažali so reprodukcijske motnje, pljučnice pri pujskih po odstavitev, zmanjšan prirast in močno povišano smrtnost (15,2 %). Niso pa ugotovili povzročitelja in so bolezen zato poimenovali »Mystery swine disease« (Reotutar, 1989; Hill, 1990). V Evropi so klinično sliko podobne bolezni najprej ugotovili v Nemčiji v Münstru leta 1990, ko so zabeležili kar 3000 izbruhov (OIE, 1992). Maja 1991 se je bolezen razširila še v nekatere druge evropske države in sicer na Norveško, v Belgijo, Španijo, Veliko Britanijo, na Dansko, Poljsko in Češko. V Aziji so prve primere opisali na Japonskem leta 1988, na Tajskem 1991, na Kitajskem pa leta 1995 (Hirose in sod., 1995; Chang in sod., 1993).

Povzročitelja bolezni so identificirali leta 1991 v Lelystadu na Nizozemskem in kmalu za tem so virus izolirali tudi v ZDA in Kanadi (Wensvoort in sod, 1992). Bolezen so v ZDA najprej poimenovali Swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) (Collins in sod., 1992), v Evropi pa Porcine epidemic abortion respiratory syndrome (PEARS) (Keffaber, 1989). Leta 1991 so v Evropi predlagali poimenovanje Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) (Terpstra in sod., 1991).

2.1.2 Taksonomija in značilnosti virusa

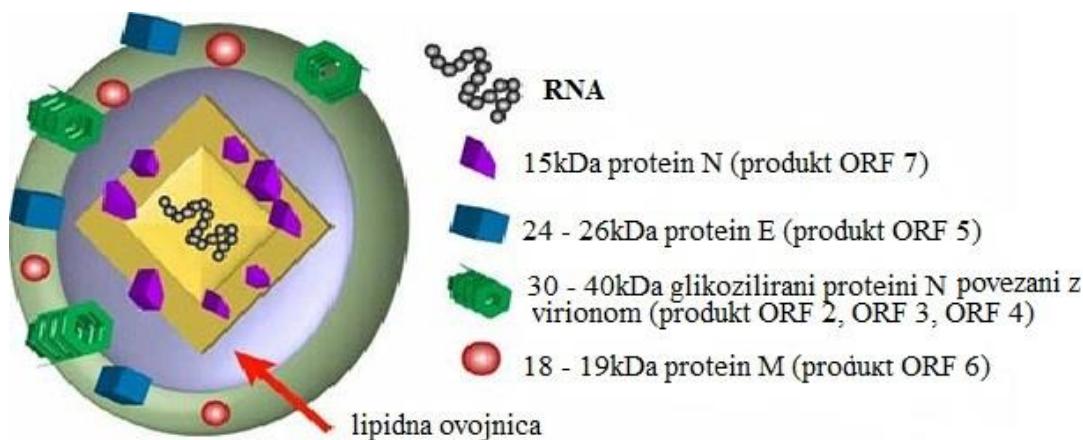
PRRS virus spada v red *Nidovirales*, družino *Arteriviridae*, kamor spadajo po določilih Mednarodnega odbora za taksonomijo ICTV (ICTV, angl. *International Committee for the Taxonomy of Viruses*) tudi virus konjskega arteritisa (EAV, angl. *Equine arteritis virus*), virus LDV (angl. *Lactate dehydrogenase-elevating virus*) in virus SHFV (angl. *Simian hemorrhagic fever virus*) (Zimmerman in sod., 2006). Virus PRRS je vrstno specifičen in se razmnožuje v prašičjih alveolarnih makrofagih in v makrofagih drugih tkiv (Cho in Dee, 2006). Razmnožuje se tudi v zarodnih celicah testisov (spermatociti) merjascev (Sur in sod., 1997). *In vitro* se virusi PRRS genotipa 2 razmnožujejo na linijah celic iz opičjih ledvic, kot so CL 2621, MA 104 in MARC 145, virusi genotipa 1 pa na alveolarnih makrofagih (Zimmerman in sod., 2012).

Virus PRRS ima ovoj, ki ga sestavlja lipidni dvojni sloj. Preživetje v okolju je odvisno od:

- temperature: virus PRRS lahko preživi več kot 4 mesece pri temperaturi med – 20 °C do 70 °C, vendar pa se z naraščajočo temperaturo okolja krajša preživitvena doba,
- pH: virus PRRS ostane stabilen pri pH vrednosti med 6,5 do 7,5, medtem ko se možnost okužbe zmanjšuje pri pH nižjem od 6,5 ali višjem od 7,6,
- izpostavljenosti razkužilom: učinkovita so lipidna topila (kloroform, eter), ker razkrojijo virusno ovojnico in s tem onemogočijo razmnoževanje. Kužnost virusa hitro pada v raztopini, ki vsebuje nizke koncentracije detergentov (Benfield in sod., 1992; Cho in Dee, 2006; Zimmerman in sod., 2006).

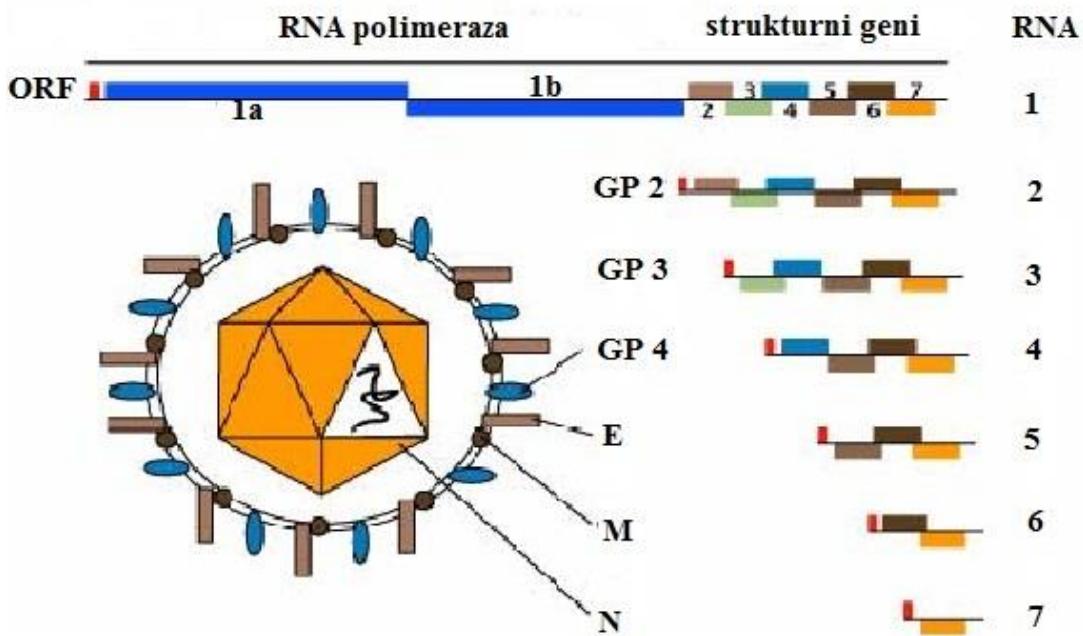
2.1.3 Organizacija genoma

Virus PRRS vsebuje enovijačno pozitivno orientirano RNA (Scortti in sod., 2006). Genom RNA virusa vsebuje okrog 15.000 nukleotidov in 8 bralnih okvirjev (ang. open reading frame - ORF) (Meulenberg in sod., 1993). ORF 1a in 1b obsegata 80 % genoma in kodirata RNA polimerazo. ORF 2, 3 in 4 kodirajo N - glikozilirane proteine, ki so strurni proteini GP 2, GP 3 in GP 4. ORF 5, 6 in 7 individualno kodirajo proteine ovojnice (E), membrane (M) in nukleokapside (N) (slika 1, slika 2). Tako je vrstni red nastanka proteinov v genomu PRRS sledec: 5' - virusna polimeraza (ORF 1a/1b) – GP 2 (ORF 2) – GP 3 (ORF 3) – GP 4 (ORF 4) – E (ORF 5) – M (ORF 6) – N (ORF 7) - 3' (Meng, 2000).



Slika 1: Sestava viriona PRRS (prirejeno po http://www.porcilis-prrs.com/microbiology-virus_PRRS-structure.asp).

Figure 1: PRRS virus structure (modified from http://www.porcilis-prrs.com/microbiology-virus_PRRS-structure.asp).



Slika 2: Sestava genoma virusa PRRS (prirejeno po http://www.porcilis-prrs.com/microbiology-virus_PRRS-structure.asp).

Figure 2: Genome PRRS virus structure (modified from http://www.porcilis-prrs.com/microbiology-virus_PRRS-structure.asp).

Kadar primerjamo seve genotipa 1 in genotipa 2, je strukturni protein, ki ga kodira ORF 5, najbolj variabilen protein (Prieto in sod., 2009). ORF 5 kaže tudi največjo genetsko raznolikost med sevi istega genotipa (Lee in sod., 2010). Zato je ORF 5 najpomembnejša tarča za genetsko analizo v smislu raznolikosti, evolucije in epidemiologije virusov PRRS (Zhou in sod., 2009). Dosedanje filogenetske analize so bile narejene na celotnih ali delnih nukleotidnih zaporedjih ORF 5 (Kang in sod., 2004). Nasprotno pa je ORF 7 zelo ohranjena regija pri vseh izolatih PRRS genotipa 1 in 2 (Oleksiewicz in sod., 1998) in zato je ORF 7 pomembna regija genoma za dokazovanje virusne RNA (Yoon in sod., 2008).

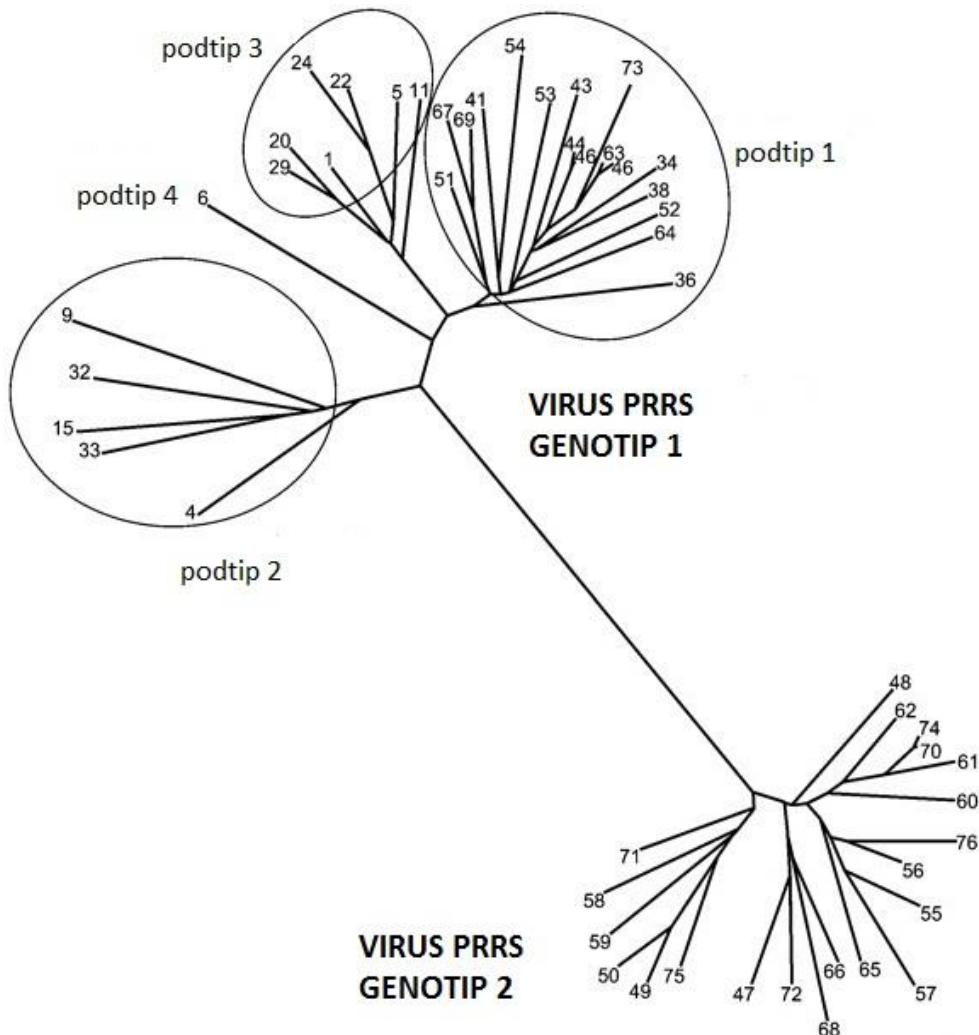
2.1.4 Raznolikost genoma

Wensvoort in sodelavci (1992) so razdelili virus PRRS na evropski izolat in na ameriški izolat, ki so ju kasneje poimenovali genotip 1 in genotip 2 (Stadejek in sod., 2006). Stadejek in sodelavci (2006) so ugotovili, da znotraj genotipa 1 obstajajo 4 podskupine (slika 3). Raziskava, ki so jo opravili v Španiji (Prieto in sod., 2009), je dokazala, da pojavljanje sevov virusov PRRS

ni geografsko omejeno, kar pomeni, da lahko enake seve ugotavljamo na različnih območjih v različnih državah. Na določenem območju sta lahko tudi oba genotipa virusa, se pravi genotip 1 in genotip 2.

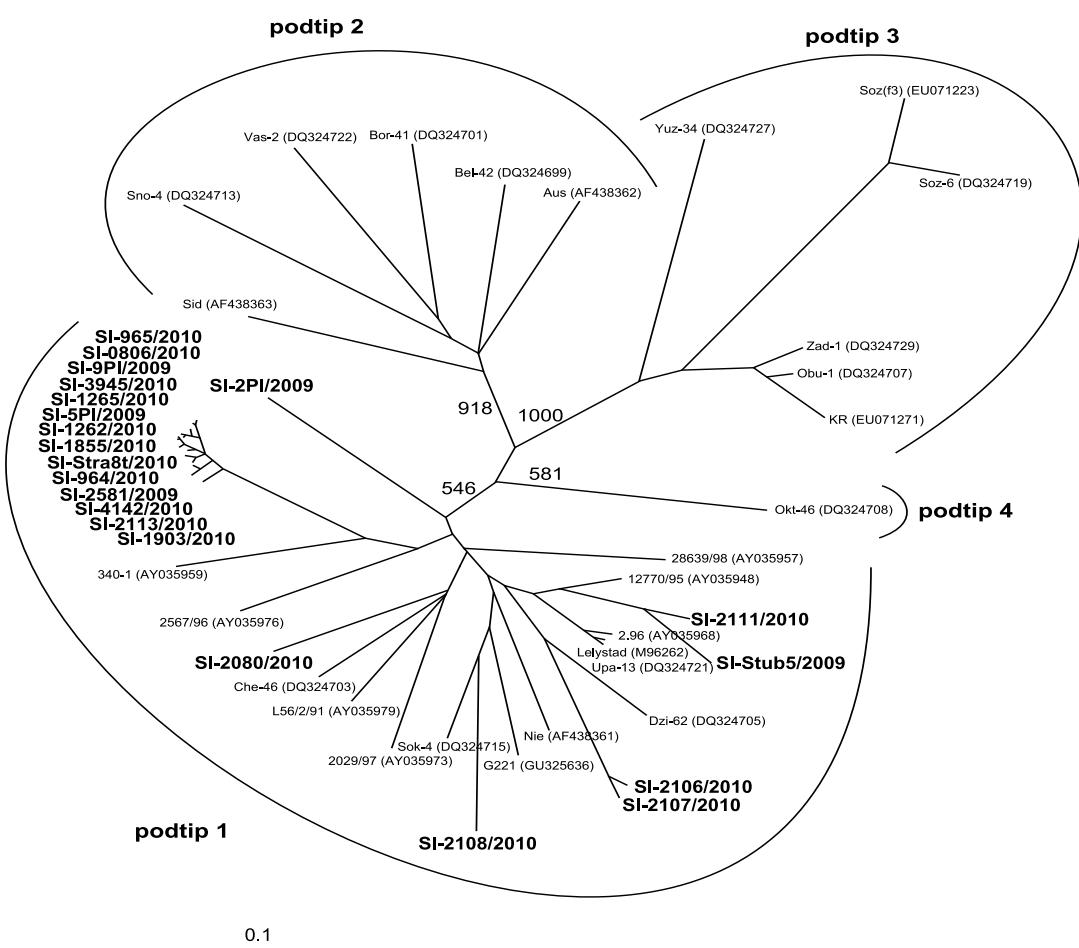
Virus PRRS kaže izjemno genetsko različnost. Ugotavljanje nukleotidnih zaporedij in druge antigenske analize so pokazale, da so evropski izolati (genotip 1) sorodnejši izolatu Lelystad (sorodnost med njimi je 72,2 do 90 %), medtem ko kanadski in ameriški izolati (genotip 2) kažejo samo 55 do 70 % sorodnosti z virusi PRRS genotipa 1 (Stadejek in sod., 2006; Stadejek in sod., 2008). Referenčni izolat virusov genotipa 2 je sev VR-2332 (Benfield in sod., 1992). Velika genetska raznolikost je bila ugotovljena pri genotipu 2, medtem ko so kasnejše objave pokazale na še večjo genetsko raznolikost genotipa 1 (Prieto in sod., 2009; Stadejek in sod., 2006). Na podlagi genetske analize virusov PRRS iz Veline Britanije, Italije, Češke, Poljske, Nemčije, Španije, Belorusije in Tajske so ugotovili veliko sorodnost z virusom Lelystad (Drew in sod., 1997; Forsberg in sod., 2002; Stadejek in sod., 2002; Stadejek in sod., 2006; Stadejek in sod., 2008; Thanawongnuwech in sod., 2004a; Pesch in sod., 2005). Stadejek in sodelavci (2006) so ugotovili pojavljanje 4 podtipov virusa PRRS genotipa 1 in sicer podtip 1, podtip 2, podtip 3 in podtip 4. V podtip 4 so uvrstili le beloruski izolat, ki se razlikuje od preostalih evropskih izolatov. Drugi beloruski izolat, ki je mnogo bolj virulenten od ostalih evropskih izolatov, so poimenovali Lena in sodi v podtip 3. V študiji, v kateri so primerjali titer virusa v krvi po eksperimentalni okužbi prašičev s sevom Lena in sevom virusa PRRS iz Belgije, so po odvzemu krvi 10, 14 in 21 dni po okužbi dokazali, da so najvišji titri po inokulaciji s sevom Lena nihali od $10^{4,8}$ do $10^{6,1}$ TCID₅₀/ml, pri inokulaciji z belgijskim sevom pa od $10^{3,1}$ do $10^{4,8}$ TCID₅₀/ml (Karniychuk in sod., 2010). Na Kitajskem pa so leta 2006 prav tako potrdili zelo virulenten sev virusa PRRS, ki je kazal 60 % sorodnost z genotipom 1 in 89 % sorodnost z genotipom 2 (Zhou in sod., 2009).

V Sloveniji je bilo v 30 rejah dokazanih 6 genetsko različnih sevov PRRS, ki so kazali 89,1-95,1 % sorodnosti z Lelystad izolatom (genotip 1) in 62,4-65,1 % sorodnosti z VR-2332 (genotip 2) (Toplak in sod., 2012a). Vsi dokazani izolati genotipa 1 v tej raziskavi so spadali v podskupino 1 (slika 4).



Slika 3: Filogenetsko drevo virusov PRRS razvrščenih v genotip 1 in genotip 2 (prirejeno po Stadejek in sod., 2006).

Figure 3: Classification of PRRS viruses in the phylogenetic tree in genotype 1 and genotype 2 (modified from Stadejek in sod., 2006).



Slika 4: Filogenetsko drevo, kjer so (krepko) označene sekvence genotipa 1 iz Slovenije (prirejeno po Toplak in sod., 2012a).

Figure 4: The phylogenetic tree where Slovenian sequences from genotype 1 were marked (bold) (modified from Toplak in sod., 2012a).

2.2 EPIDEMIOLOGIJA

Za okužbo z virusom PRRS so dovzetni samo prašiči, tako domači kot divji (Saliki in sod., 1998; Albina in sod., 2000; Roic in sod., 2012). Virus se ne razmnožuje v organizmu drugih živalskih vrst, kot so psi, mačke, miši, podgane, rakuni, oposumi, dihurji, vrabci, škorci in race (Hooper in sod., 1994; Trincado in sod., 2004). Okuženi prašiči lahko širijo virus s slino do 42 dni po okužbi (DPO) (Wills in sod., 1997), z izcedkom iz nosu 21 DPO (Christianson in sod., 1993; Benfield in sod., 1994; Rossow in sod., 1994), z urinom 28 DPO (Wills in sod., 1997), s semenom do 92 DPO (Swenson in sod., 1993; Swenson in sod., 1994) in z blatom 38 DPO (Christianson in sod., 1993). Breje svinje, ki se okužijo v pozni fazи brejosti, okužijo plod preko placente (Wagstrom in sod., 2001). Okuženi merjasci izločajo virus tudi s semenom, kar je pomembno zlasti pri umetnem osemenjevanju. Pri eksperimentalno okuženem merjascu so virus dokazali še 43 DPO, pri drugem merjascu so z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) ugotovili virus še 92 DPO (Christoper-Hennings in sod., 1995). V raziskavi, ki so jo opravili Christoper-Hennings in sodelavci (2001), je bilo ugotovljeno, da se virus dalj časa ohranja v semenu kot v krvi (11 DPO). Če virusa ne moremo dokazati ne v semenu in ne v serumu, še ne pomeni, da je prašič brez virusa, saj se virus lahko še vedno zadržuje v bezgavkah (157 DPO) (Christoper-Hennings in sod., 2001). Nevratalizacijska protitelesa lahko dokažemo od 14 do 28 dni po okužbi, kar je v korelaciji z zmanjšanjem količine virusa PRRS v pljučih in periferni krvi.

2.2.1 Prenos znotraj črede

PRRS se prenaša zlasti z okuženimi prašiči, ki so nosilci virusa. Prašiči se lahko okužijo intranasalno, intramuskularno (Magar in sod., 1995; Magar in sod., 2004), oralno, intrauterino (Christianson in sod., 1993) in vaginalno (Benfield in sod., 2000; Gradil in sod., 1996). Hermann in sodelavci (2005) so ugotovili, da infektivna doza, ki zadošča za okužbo 50 % prašičev v poskusu, izpostavljenih okužbi (ID_{50}) po oralni poti, znaša $10^{5,3}$ TCID $_{50}$, po intranasalni poti pa $10^{4,0}$ TCID $_{50}$. Po podatkih Benfielda in sodelavcev (2000) naj bi bila ID_{50} za okužbo z umetnim osemenjevanjem $10^{4,5}$ TCID $_{50}$. Yoon in sodelavci (1999) poročajo, da pri intramuskularni aplikaciji zadošča za okužbo že manj kot 20 virusnih partiklov, medtem ko Zimmerman in sodelavci (2006) navajajo, da za okužbo zadošča manj kot 10 virusnih partiklov. Virus lahko širimo med prašiči iste reje s ščipanjem zob, kupiranjem repov, rovašenjem, tetoviranjem in intramuskularno (i/m) aplikacijo. Virus se prenaša s svinje na pujske

intrauterino, med prasitvijo ter s prenašanjem pujskov k dojiljam (Christianson in sod., 1992; Bøtner in sod., 1994; Zimmerman in sod., 2006; 2012). Virus se transplacentarno prenese z okužene svinje na fetus in povzroči fetalno smrt, prasitev pozitivnih slabotnih pujskov in mumificiranih plodov. Lahko pa v istem gnezdu najdemo istočasno pozitivne in negativne pujske (Terpstra in sod., 1991; Christianson in sod., 1992; Bøtner in sod., 1994). Virus PRRS se v embriu lahko začne pomnoževati 14. dan brejosti ali kasneje, vendar je okužba plodu v prvih dveh trimesečjih redka, saj prehaja virus večinoma preko placente v zadnji tretjini brejosti (Christianson in sod., 1993; Lager in sod., 1995; Prieto in sod., 1996). Prenos je neodvisen od virulence virusa. Park in sodelavci (1996) so dokazali, da je ne glede na to ali gre za okužbo z malo ali močno virulentnim sevom virusa PRRS, prehod preko placente enako učinkovit, kadar je svinja eksperimentalno okužena po 90. dnevnu brejosti.

Virus se širi tudi z opremo, instrumenti, obleko, lahko tudi z vodo in krmo ter z aerosolom. Otake in sodelavci (2002) so opravili poskus tako, da so delavcu po stiku z okuženimi prašiči odvzeli brise z rok, obutve in obleke in sicer takoj po stiku z okuženimi prašiči ter po 30, 60 in 120 minutah. S testom PCR so dokazali virusno nukleinsko kislino 30 in 60 minut (10^5 TCID₅₀ / ml) po kontaktu. Zato je ključnega pomena umivanje rok, menjava obleke in obutve (Dee in sod., 2004). Prav tako se lahko virus prenaša s transportnimi vozili, ki pred nalaganjem prašičev niso bila očiščena in razkužena (Cho in Dee, 2006). V študiji so z ugotavljanjem števila kopij PRRS virusne nukleinske kisline ugotovili, da se virus bolje prenaša v zimskem času, ko so temperature pod 0 °C, slabše pa v toplejšem času, ko temperature dosežejo več kot 16 °C, saj je bila razlika signifikantna (P=0,006) (Dee in sod., 2002, 2003).

Prve raziskave so kazale, da je možen prenos virusa PRRS v eksperimentalnih razmerah tudi s členonožci kot so muhe in komarji (Otake in sod., 2002; Pringproa in sod., 2004). Kasnejše raziskave so pokazale tudi, da so lahko členonožci mehanski vektorji prenosa virusa PRRS. Kljub temu so predlagali dodatne raziskave na tem področju (Otake in sod., 2003). Prav tako so raziskovali, ali lahko virus prenašajo tudi drugi sesalci in ptiči, vendar tega prenosa niso dokazali (Cho in Dee, 2006).

2.2.2 Prenos med čredami

V regijskem kontrolnem programu PRRS v Franciji so ugotovili, da je najpogostejši prenos virusa z vnosom pozitivnih prašičev (56 %), s semenom (20 %), z blatom (21 %) in 3 % na neugotovljen način (Le Potier in sod., 1997). Do podobnih sklepov so prišli Mortensen in sodelavci (2002), ki so ugotovili, da je prenos virusa PRRS v negativno farmo najpogostejši z okuženimi prašiči, semenom in z aerogenim prenosom iz okoliških pozitivnih farm, pri čemer bi lahko sodelovali nekateri prenašalci bolezni, na primer muhe in komarji. Dee in sodelavci (2002; 2003) pa omenjajo, da se virus prenaša s kontaminirano opremo, kot so naprimer hladilne posode za seme, kovinski zaboji za orodje, plastična vedra za krmljenje prašičev, obleka, obutev, krma, voda itn. Torremorell in sodelavci (2004) omenjajo kot najpogostejše vzroke (80 %) za prenos virusa transport, se pravi premike prašičev, slabe biovarnostne ukrepe in prenos z insekti. Možnost prenosa virusa na negativno farmo narašča z bližino drugih pozitivnih farm (Zhuang in sod., 2002). Le Potier in sodelavci (1997) so ugotovili, da je 45 % farm postalo pozitivnih, kjer je bil vir infekcije v radiju 500 m, in samo 2 % farm, kjer je bila razdalja večja od 1 kilometra.

Opisujejo tudi možnost prenosa virusa z zrakom (aerogeni prenos) (Dee in sod., 2005; Dee in sod., 2009). S poskusom so aerogeni prenos virusa dokazali na razdalji od 1 m do 30 m. V ta namen so poleg pozitivnih pitancev namestili dva zabojnika z negativnimi prašiči, v katera so z ventilatorji 3 dni usmerjali zrak od okuženih pitancev in tako prenesli virus (Otake in sod., 2002; Trincado in sod., 2003). Na uspešnost aerogenega prenosa vpliva več dejavnikov, kot so temperatura okolja, vlaga, smer vetra, izpostavljenost UV žarkom in geografski relief (Dee in sod., 2005; Otake in sod., 2010). Otake in sodelavci (2010) so z raziskavo potrdili, da se virus PRRS lahko prenaša aerogeno do 9,1 kilometra.

2.3 PATOGENEZA

PRRS poteka v dveh fazah;

- akutna faza, ki običajno traja 2 tedna in jo spremljajo visoki titri virusa (10^2 - 10^5 TCID_{50/ml}) tako v krvi kot v dovezetnih organih,
- endemična faza, za katero je značilen nizek titer virusa v organih in krvi (Suarez, 2000).

2.3.1 Akutna faza

Po vstopu v organizem prašiča se virus pomnožuje v makrofagih dihal in se nato hitro razširi po limfnih potih v druga tkiva, kot so možgani, srce, ledvica (Van Reeth, 1997; Zimmerman in sod., 2006; 2012). Virus se pomnožuje v pljučnih alveolarnih makrofagih in makrofagih v limfatičnem tkivu (Zimmerman in sod., 2006; 2012). Pljuča so vstopno mesto virusa v organizem in ciljni organ (Van Reeth, 1997). Zelo virulentni sevi povzročijo viremijo v 12 do 24 urah. Titer virusa hitro narašča in doseže vrh med 7 do 14 dnevi v serumu, bezgavkah in pljučih, vendar pa je najvišji v pljučih (10^2 - 10^5 TCID_{50/ml}) (Zimmerman in sod., 2006; 2012). V času akutne viremije lahko dokažemo virus do 28 DPO (Wills in sod., 2003).

Prva faza epidemije traja 2 tedna, lahko tudi dlje. Zaradi viremije pri 5 do 75 % prašičev vseh kategorij opazimo neješčnost in otopelost, prašiči imajo povišano telesno temperaturo (več kot 40 °C), dihanje je oteženo, opazimo modrikavost okončin in uhljev, zmanjša se jim število limfocitov (Loula, 1991; Keffaber in sod., 1992; Stevenson in sod., 1993).

2.3.1.1 Patogeneza pri brejih svinjah

Pri mladicah in svinjah se prva klinična znamenja bolezni pojavijo med 2. in 7. dnevom po okužbi. Virus se najprej pomnožuje v alveolarnih makrofagih in se nato razširi po celotnem organizmu, doseže tudi reproduktivne organe in preide skozi placento. Okužba v zadnji tretjini brejosti povzroči poškodbe placente in popkovine, to pa vodi v hipoksijo ploda in posledično do abortusov v pozni brejosti ter do mrtvorojenih in slabotnih pujskov (Prieto in sod., 2000; Choen in sod., 2001).

2.3.1.2 Patogeneza pri merjascih

Merjasci lahko pomembno prispevajo k širjenju okužbe, saj se virus prenaša tudi s semenom. Virus v semenu so dokazali do 92 dni po okužbi merjasca (Christoper-Henings, 2000). Virus se razmnožuje v epiteliju zarodnih celic semenovoda in v makrofagih intersticija testisov (Sur in sod., 1997; Wills in sod., 2003). Christoper-Henings (2000) je po eksperimentalni okužbi merjascev ugotovil, da so ti kljub vazektomiji širili virus PRRS. Po okužbi z virusom PRRS nastanejo v testisih večjedrne celice velikanke in poveča se količina odmrlih celic. V ejakulatu se pojavi tudi večja količina nezrelih spolnih celic, okuženih z virusom PRRS (Sur in sod., 1997).

2.3.1.3 Patogeneza pri sesnih pujskih

Virus PRRS preide skozi placeno v zadnji tretjini brejosti, zato svinje prasijo mrtvorojene ter slabotne pujske. V akutni fazi je pogin več kot 60 % (Prieto in sod., 2000; Cho in sod., 2001). Eksperimentalno so okužili plemenske prašiče in sesne pujske ter ugotovili, da je titer virusa pri sesnih pujskih višji kot pri odraslih prašičih (Cho in sod., 2006). Prav tako so ugotovili, da je najvišji titer virusa pri odraslih prašičih v pljučih, medtem ko je pri sesnih pujskih v limfatičnem tkivu (Cho in Chae, 2001).

2.3.1.4 Patogeneza pri tekačih

Pri tekačih se pri akutni okužbi poveča delež poginov na 12 do 20 % (Loula, 1991; Keffaber in sod., 1992; Stevenson in sod., 1993).

2.3.1.5 Patogeneza pri pitancih

Pri pitancih so dokazali, da titer virusa PRRS doseže vrh 7 do 14 DPO v pljučih in bezgavkah od koder se prenese po celotnem organizmu. Pri pitancih opazimo slabšo konverzijo krme (Cho in Chae, 2001).

2.3.2 Endemična faza

Akutna faza PRRS preide v endemično obliko skoraj v vseh primerih. V endemično inficiranih čredah se bolezen kaže z rednimi ali občasnimi izbruhi značilnega akutnega PRRS, ki so vidni zlasti v porodnišnici in pri tekačih (Batista in sod., 2004; Murtaugh, 2012; Zimmerman in sod.,

2012). Klinična znamenja prav tako lahko opazimo pri mladicah in merjascih, ki so jih prestavili na farmo (Dee in sod., 1996), kot tudi pri svinjah, ki jim je padel titer protiteles. Reprodukcijske motnje po ponovnem izbruhu PRRS so odvisne od števila okuženih svinj in mladic ter od obdobja brejosti v času okužbe. V primeru, da je v reji majhno število mladic, opazimo le občasne abortuse, pregonitve, podaljšan čas do nove ovulacije, slabšo konceptijo ter neizenačena gnezda, značilna za PRRS. Vendar so te spremembe opazne le ob natančnem spremeljanju podatkov o proizvodnji (White, 1992a).

Viremiji, ki traja 4 do 5 tednov, sledi kronična okužba limfatičnega tkiva, ki lahko traja nekaj mesecev. Virusno RNA so z metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR), dokazali še 251 DPO (Wills in sod., 2003). Virus PRRS so dokazali v limfatičnem tkivu do 157 DPO pri tekačih (Wills in sod., 1997), medtem ko so živorojenim pujskom svinj, ki so se okužile v zadnji tretjini brejosti, dokazali virus v krvi 11 tednov po prasitvi (Suarez, 2011). Batista in sodelavci (2004) poročajo, da so dokazali virusno RNA v limfatičnem tkivu mladic do 135 DPO, medtem ko so v serumu dokazovali virus do 30 DPO. Vse našteto pa pomeni stalen vir okužbe v reji.

Študija, ki so jo opravili Bierk in sodelavci (2001) je pokazala, da se virus PRRS ohranja pri nebrejih svinjah vse do 86 DPO in v tem času je možen prenos virusa na prašiče, ki še niso bili v stiku z virusom. Pri poskusno okuženih prašičih se virus ni več širil med 90 do 180 DPO (Batista in sod., 2002).

2.3.3 Hkratna okužba z drugimi patogenimi mikrobi

Ob okužbi z virusom PRRS se stopnjujejo bolezenska znamenja drugih bolezni. Po okužbi reje z virusom PRRS se poveča pojavljanje septikemij, meningitisov in smrtnosti zaradi bakterije *Streptococcus suis* (*S. suis*) (Galina in sod., 1994; Thanawongnuwech in sod., 2000). Pogosteje so pljučna obolenja, ki jih povzroča *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) (Susan in sod., 2002). Pri sočasni okužbi z virusom PRRS in z bakterijo *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) se pljučnica stopnjuje in podaljša njeno trajanje, kar se vidi klinično, makroskopsko in mikroskopsko. Pri okužbah z virusom PRRS je imelo makroskopske in mikroskopske bolezenske spremembe 10 DPO 36,5 % živali, medtem, ko je bil pri hkratni okužbi z virusom PRRS in z *M. hyopneumoniae* ta delež 43% (Thacker in sod., 2000; Thanawongnuwech in sod., 2004b). Študija, v kateri so ugotavljalci učinek hkratne okužbe z

virusom PRRS in z *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) kažejo, da imajo prašiči izrazitejše patoanatomske spremembe kot so intersticijska pljučnica, saj so jo pri skupini s hkratno okužbo dokazali pri 10 prašičih od 10, medtem ko v skupini, ki je bila okužena samo s *H. parasuis*, pljučnice niso dokazali. Smrtnost v skupini kjer so izvedli hkratno okužbo z obema povzročiteljema v primerjavi s skupino, ki je bila okužena samo s *H. parasuis* je bila statistično značilna ($P<0,1$) (Solano in sod., 1997). Pol in sodelavci (1997) so ugotovili, da hkratna okužba z virusom PRRS in bakterijo *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) ne povzroča hujših sprememb v primerjavi z okužbo zgolj z enim povzročiteljem.

Okužba z virusom PRRS in drugimi respiratornimi virusi, kot so prašičji respiratorni korona virus (PRCV) in virus prašičje influence (SIV), so v eksperimentalnih razmerah pokazali, da hkratna okužba povzroči hujšo obliko bolezni in zaostajanje v rasti (zaostanek v rasti je bil 4,6 % pri hkratni okužbi, pri okužbi samo s SIV pa 1,8 %), kot če bi bili prašiči okuženi samo z eno vrsto patogenih mikrobov (Van Reeth in sod., 1996; Drew, 2000).

Okužba s prašičjim cirko virusom tip 2 (PCV2) povzroča velike težave v sodobni prašičereji po celem svetu. Najpogostejsa bolezen je sindrom multisistemskega poodstavitevnega hujšanja (PMWS). Pri PMWS je virus PRRS pogosto prisoten (Opriessnig in sod., 2008). Prašiči, eksperimentalno okuženi z virusom PRRS in PCV2 (PMWS), so imeli hujšo klinično obliko bolezni, saj se oba virusa razmnožujejo v celicah iste vrste, in sicer v monocitih in makrofagih (Allan in sod., 2000).

2.4 KLINIČNA ZNAMENJA

Opisi kliničnih znamenj po okužbi s PRRS v Evropi (Gordon, 1992; Hooper in sod., 1992; White, 1992a,b), Severni Ameriki (Moore, 1990; Sanford, 1992), Južni Ameriki (Dewey, 2000) in v Aziji (Chiou, 2003; Thanawongnuwech in sod., 2003) so si podobni. Klinična oblika variira med čredami od asimptomatične do oblike z zaznavnimi znamenji bolezni. Poleg tega je klinična slika odvisna tudi od drugih okužb v čredi. Odvisna je tudi od virulence virusa (Zhou in sod., 2009; Karniychuk in sod., 2010), od imunskega statusa gostitelja, doveznosti gostitelja in dejavnikov managementa (Blaha, 1992; White, 1992a). Tipičnih kliničnih znakov za PRRS ni (Zimmerman in sod., 2012).

Klinična slika bolezni se pojavi ob okužbi črede, ki doslej še ni imela stika z virusom PRRS in se razširi na vse proizvodne faze (Terpstra in sod., 1991; Collins in sod., 1992; Pol in sod., 1992).

2.4.1 Klinična znamenja akutne bolezni

Akutna faza traja 7-10 dni ali 2 tedna in več (Done in Paton, 1995). V akutni fazi opazimo neješčnost, ki traja 3-7 dni in otopelost pri vseh kategorijah prašičev, kar je posledica viremije, ki jo dokažemo pri 5 do 75 % prašičev. V času akutne okužbe je največ poginov pri sesnih pujskih. Pgin je lahko več ko 54 % (Taylor, 2006). Prizadeti prašiči imajo limfopenijo, povišano telesno temperaturo na 39-41 °C, povišano frekvenco dihanja, po koži se pojavljajo hiperemična ali cianotična območja (Done in Paton, 1995).

2.4.1.1 Klinična znamenja pri svinjah v akutnem obdobju bolezni

V akutni fazi bolezni naraste število abortusov za 1 do 3 %. V okuženi reji se poveča odstotek pregonitev, podaljša se obdobje do ponovne ovulacije, poveča se odstotek svinj z agalakcijo (Hooper in sod., 1992). Reprodukcijske motnje se kažejo z manjšim odstotkom brejosti, s krajšanjem časa brejosti, zmanjša se število živorojenih pujskov, poviša se število slabotnih pujskov in mrtvorojenih ter mumificiranih plodov (Keffaber, 1989; Hopper in sod., 1992; White, 1992a). Poveča se pgin svinj za 1 do 4 %, včasih vse do 10 %, pri zelo virulentnih sevih pa do 30 % (Zhou in Yang, 2010). Pri 1 do 2 % obolelih svinj so opazne spremembe na koži, kot so hiperemija, polnokrvnost uhljev, rilca in repa (Taylor, 2006). Pri okužbah z zelo virulentnimi sevi virusa PRRS so pri svinjah dokazali 10 do 50 % abortusov (Zhou in Yang, 2010). V času akutne faze so zabeležili nevrološke znake, kot so gibanje v krogu, težave pri hoji in pareza (Epperson in Holler, 1997; Halbur in Bush, 1997). Po okužbi z virusom PRRS 5 do 80 % svinj prasi prezgodaj, to je stoti dan in v gnezdu so vse možne kombinacije pujskov (negativni, pozitivni, slabotni, normalni, mumificirani, avtolitični). Odstotek mrtvorojenih pujskov je 7 do 35 % (Loula, 1991; White, 1992a; Wills in sod., 2000; Taylor, 2006).

2.4.1.2 Klinična znamenja pri merjascih v akutnem obdobju bolezni

V akutni fazì bolezni pri merjascih opazimo neješčnost, apatičnost, respiratorne motnje, zmanjšan libido in slabšo kvaliteto semena (Feitsma in sod., 1992; Prieto in sod., 1994). Dva tedna po okužbi opazimo v semenu manjšo gibljivost spermijev in poškodbe akrosomov, zaradi česar je oploditvena sposobnost slabša (Swenson in sod., 1994; Lager in Halbur, 1996; Prieto in sod., 1996).

2.4.1.3 Klinična znamenja pri sesnih pujskih v akutnem obdobju bolezni

Pri sesnih pujskih v akutni fazì opazimo od 60 do 88 odstotno smrtnost (Hopper in sod., 1992; Zhou in Yang, 2010). Razlog povišanega odstotka smrtnosti je v prezgodnji prasitvi, saj so pujski slabotni in ne morejo sesati, pojavlja se razkrečenost, respiratorne motnje in hemoza, to je nabrekanje tretje veke, ki sega preko očesne reže, opazimo tudi tresavico, veslanje (Loula, 1991) in edem čela (Gordon, 1992). Pojavljajo se anemija, trombocitopenija, krvavitve po telesu in povišana incidensa poliartritisov in meningitisa (Hopper in sod., 1992; White, 1992a).

2.4.1.4 Klinična znamenja pri tekačih v akutnem obdobju bolezni

Akutna okužba z virusom PRRS se pri tekačih kaže kot neješčnost, apatičnost, hiperemija kože, oteženo dihanje brez kašlja, naježenost ščetin pa tudi v slabšem dnevnom prirastu. Pogin tekačev v akutni fazì bolezni je 12 do 15 % (Moore, 1990; White, 1992b) oz. do 70 % pri zelo virulentnih sevih (Zhou in Yang, 2010).

2.4.1.5 Klinična znamenja pri pitancih v akutnem obdobju bolezni

Akutna okužba z virusom PRRS se pri pitancih izraža podobno kot pri tekačih (nejščnost, apatičnost, hiperemija kože, oteženo dihanje brez kašlja, naježenost ščetin). Pogosto so izrazitejše sekundarne bakterijske in virusne okužbe. Izgube v akutni fazì PRRS nastanejo zlasti zaradi slabše konverzije krme in zato slabšega dnevnega prirasta (White, 1992b). Pri pitancih so zabeležili 20 % pogin pri zelo virulentnih sevih virusa PRRS (Zhou in Yang, 2010).

2.4.2 Klinična znamenja v endemičnem obdobju bolezni

Po vnosu virusa na farmo navadno bolezen preide v endemično fazo, ki se kaže kot ponavljajoči se izbruhi bolezni pri vseh kategorijah prašičev, saj so prašiči v različni imunski fazì. V endemično okuženi rejì klinično sliko bolezni najpogosteje opazimo pri kategoriji tekačev (Keffaber in sod., 1992; Stevenson in sod., 1993). Pri merjascih lahko opazimo slabšo kvaliteto

semena (Zimmerman in sod., 1997). Klinična znamenja so opazili tudi pri nadomestnih mladicah, ki še niso imela stika z virusom in pri merjascih potem, ko so jih prestavili v plemensko čredo, če jih niso predhodno imumnizirali s farmskim podtipom virusa. Pri teh prašičih se pojavi klinična slika akutne okužbe. V primeru nezadostne biovarnosti pride pri tekačih, ki nimajo več kolostralne zaščite, do akutnega izbruha bolezni. Virus lahko zakroži po farmi in prašiči, ki jim je padel titer protiteles, se ponovno okužijo (Grosse-Beilage in Grosse-Beilage, 1992; Steveneson in sod., 1993; Dee in Joo, 1994; Dee in sod., 1996).

V endemični fazi okužbe se poviša pogostnost endemskih bolezni pri plemenskih prašičih, tekačih in pitancih (Loula, 1991; Moore, 1990; Blaha, 1992; Keffaber in sod., 1992; White, 1992a; Stevenson in sod., 1993). Pri okužbi z virusom PRRS je več streptokoknih meningitisov, pogosteješa sta septikemična oblika salmoneloze in Glässerjeva bolezen, večkrat se pojavi tudi eksudativni dermatitis, garje in bakterijska bronhopnevmonija (Zimmerman in sod., 1997; Taylor, 2006).

2.4.2.1 Klinična znamenja pri svinjah v endemičnem obdobju bolezni

Reprodukcijske motnje se pojavijo pri negativnih mladicah, ki jih prestavimo v pozitivno čredo in pri svinjah, ki jim je padel titer protiteles. Reprodukcijske motnje v čredi so odvisne od števila okuženih svinj in mladic ter od časa okužbe glede na trajanje brejosti (Torrison in sod., 1994). Pri svinjah v endemični fazi lahko opazimo 10 do 15-odstotkov manjšo oploditev, prezgodnjne prasitve, zmanjšano število živorojenih pujskov, občasne abortuse pri 2 do 3 % svinj in neješčnost (McCawe, 1995).

2.4.2.2 Klinična znamenja pri merjascih v endemičnem obdobju bolezni

Pri merjascih lahko opazimo slabšo kvaliteto semena (Zimmerman in sod., 1997).

2.4.2.3 Klinična znamenja pri sesnih pujskih v endemičnem obdobju bolezni

Stevenson in sodelavci (1993) poročajo, da je bila smrtnost pri sesnih pujskih v endemični fazi 3 %, vendar je variirala glede na letni čas. V zimskem času se je smrtnost povečala na 7 do 16 %. Navadno pa se bolezen pri sesnih pujskih ne pojavi, saj jih pred okužbo ščitijo kolostralna protitelesa.

2.4.2.4 Klinična znamenja pri tekačih v endemičnem obdobju bolezni

Klinična oblika bolezni v endemični fazi je najpogosteje pri tekačih starih 4 do 12 tednov. Do pojava kliničnih znakov pride zaradi padca kolostralne zaščite in okužbe z virusom PRRS. Pri tekačih traja viremija 3 do 4 tedne. Imajo respiratorne motnje in slabše priraščajo. Pogin je 12 do 20-odstotkov in to navadno 2 do 3 tedne po odstavitevi (Keffaber in sod., 1992; Stevenson in sod., 1993).

2.4.2.5 Klinična znamenja pri pitancih v endemičnem obdobju bolezni

V endemični fazi okužbe se poviša incidenca sekundarnih bakterijskih in virusnih bolezni pri pitancih. Pitanci v endemičnem obdobju slabše priraščajo in slabše izkoriščajo krmo (Loula, 1991; Moore, 1990; Blaha, 1992; Keffaber in sod., 1992; White, 1992a; Stevenson in sod., 1993).

2.5 PATOMORFOLOŠKE SPREMEMBE

Patomorfološke spremembe zaradi PRRS so najpogosteje pri mladih pujskih. Te spremembe opazimo 4 do 28 DPO v pljučih in bezgavkah, kjer se virus razmnožuje (Dee in sod., 1992; Halbur in sod., 1995; Rossow in sod., 1995). Jakost in razporeditev patoloških sprememb sta odvisni od virulentnosti virusnega seva, kateremu so bili prašiči izpostavljeni. Patomorfološke spremembe lahko kažejo na okužbo z virusom PRRS, vendar niso značilne, ker lahko številni drugi povzročitelji, kot so virusi in bakterije, povzročajo podobne spremembe. Zato mora biti diagnoza PRRS vedno podprtta z dokazom povzročitelja (Mengeling in Lager, 2000).

2.5.1 Makroskopske spremembe

Intersticijska pljučnica se pojavi 3 do 28 DPO in je najbolj izražena 10 do 14 DPO (Mengeling in Lager, 2000). Pri poginjenih svinjah pogosto ugotovljamo edem pljuč, cistitis in nefritis (Hopper in sod., 1992; White, 1992a). Bezgavke postanejo sive in se povečajo. Takšne ostanejo šest ali več tednov po okužbi (Mengeling in Lager, 2000). Na plodovih lahko opazimo edem okrog ledvic, edem ligamenta vranice, edem mezenterija, ascites, hidrotoraks in krvavitve po popkovnici (Dee in sod., 1992; Duran in sod., 1992; Lager in Halbur, 1996).

2.5.2 Mikroskopske spremembe

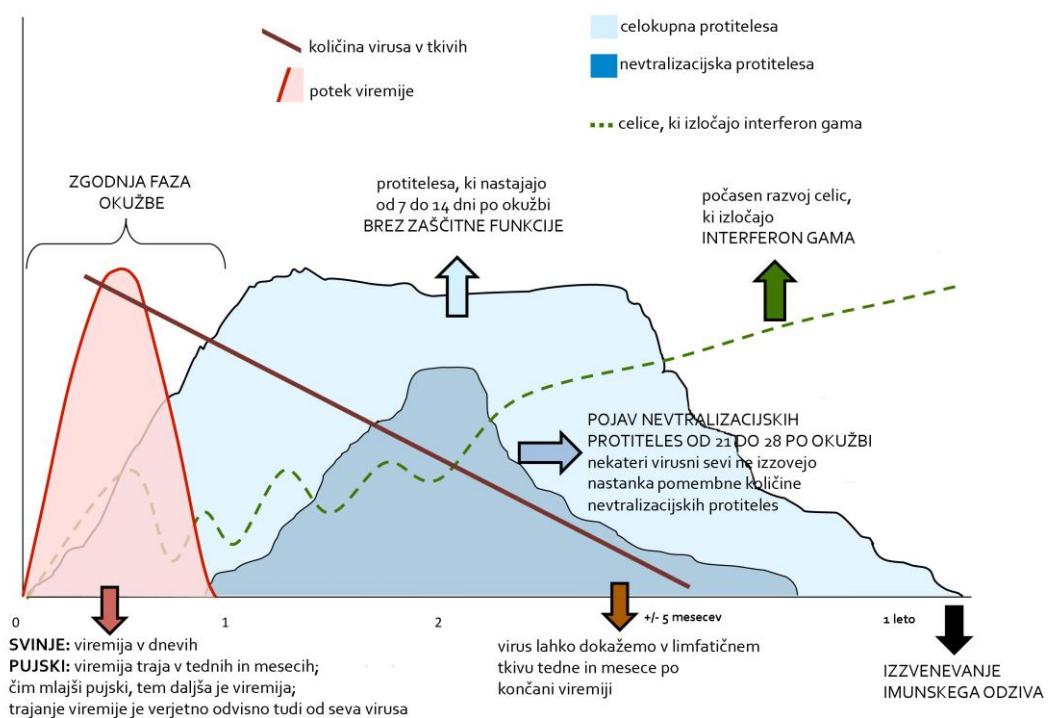
Pljučne alveole so polne makrofagov, limfocitov in plazmatk, lahko pa v njih najdemo tudi ostanke celic in serozno tekočino. (Done and Paton, 1995; Pol in sod., 1991). Mikroskopske spremembe so najbolj izražene v germinativnih središčih bezgavk, ki so izpraznjena in nekrotična. Devet dni ali več po okužbi lahko ugotovimo blag do zmerno močan multifokalni limfohistiocitni vaskulitis in perivaskularni miokarditis (Halbur in sod., 1995, 1996; Rossow in sod., 1995). Blago limfohistiocitno vnetje malih in velikih možganov ter podaljšane hrbtenjače lahko opazimo 7 ali več dni po okužbi (Collins in sod., 1992; Rossow in sod., 1995; Halbour in sod., 1996; Thanawongnuwech in sod., 1997). Blago kopičenje limfocitov in histiocitov ugotovimo okrog glomerulov in tubulov skorje ledvic (Rossow in sod., 1995; Cooper in sod., 1997). Migelalke epitela nosne sluznice manjkajo, epitelne celice so edematozne (Collins in sod., 1992; Rossow in sod., 1995). Miometrij in endometrij sta edematozna, z infiltrati limfocitov in histiocitov okrog krvnih žil (Christianson in sod., 1992; Lager in Halbur, 1996). Sedem do 25 dni po okužbi lahko opazimo atrofijo zvitih semenskih cevk zaradi povečane apoptoze zarodnih celic (Sur in sod., 1997).

2.6 IMUNSKI ODZIV PRI OKUŽBI Z VIRUSOM PRRS

Ločimo dva genotipa virusa PRRS in velja, da je imunski odziv na okužbo pri obeh genotipih virusa enak (Murtaugh in sod., 2002). Pri tem pride do razvoja tako celične kot humoralne obrambe. Odziv na okužbo z virusom PRRS se prične z aktivacijo naravne obrambe v citoplazmi okuženih makrofagov. Zaradi virusa se alveolarni makrofagi in makrofagi drugih tkiv poškodujejo, imajo krajšo življensko dobo in postanejo manj aktivni. Pospeši se izločanje dejavnikov tumorske nekroze α (TNF α), ki povzroči nabrekanje endotelnih celic kapilar, kar privede do prehajanja plazemskih proteinov v tkivo (Choen in sod., 2001 Suardhat in Thanawongnuwech, 2003). Virus PRRS tako povzroči neposredno apoptozo, se pravi programirano smrt okuženih celic, kot tudi posredno smrt celic v okolini okuženih celic. Najvišjo raven celic, ki odmirajo na omenjen način, je zaznati od 10 do 14 DPO (Sirinarumitretal., 1998). Apoptiza celic stimulira izločanje citokinov, aktivacijo celic B v limfatičnem tkivu in zmanjšano fagocitozo zaradi poškodbe ali uničenja makrofagov, zato je več možnosti za nastanek septikemije (Labarque in sod., 2000; Suarez, 2000). Zaradi izločanja protivnetnih citokinov, to so interferon α in γ (INF α in INF- γ), dejavnik tumorske nekroze (TNF α) in pa interleukini 1, 6, 10, 12 (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12), pride do levkocitoze in

aktivacije celičnega imunskega odziva, kar ima za posledico upočasnjeno razmnoževanja virusa (Van Reeth in sod., 1999; Choen in sod., 2001; Suardhat in Thanawongnuwech, 2003). Vendar pa je odziv preko interferona in vnetnih citokinov šibak in sproži šibko nespecifično obrambo, zaradi česar je čas viremije daljši, celični imunski odziv pa kratkotrajen. Počasen je namreč razvoj celic, ki se odzovejo z izločanjem INF- γ (Albina in sod., 1998; Buddaert in sod., 1998; Van Reeth in sod., 1999; Meier, 2000).

Kljub 20-letnim raziskavam še vedno ostaja veliko odprtih vprašanj glede celostne slike imunskega odziva na okužbo z virusom PRRS. Ni jasno, kateri strukturni protein virusa povzroči nastanek imunosti, še vedno ni razjasnjena navzkrižna zaščita proti posameznim sevom virusa PRRS, prav tako v celoti ne razumemo mehanizma imunskega odziva, ki povzroči zaščito proti virusu PRRS ter kakšen je mehanizem ohranjanja spominskih celic za dolgotrajnejšo imunost (Murtaugh in Genzow, 2011).



Slika 5: Imunski odziv proti virusu PRRS (prirejeno po F.Osorio. Nebraska University).

Figure 5: The immune response against PRRSV (modified from F. Osorio, University of Nebraska).

2.6.1 Protitelesna imunost

Specifična protitelesa razreda M proti virusu PRRS pri prašičih lahko dokažemo že od 5 do 7 DPO, vendar pa pri večini prašičev pride do serokonverzije okoli 14 DPO. IgM dosežejo vrh od 14 do 21 DPO, nato pa titer hitro upada, tako da med 35 in 42 DPO ta protitelesa niso več dokazljiva (Loemba in sod., 1996; Joo in sod., 1997; Mourtagh in sod., 2002). Specifične IgG lahko dokažemo najprej 7 do 10 DPO (Yoon in sod., 1994; Loemba in sod., 1996; Labarque in sod., 2000), vrh dosežejo 21 do 49 DPO, pri čemer visoka raven protiteles traja nekaj mesecev, nato pa počasi upada do približno 300 DPO (Nielsen in Bøtner, 1997; Drew, 2000; Zimmerman in sod., 2012, Mateu in Diaz, 2008). V raziskavi, ki so jo opravili Lager in sodelavci (1997), so v poskusu z divjim virusom PRRS okužili 11 svinj, bodisi intranasalno bodisi intrauterino, nato so jih pripuščali glede na njihov naravni cikel (143. dan do 514. dneva). V 90. dnevu brejosti so jih ponovno oronazalno okužili z istim sevom virusa PRRS. Dokazali so, da so bile svinje zaščitene proti homolognemu sevu virusa PRRS vsaj 604 dni po eksperimentalni okužbi, ker so do takrat lahko dokazovali specifična protitelesa razreda G. Desrosiers in Boutin (2002) pa sta ugotovila, da je bila tretjina svinj v plemenski čredi serološko pozitivnih še 20 mesecev po okužbi z divjim virusom PRRS.

Časovno običajen specifičen protitelesni odziv (IgM in IgG) pa se ne ujema z razvojem nevtralizacijskih protiteles (NP) (slika 5). Nevtralizacijska protitelesa pripadajo razredu G in se kot del prej omenjenega protitelesnega odziva pojavljajo v krvi v različnih obdobjih in sicer od 9 DPO (Yoon in sod., 1994) ali 21 DPO (Loemba in sod., 1996; Eichhorn in Frost, 1997) kot tudi 28 DPO (Murtaugh in sod., 2002; Mateu in Diaz, 2008). NP lahko dokazujemo od 28 DPO tako po okužbi z virusom genotipa 1 kot po okužbi z virusom genotipa 2. Nevtralizacijska protitelesa se razvijejo predvsem proti antigenu GP5 (glikoprotein 5), ker ta vsebuje največ nevtralizacijskih epitopov. Poleg GP5 pa vsebujeta antiga GP4 in M ter GP3 nekaj takšnih epitopov, ki pa nimajo večjega pomena pri razvoju NP (Ostrowski in sod., 2002; Plagemann in sod., 2002; Wissink in sod., 2003; Mateu in Diaz, 2008). NP ostajajo v krvi daljše obdobje (do 356 DPO), vendar v manjši količini (Yoon in sod., 1995; Lemba in sod., 1996; Labarque in sod., 2000). Eksperimentalno je bilo dokazano, da se odziv z NP zelo razlikuje individualno, od prašiča do prašiča. Prva NP so dokazali že 9. dan pri dveh prašičih od osmih in nato so do 28. DPO dokazali NP pri vseh prašičih. V študiji, ki je trajala 105 dni so dokazali, da količina NP variira v titru od 1:8 do 1:256 (Yoon in sod., 1995; Loemba in sod., 1996). Murtaugh in

sodelavci (2002) pa so ugotovili, da polovica prašičev, okuženih z virusom PRRS sploh ni razvila NP. Tako pomen NP pri preprečevanju okužbe in zaščiti pred PRRS v naravnih razmerah še ni popolnoma razjasnjena (Batista in sod., 2004; Murtaugh, 2012). Zaradi hkratnega dokaza NP in virusa PRRS v krvi okuženih prašičev domnevajo, da samo NP ne zagotavlja zaščite proti virusu PRRS (Murtaugh in sod., 2002). Nekateri avtorji navajajo, da se viremija pojavi kljub NP in da ne zavirajo razmnoževanja virusa (Yoon in sod., 1996).

Pojav nevtralizacijskih protiteles v pljučnem tkivu in serumu je razmeroma pozen glede na širjenje virusa tako v pljučih kot v serumu (Loemba in sod., 1996; Molitor in sod., 1997). V pljučnem tkivu je največ virusa od 7 do 9 DPO, v serumu pa okoli 11 DPO (Labarquet in sod., 2000; Greiner in sod., 2000; Samsom in sod., 2000), kar pomeni, da se NP pojavijo šele 2 tedna kasneje. Zaradi počasne sinteze NP naj bi imela ostala protitelesa večji vpliv na razvoj PRRS. Dokazano je bilo, da protitelesa, ki niso nevtralizacijska, obložijo virus, zaradi česar ga makrofagi po fagocitozi ne morejo razgraditi in tako se virus v makrofagih ohrani ter razmnožuje naprej. Ta fenomen je znan kot »antibody-dependent enhancement (ADE)« (Mateu in Diaz, 2008; Murtaugh in Genzow, 2011). Protitelesa proti antigenu GP5 in N pospešujejo ADE. Imunski odziv s protitelesi, ki niso nevtralizacijska, tako lahko predstavlja neke vrste trojanskega konja, saj tovrstna protitelesa obdajo virus PRRS in pospešijo vstopanje virusnih delcev v makrofage iz katerih se nato po razmnoževanju izloči še večja količina virusa (Mateu in Diaz, 2008).

NP preprečijo okužbo makrofagov z virusom PRRS *in vitro* (Delputte in sod., 2004). *In vivo* pa NP zaščitijo svinje (titer NP 1:16) pred reprodukcijskimi motnjami, blokirajo transplacentarno okužbo in zaščitijo pujske pred okužbo z virusom PRRS (Osorio in sod., 2002). Titer NP 1:8 je tako pri pujskih preprečil viremijo, popolno imunost, se pravi nedovzetnost za okužbo pa so dosegli s titrom NP 1:32 (Lopez in sod., 2007). Cepivo, ki bi induciralo NP v titru 1:32, bi teoretično lahko zaščitilo prašiče pred PRRS in bi bilo ključno pri izkoreninjenju bolezni (Mateu in Diaz, 2008).

2.6.2 Celična imunost

Celični imunski odziv je pomemben pri odstranjevanju celic, okuženih z virusom. Prav to velja tudi za okužbo z virusom PRRS. Limfociti T izražajo na svoji površini različne membranske molekule. Glede na izražanje molekul CD4 in CD8 razdelimo limfocite T v dve funkcionalni

subpopulaciji. Celice T pomagalke, ki izražajo molekule CD4, njihovo prepoznavanje antigenov in posledična aktivacija je povezana s kompleksom antigen - molekula MHCII (Major Histocompatibility Complex II). Po aktivaciji se celice T pomagalke klonsko množijo, nato pa se diferencirajo v efektorske in spominske celice. Efektorske celice T pomagalke izločajo različne citokine, ki imajo osrednjo vlogo pri aktivaciji limfocitov B, citotoksičnih limfocitov T ter pri aktivaciji drugih celic, vključenih v imunski odziv (Kuby, 1997, Alberts in sod., 1994). Glede na vrsto citokinov, ki jih izločajo CD4⁺ celice, jih razdelimo na celice Th1 in Th2. Citokine IFN-γ, TNF-β in IL-2 sintetizirajo celice Th1 in aktivirajo pretežno citotoksične celice T ter makrofage, kar je tesno povezano s celično imunostjo.

Citotoksični limfociti T izražajo na membrani molekule CD8, prepoznavanje antigenov in njihova aktivacija pa je omejena na sklop antigen-molekula MHC I na lastnih celicah telesa. Aktivirane celice T CD8⁺ se tako po prepoznavi antiga diferenčirajo v efektorske celice, ki ubijajo in odstranjujejo spremenjene in okužene lastne celice, izločajo pa le malo citokinov (Kuby, 1997).

Navzočnost različnih antigenov sproži aktivacijo mirujočih makrofagov, njihovo aktivnost pa pospešujejo še citokini, ki jih izločajo aktivirane celice CD8⁺ (najučinkovitejši med njimi je IFN-γ), mediatorji vnetja in nekatere strukture bakterijske stene. Aktivirani makrofagi odstranjujejo patogene mikrobe s fagocitozo, poleg tega pa v velikih količinah izločajo mediatorje vnetja in citotoksične proteine. Sposobni so aktivirati celice CD8⁺, na svoji površini pa v velikih količinah izražajo molekule MHCII in tako učinkovito predstavljajo antigene (Kuby, 1997, Roitt in sod., 1998). Prav te funkcije makrofagov pa so zaradi virusa PRRS v njihovi citoplazmi močno okrnjene.

Virus PRRS preko tega moti pravilno predstavitev antigenov virusa in posledično aktivacijo limfocitov T, kot tudi pravilno izločanje citokinov. T-celični receptor lahko prepozna le antigen, ki je predstavljen v sklopu molekul MHC. Domnevajo, da virus PRRS zmanjša izražanje MHC I kot tudi MHCII na dendritičnih celicah, ki so poglavitec antigen predstavitev celice, zato imajo okužene dendritične celice slabšo predstavitev sposobnost. PRRS naj bi tako zmanjševal učinkovitost naravne obrambe zaradi slabšega izločanja citokinov in posledično slabše dejavnosti makrofagov in dendritičnih celic kot tudi zaradi spremenjenega izražanja molekul, ki sodelujejo pri predstavitev antigena.

Pri okužbi z virusom PRRS je proliferacija specifičnih limfocitov T šibka in jo opazimo 4 tedne po okužbi, kar sovпадa s pojavom NP protiteles. Njihovo število doseže vrh 7 tednov po okužbi, upadati pa prične 11 tednov po okužbi. Pri ponovni okužbi z virusom PRRS pride do proliferacije limfocitov T in povišanja njihovega nivoja hitreje kot pri prvi okužbi (Nielsenin Bøtner, 1997). Razlago blagega T limfocitnega odziva gre iskati v podaljšanju virusne okužbe, v domnevi, da virus PRRS zavira prepoznavanje okuženih makrofagov s strani citotoksičnih celic T, pa tudi v dejstvu, da citokinsko okolje okuženega organizma ni najprimernejše za razvoj učinkovitega imunskega odziva (Meier in sod., 2003).

Pomembna citokina pri okužbi z virusom PRRS sta v glavnem INF- γ , redkeje IL-2. Prve raziskave so pokazale, da virus PRRS zavira produkcijo INF- α in povzroči, da ni odziva naravne obrambe proti virusu v pljučnem tkivu po okužbi (Albina in sod., 1998; Van Reeth in sod., 1999). Raven INF- α v pljučnem tkivu je precej nižja pri okužbi z virusom PRRS v primerjavi z okužbo s prašičjim koronavirusom ali pa z virusom prašičje influence (Van Reeth in sod., 1999). Pri okuženem prašiču količina celic, ki izločajo INF- γ sovпадa s količino celic, ki izločajo INF- α . Natančen mehanizem kako virus PRRS zavira izločanje INF- α ni poznan (Mateu in Diaz, 2008). Rezultati študij kažejo, da imajo različni izolati virusa PRRS genotipa 1 različen vpliv na izločanja INF- α , IL-10 in IL-12. Zaradi slabšega izločanja INF- α je torej slabši razvoj celic Th1 in posledično zavrta celična imunost (Mateu in Diaz, 2008).

Po okužbi tako z virusom PRRS genotipa 1 in genotipa 2 koncentracija IL-10 naraste v perifernih mononuklearnih celicah, kot tudi v bronhoalveolarni tekočini, pridobljeni z izpiranjem (Suardhat in Thanawongnuwech, 2003). Monociti naj bi bili torej glavni vir IL-10 pri okužbi z virusom PRRS (Charerntantanakul in sod., 2006). Povišana koncentracija IL-10 zavira izločanje citokinov Th-1, celic molekul MHC II in kostimulatornih molekul na makrofagih, kar vodi do manj učinkovitega celičnega imunskega odziva proti virusu PRRS, IL-10 pa pospešuje proliferacijo limfocitov B ter sintezo protiteles. Pri prašičih cepljenih s cepivom, ki spodbuja izločanje IL-10, so tako dokazali manjšo količino celic, ki izločajo INF- γ v primerjavi s prašiči, ki so bili cepljeni s cepivom, ki ni stimuliralo izločanja IL-10 (Diaz in sod., 2006). Količina IL-10 usmeri imunski odziv, bodisi v protitelesni, bodisi v celični imunski odziv, ki je, kot se kaže, zelo pomemben pri zaježitvi okužbe, oz. pri nadaljnjem poteku bolezni.

Celični imunski odziv je torej zelo spremenljiv in niha od neznatnega do močno izraženega (Zimmerman in sod., 2012). Batista in sodelavci (2004) navajajo, da visoka koncentracija INF-

γ pomaga odstraniti virus, saj se razvije celična imunost. Celice, ki izločajo večje količine INF-γ po okužbi z virusom PRRS so dokazali že 14 DPO, njihov vrh pa 50 DPO. Izločanje INF-γ je ostalo na nizki ravni celo do 135 DPO. To je v nasprotju z ugotovitvami Meierja in sodelavcev (2000), ki so dokazali, da celic, ki izločajo INF-γ po okužbi z virusom PRRS, niso zaznali 8 ali celo 10 tednov po okužbi. Količina INF-γ je začela naraščati šele 9 do 10 mesecev po okužbi ter ostala na visoki ravni do dveh let po okužbi. V študiji, ki so jo Meier in sodelavci (2003) opravili tri leta kasneje, so ugotovili 3 tedne po cepljenju z živim oslabeljenim virusom PRRS genotipa 2 celice, ki so izločale INF-γ. V naslednjih 10 tednih so v periferni krvi dokazali s testom ELISPOT od 50 do 100 mononuklearnih INF-γ izločajočih celic na milijon »Peripheral Blood Mononuclear Cells » (PBMC). V naslednjih 48 tednih pa je količina INF-γ izločajočih celic narašla na 400 do 500 celic na milijon PBMC. INF-γ izločajoče celice so bile povečini CD4⁺ in CD8⁺ celice. Ob vsem tem so ugotovili tudi zakasnitev v razvoju INF-γ izločajočih celic pri cepljenju s cepivom, ki je vsebovala virusa PRRS genotipa 1. Za primerjavo, pa so že tri tedne po cepljenju proti bolezni Aujeszkega dokazali 200 do 300 INF-γ izločajočih celic na milijon PBMC. Količina celic, ki izločajo INF-γ s starostjo prašiča narašča, vendar ni povezana z okužbo s PRRS (Klinge in sod., 2009), temveč najverjetnejše z zorenjem imunskega sistema pri prašiču, saj se PRRS pojavlja pri razmeroma mladih živalih, če gledamo v biološkem smislu.

2.6.3 Navzkrižna zaščita

Velika genetska razlika med virusi PRRS genotipa 1 in genotipa 2 pomembno vpliva na strategijo zaščite proti virusu PRRS. Prvo živo oslabelo vakcino so razvili 1994 za uporabo v Španiji. Vakcina je vsebovala inaktiviran virus PRRS genotipa 1. Kasneje istega leta so razvili prav tako živo oslabelo vakcino za genotip 2 (Mengeling, 2005). Nato je sledil razvoj vakcin, ki so vsebovale bodisi genotip 1 ali genotip 2. Še vedno ni pojasnjena učinkovitost v primeru heterolognosti znotraj istega genotipa (Mengeling, 2005). Roca in sodelavci (2012) so vakcinirali 3 tedenske pujske z oslabelo živo vakcino genotipa 1, nato so po 6 tednih pujske intranasalno okužili z divjim sevom virusa PRRS genotipa 2 (1×10^5 TCID₅₀/ml). Po 21 dneh so ugotovili, da noben od predhodno vakciniranih prašičev ni poginil, medtem ko sta pri nevakciniranih prašičih poginila 2 od 8. Vakcinirani prašiči so imeli povišano rektalno temperaturo do 12 dne in temperatura nikoli ni presegla 40 °C, nevakcinirani prašiči pa so imeli povišano rektalno temperaturo (najvišja več kot 41 °C) dalj kot 14 dni po okužbi. Vakcinirani prašiči so imeli boljši prirast (13,4 proti 6,6 kg), pri 4 od 8 vakciniranih pujskih so ugotovili

intersticijsko pljučnico, pri nevakciniranih prašičih pa so jo potrdili pri 5 od 8 pregledanih. Pri vakciniranih prašičih so bili 14 dni po inokulaciji viremični 3 od 8, v nevakcinirani skupini pa 6 od 8. Ugotovili so, da je navzkrižna zaščita med različnima genotipoma delna. Oppriesnig in sodelavci (2007) so prišli do podobnih ugotovitev, da gre za delno navzkrižno zaščito po okužbi s heterolognim sevom genotipa 2, ki so ga uporabili pri imunizaciji in kasnejši okužbi. Predhodno imunizirani prašiči so imeli statistično značilno manj kliničnih znakov ter manj makroskopskih in mikroskopskih sprememb. Kar ponovno potrjuje, da gre kljub heterolognosti za delno navzkrižno zaščito (Murtaugh in Genzow, 2011). Mengeling in sodelavci (2003) so dokazali, da so prašiči, ki so bili vakcinirani z živo atenuirano vakcino genotipa 2 in po 21 dneh okuženi s homolognim virulentnim sevom, popolnoma zaščiteni, se pravi, da pri njih ni prišlo do viremije.

Cilj učinkovite vakcine je popolna zaščita proti heterolognim podtipom virusa. V ta namen so poskusili izdelati delecijsko vakcino, ki naj bi spodbudila imunost proti heterolognim sevom virusa PRRS, vendar so bili rezultati slabi (Prieto in sod., 2009; Kimman in sod., 2009; Martelli in sod., 2009; Meng, 2000; Mengeling in sod., 2000;). Atenuirana heterologna vakcina pa je vendarle do neke mere učinkovita, saj omili bolezen, skrajša trajanje viremije in zavira širjenje virusa (Murtaugh in Genzow, 2011). Vse našteto je posledica celičnega imunskega odgovora in pojava nevtralizacijskih protiteles (Diaz in sod., 2006; Martelli in sod., 2009). Ugotovili so tudi, da komercialne vakcine, ki vsebujejo en sev virusa PRRS, niso učinkovite ali pa so le deloma učinkovite, kadar so prašiči okuženi z genetsko različnim podtipom virusa PRRS (Kimman in sod., 2009), kar govori o delni navzkrižni zaščiti med genotipi in podtipi virusa PRRS (Murtaugh in Genzow, 2011). Vpliv na učinkovitost vakcine, kjer v reji kroži drug podtip virusa, kot ga vsebuje vakcina, je precej bolj zapleten kot samo vprašanje o genetski sorodnosti (Mateu in Diaz, 2008; Prieto in sod., 2008). To so ugotovili na podlagi študije, ki so jo izvedli Diaz in sodelavci (2006). Prašiče so cepili z vakcino, ki je vsebovala virus genotipa 1 in nato okužili s sevom, ki je bil 92 do 96-odstotkih soroden vakcinalnemu sevu. Ugotovili so slabšo imunost pri inokulaciji s sevom, ki je bil bolj v sorodu z vakcinalnim sevom, medtem ko je po okužbi z manj sorodnim sevom sledila boljša imunost zaradi večjega števila celic, ki izločajo IFN- γ . To pomeni, da je pri heterologni zaščiti sposobnost posameznega seva virusa, da sproži dovolj močan celični imunski odziv pomembnejša kot genetska sorodnost med vakcinalnim in divjim sevom virusa (Mateu in Diaz, 2008).

2.6.4 Maternalna imunost

Maternalna protitelesa naj bi imela precej kratko trajanje. V raziskavi, ki so jo opravili Zimmerman in sodelavci (2006), so dokazali, da je 12 do 44 % pujskov imelo maternalna protitelesa do 3. tedna starosti, samo 2 do 16 % pa do 5. tedna starosti. Medtem ko Murtaugh in sodelavci (2002) poročajo, da naj bi se maternalna protitelesa ohranjala 6 do 8 tednov starosti. Po padcu titra maternalnih nevtralizacijskih protiteles so pri tekačih v okuženi reji pogosto dokazali virus PRRS (Chung in sod., 1997).

2.6.5 Imunosupresija

Virus se razmnožuje v alveolarnih makrofagih, zaradi česar je prizadeta prva obrambna linija v pljučih. Zato so sklepali, da virus deluje imunosupresivno (Murtaugh in sod., 2002). Klinične študije so pokazale, da virus PRRS vpliva imunosupresivno na gostiteljev odgovor ob sekundarnih okužbah. Ta sklep so utemeljili na podlagi dveh opažanj in sicer, da so sekundarne okužbe pogoste pri PRRS in da je eksperimentalna okužba z virusom PRRS povzročila hujšo obliko bolezni, ki jo povzroča prašičji respiratorni koronavirus (Renukaradhya, 2010). V omenjeni študiji so ugotovili pri okužbi z obema patogenima virusoma višjo raven IL-6, IL-12 in IL-10. Prav tako se je povečala količina limfocitov T, mieloidnih celic in T1 pomagalk. Tudi patološkoanatomske spremembe so bile izrazitejše pri okužbi z obema povzročiteljema. Prav tako se pri PRRS poveča incidenca okužb s *S. suis*, *B. bronchiseptica*, *M. hyopneumoniae*, *H. parasuis* in še nekaterih drugih bolezni ter parazitoz (Galina in sod., 1994; Solano in sod., 1997; Thacker in sod., 2000; Thanawongnuwech in sod., 2004b).

Murtaugh in sodelavci (2002) trdijo, da okužba z virusom PRRS ne ovira mehanizma naravne obrambe, kamor sodi fagocitoza (Segales in sod., 1998) prav tako ni motena genska ekspresija vnetnih citokinov. Murtaugh (2012) navaja, da izražanje citokinov kot so IL 10, IL-4 naj ne bi bilo znamenje imunosupresivnega delovanja virusa PRRS, saj količina IL-10 ni bila v korelaciji s količino virusa v krvi pri okužbi prašičev z malo in zelo virulentnim sevom PRRS. Trditev o sistemskem poslabšanju gostiteljeve imunosti ob prisotnosti virusa PRRS po mnenju nekaterih avtorjev ni dokazana (Albina in sod., 1998). Prav tako so nekateri avtorji ugotovili, da virus PRRS ni imunomodulator in ne učinkuje imunosupresivno (Beilage, 1995; Albina, 1997a, 1997b; Molitor, 1997; Drew, 2000; Mourtaugh, 2012).

2.7 DIAGNOSTIKA

Diagnostika PRRS temelji na:

- subjektivnih informacijah: zgodovina, klinični znaki, makroskopske in mikroskopske spremembe,
- objektivnih informacijah: proizvodni rezultati, dokaz virusa, dokaz protiteles (Zimmerman in sod., 2006; 2012).

Za diagnostične preiskave se odločimo v čredah z reproduktivnimi motnjami v plemenski čredi in respiratornimi boleznimi pri vseh kategorijah prašičev. Pri akutnem izbruhu PRRS pogine v čredi 5 do 10 % svinj, pregni se jih do 50 % in abortira jih 10 do 50 %, 25 % svinj prasi 110 dan brejosti. Mumificiranih plodov je 21,7 %, pogine pa 43,3 % sesnih pujskov, 28 % odstavljenecv in 26,9 % pitancev. Zraven tega beležimo slabši prirast in slabšo konverzijo krme (Pejsak in Markowska-Daniel, 1997; Mengeling in Lange, 2000).

Na podlagi kliničnih znakov lahko postavimo le sum na PRRS, saj ni tipičnih kliničnih znakov in pri patološkoanatomskem pregledu ne najdemo značilnih sprememb. Diferencialno diagnostično pridejo v poštev kot možni mikrobeni povzročitelji bolezni prašičji parvovirus, virus hemaglutinacijskega encefalomielitisa, virus psevdorabiesa (virus Aujeszkyjeve bolezni), virus prašičje influence, cirko virus tip 2, enterovirus, virus klasične prašičje kuge, citomegalovirus in leptospira (Zimmerman in sod., 2012). Vzporedne ali sekundarne okužbe zabrišejo in zapletejo klinično sliko PRRS. Dokončna potrditev bolezni temelji na laboratorijski diagnostiki (Batista, 2005).

Velikost vzorca za potrditev bolezni je odvisna od velikosti črede, predvidene prevalence bolezni in odstotka želene verjetnosti. Collins in sodelavci (1996) navajajo, da z odvzemom 30 vzorcev lahko s 95 % verjetnostjo trdimo, da je prevalenca bolezni večja kot 10 %, pri vzorčenju 10 vzorcev pa lahko s 95 % verjetnostjo trdimo, da je prevalenca večja kot 30 %. Danski sistem vzorčenja pa predpisuje, da na farmi, kjer je več kot 50 plemenskih svinj oz. 200 pitancev odvzamemo vzorce krvi 20 prašičem, na farmi z manj kot 50 plemenskih svinj pa 10 prašičem (Mortensen in sod., 2002). Cannon in Roe (1982) sta naredila tabelo, ki predpisuje, kako velik mora biti vzorec, da lahko dokažemo bolezen na podlagi 5, 10 in 20-odstotne prevalence. Ne glede na velikost črede zadošča 10 vzorcev, da lahko z 90 % verjetnostjo trdimo, da je prevalenca bolezni več kot 20 % oz. 13 vzorcev, da lahko s 95 % verjetnostjo trdimo, da je prevalence bolezni več kot 20 %.

2.7.1 Dokaz virusa

2.7.1.1 Dokaz antigena z metodo imunohistokemije

Protein kapside virusa PRRS lahko v citoplazmi okužene celice dokažemo z dvema imunohistokemijskima metodama (IHC). To sta imunofluorescenčni test (IF) in imunoperoksidazni test (IP). Pri obeh metodah je optimalni čas za dokaz antigena 4 do 14 DPO, ko so titri virusa v citoplazmi okužene celice najvišji, med 30 in 70 DPO pa antigena ne moremo več dokazati (Yeager, 2002). Pljuča, srce, ledvici, bezgavke, vranica, timus in tonzile so najprimernejši organi za omenjeni imunohistokemijski metodi. IP se lahko izvede tudi na vzorcih, fiksiranih v 10 % formalinu. IF je hitrejša, vendar za izvedbo te metode potrebujemo sveže tkivo. Najprimernejši organ so pljuča (zamrznjena), uporabimo lahko tudi pljučni izperek (Zimmerman in sod., 2006; 2012). Pri obeh testih potrebujemo specifična protitelesa za dokaz antigena virusne kapside v citoplazmi okužene celice (Yeager, 2002; Mengeling in Lager, 2000).

2.7.1.2 Izolacija virusa

Izolacija virusa PRRS je uspešnejša pri mlajših prašičih, kajti pri njih se virus zadržuje dalj časa v večjih količinah (Wills in sod., 2003). Pri sesnih pujskih in tekačih traja viremija 28 do 42 DPO, pri svinjah in pitancih pa 7 do 21 DPO (Christopher-Hennings in sod., 1995; Christopher-Hennings in sod., 2001). Tako je pri mlajših prašičih količina virusa največja 4 do 7 DPO, nato titer pada do 42 DPO. Virus lahko dokažemo tudi v slini do 42 DPO (Christopher-Hennings in sod., 1995; Wills in sod., 1997), v tonzilah do 130 DPO in v bezgavkah 157 DPO (Wills in sod., 2003). Vzorec za izolacijo virusa je treba nemudoma po odvzemu Shraniti na 4 °C in ga poslati v laboratorij v 24 do 48 urah (Jacobs in sod., 2010). Virus je občutljiv za visoke temperature, saj se je infektivnost virusa zmanjšala za 50 % po inkubaciji 12 ur pri 37 °C. Virus je povsem izgubil kužnost po inkubaciji 48 ur pri 37 °C oziroma v 45 minutah pri temperaturi 56 °C (Benfield in sod., 1992).

Virus lahko izoliramo na pljučnih alveolarnih makrofagih (PAM) in pa na celičnih linijah CL-2621, MARC-145, PK-15 in MA-104 (Benfield in sod., 1992). Virusi PRRS genotipa 1 se razmnožujejo na PAM, medtem ko virusi genotipa 2 tako na PAM kot na MARC-145 in ostalih celičnih linijah. Virus PRRS povzroča citopatski efekt (Bøtner in sod., 1994).

2.7.1.3 Dokaz virusne nukleinske kisline

Za dokaz nukleinske kisline virusa PRRS se uporablja različne molekularne metode. Molekularne metode so bolj občutljive kot izolacija virusa, IF in IP (Martinez in sod., 2008).

Metoda reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) je najpogosteje uporabljena metoda za dokaz virusa PRRS v tkivu, serumu ali semenu okuženih živali. Je zelo specifična in zelo občutljiva. Seme naj bi veljalo kot »težaven« material za dokaz virusa PRRS (Batista, 2005; Martinez in sod., 2008). Metoda RT-PCR ima številne prednosti pred izolacijo virusa, IF in IP (Zimmerman in sod., 2012):

- večjo občutljivost in specifičnost,
- dokaz virusne RNA tako v akutni kot endemični fazni bolezni,
- dokaz virusne RNA iz vzorcev semena in blata, ki so lahko toksični za celične kulture,
- sorazmerno hitra metoda, saj so znani rezultati v 1 do 3 dneh,
- pri produktu PCR lahko ugotavljamu nukleotidna zaporedja in s tem dobimo dodatne podatke o virusu.

V akutni fazni bolezni sta serum in tkiva organov najprimernejši material za PCR. Pri merjascih je v obdobju 6 DPO serum prednostni material za PCR (Reick in sod., 2006), v semenu lahko virus dokažemo do 92 DPO, povprečni čas pa je 35 DPO (Christopher-Hennings in sod., 2001). Virusno nukleinsko kislino lahko dokažemo s PCR do 86 DPO v bezgavkah (Bierk in sod., 2001), 105 DPO v brisu žrela in tonsilah (Wills in sod., 2003). Prav tako lahko za dokazovanje virusne RNA uporabimo vzorec slini prašičev. V slini so v eksperimentalnih razmerah virus PRRS dokazali od 2 tedna po okužbi do 18 tednov po okužbi (Ramriez in sod., 2012). Kittawornrat in sodelavci (2010) so dokazali virus v slini prašičev že 7 DPO in vse do konca poskusa, ki je trajal 3 tedne. Virus je v slini stabilen, vendar mora biti vzorec zamrznjen ali vsaj ohlajan do testiranja (Prickett in sod., 2010). Pri vzorcih slini je treba uporabiti verificirane kite za testiranje (Chittick in sod., 2011).

Toplak in sodelavci (2012) so ugotovili, da komercialni RT-PCR kiti niso enako občutljivi za različne podtipe virusa PRRS. Poudarili so, da je treba diagnostične PCR kite nenehno posodabljati v smislu prilagoditve oligonukleotidnih začetnikov in sond glede na pojavljanje genetskih različic na nekem območju.

2.7.1.4 Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja

Genetska tipizacija ugotovljenih virusov PRRS z določitvijo nukleotidnega zaporedja celotnega genoma ali dela genoma je zelo koristna informacija za razumevanje tako uspeha kot neuspeha pri ukrepanju zoper PRRS. Z določitvijo nukleotidnega zaporedja posameznega seva lahko določimo morebitni vir okužbe, območje širjenja in učinkovitost vakcinacije (Batista, 2005).

S primerjavo nukleotidnih zaporedij sevov virusa PRRS dokažemo:

- da je PRRS na farmi posledica okužbe z enim ali pa z več različnimi virusnimi sevi,
- širjenje virusa med čredami,
- razliko med vakcinalnimi in divjimi sevi virusa (Zimmerman in sod., 2012).

Največje število dostopnih sekvenc v genski banki je na regijah ORF 5 in ORF 7 virusnega genoma. Regija ORF 5 je najbolj variabilen del genoma virusa PRRS in jo zato pogosto uporabljamo za filogenetske študije virusa PRRS. V Genski banki najdemo največje število sekvenc prav iz regije ORF 5 (Zhou in sod., 2009; Lee in sod., 2010).

Iz ugotavljanja nukleotidnega zaporedja ne moremo sklepati, kako virulenten je posamezen sev, razen če gre za zelo virulentni sev virusa PRRS, pri katerem so potrdili delecijo v genomu (Zhou in sod., 2009) in predvidevali imunski odziv (Batista, 2005; Prieto in sod., 2008).

2.7.2 Dokaz protiteles

Serološka diagnostika omogoča dokazovanje specifičnih protiteles, ki je pomembna diagnostična metoda. Protitelesa lahko dokažemo v serumu, mesnem soku ali v slini prašičev (Prickett in sod., 2010). Pri sesnih pujskih so kolostralna protitelesa lahko prisotna največ 5 tednov. Za dokazovanje protiteles uporabljamo encimskoimunski test (ELISA), indirektni imunoperoksidazni test (IPMA), indirektni imunofluorescenčni test (IFA) in virus nevtralizacijski test (VN) (Zimmerman in sod., 2012).

Testi IPMA, IFA in VN so zelo specifični, vendar imajo omejeno diagnostično vrednost, saj niso standardizirani in jih ne uporabljamo v rutinski diagnostiki. Za izvedbo omenjenih testov potrebujemo celične kulture ali celične linije, rezultat pa je odvisen od homolognosti med uporabljenim sevom virusa PRRS v testu in med protitelesi. Najvišjo specifičnost dosežemo z

uporabo homolognega seva virusa. Vsi trije testi lahko razlikujejo med okužbo z genotipom 1 ali genotipom 2 virusa PRRS (Prickett in sod., 2010; Molina in sod., 2008a).

2.7.2.1 Dokaz protiteles z encimskoimunskim testom (ELISA)

ELISA je diagnostično najpomembnejši test za dokaz protiteles proti virusu PRRS, je hiter in poceni (Yoon in sod., 2003). Obstaja več različnih komercialnih testov ELISA, vendar pa ELISA proizvajalca IDEXX (HerdChek® X3 PRRS) velja za »zlati standard«, za dokazovanje protiteles proti virusu PRRS. Test je zelo občutljiv (98,9 %) in zelo specifičen (99,9 %), vendar pa z njim ne moremo razlikovati vakcinalnih protiteles od protiteles, ki so nastala po okužbi z divjim virusom, niti ločiti protiteles proti genotipu 1 od tistih proti genotipu 2. Protitelesa lahko dokažemo že 9 DPO, vrh pa dosežejo 30 do 50 DPO in nato v obdobju od 4 do 12 mesecev titer protiteles pada do negativnega rezultata (Zimmerman in sod., 2012).

2.7.2.2 Dokaz protiteles z indirektnim imunoperoksidaznim testom na makrofagih (IPMA)

IPMA se lahko uporablja kot potrditveni test za ELISA. Protitelesa lahko dokažemo 7 DPO, vrh dosežejo 4 mesece po okužbi in od šestega meseca po okužbi počasi upadajo vse do 1 leta po okužbi (Larsen, 2011).

2.7.2.3 Dokaz protiteles z indirektnim imunofluorescenčnim testom (IFA)

Z IFA lahko glede na konjugat dokazujemo tako imunoglobuline M (IgM) kot imunoglobuline G (IgG) zelo zgodaj to je 5 do 14 DPO (Joo in sod. 1997). IgM se ohranljajo 21 do 28 DPO, medtem ko IgG dosežejo vrh 30 do 50 DPO. IFA se lahko uporablja kot potrditveni test za ELISA. Z IFA lahko dokazujemo protitelesa tudi v mesnem soku in slini (Molina in sod., 2008a; Prickett in sod., 2010).

2.7.2.4 Dokaz protiteles z virus nevtralizacijskim testom (VN)

Z virus nevtralizacijskim testom ugotavljamo nevtralizacijska protitelesa, ki jih lahko dokažemo šele 3 tedne po okužbi. Najvišji titer dosežejo 60 do 90 DPO in se lahko ohranljajo več kot leto dni po okužbi (Benfield in sod., 1992; Eichhorn in Frost, 1997).

2.8 UKREPI OB POJAVU PRRS

Bolezen lahko kontroliramo, eliminiramo ali izkoreninimo (Štukelj in Valenčak, 2011). Kontrola bolezni pomeni izvajanje ukrepov, ki privedejo do znatnega zmanjšanja zdravstvenih težav in ekonomskih izgub. Eliminacija bolezni pomeni, odsotnost kliničnih znakov in virusa, še vedno pa lahko dokažemo protitelesa. Uspešni eliminaciji bolezni navadno sledi njeno izkoreninjenje. Izkoreninjenje (eradikacija) bolezni pomeni, da v čredi ni več klinično bolnih prašičev pa tudi ne virusa in protiteles ter patološkoanatomskih sprememb (Toma in sod., 1991). Za uspešno eliminacijo bolezni je treba vzpostaviti stabilno plemensko čredo. Stabilna plemenska čreda je čreda, v kateri imajo vse plemenske živali čim bolj enoten titer protiteles in nobena več ne izloča virusa (Dee, 1998). Stabilizacijo plemenske črede ugotavljamo s serološkimi in molekularnimi metodami (Presente in sod., 2006).

2.8.1 Biovarnost

Pod pojmom biovarnost razumemo izvajanje različnih ukrepov in postopkov za preprečitev vnosa različnih patogenih mikrobov v čredo in njihovega širjenja znotraj črede. Uvedba biovarnostnih ukrepov terja spremembo in prilagoditev navad ter obnašanja ljudi, ki delajo z živalmi (McCaw, 1995; Canadian Swine Health Board, 2010). Biovarnostni ukrepi so nujni tako pri kontroli bolezni kot tudi za uspešno eliminacijo bolezni (Otake in sod., 2010; Pitkin in sod., 2011).

Biovarnost se deli na:

- zunanj biovarnost, kar pomeni preprečevanje vnosa povzročitelja na farmo
- notranja biovarnost, kar pomeni preprečevanje širjenja povzročitelja znotraj farme

2.8.1.1 Zunanja biovarnost

Zunanja biovarnost zajema ukrepe s katerimi preprečimo vnos povzročiteljev kužnih bolezni na farmo. Biovarnostni ukrepi na farmi obsegajo kupovanje negativnih prašičev na PRRS, karantene, transport prašičev z očiščenimi in razkuženimi vozili, prepoved vstopa na farmo nezaposlenim in obvezno prhanje ter preoblačenje zaposlenih (Pitkin in sod., 2011). Ker so dokazali prenos virusa tudi z zrakom, so rejci v ZDA preprečili prenos virusa PRRS z nameščanjem zračnih filterov zlasti na območjih, gosto naseljenih s prašiči (Otake in sod., 2010). Zračni filtri so se izkazali kot učinkovito sredstvo za preprečevanje aerogenega prenosa iz okolja na farmo ob hkratnih drugih biovarnostnih ukrepov (Otake in sod., 2010; Reicks, 2010).

Da bi preprečili širjenje virusa, je nujno poznati poti širjenja. Prašiči se okužijo z direktnim kontaktom z okuženim prašičem ali indirektno z živalskimi proizvodi, biološkimi vektorji, s kontaminiranim materialom in v kontaminiranem okolju.

2.8.1.1.1 Direktno širjenje virusa

Prašiči so edine živali, ki so dovetne za okužbo z virusom PRRS (Zimmerman in sod., 1997; Rosenfeld in sod., 2009). Okuženi prašiči lahko virus izločajo s krvjo, slino, z mlekom, s kolostrumom, z urinom, z blatom in s semenom (Rossow in sod., 1994; Wills in sod., 1997).

2.8.1.1.1.1 Žive živali

Da bi preprečili vnos virusa z živimi prašiči, moramo izvajati naslednje biovarnostne ukrepe:

- kupovati prašiče iz rej z negativnim statusom PRRS,
- kupovati prašiče iz čim manj različnih rej,
- urediti obvezno izolacijo oz. karanteno za novo nabavljene prašiče, ki izvirajo iz PRRS negativne reje; karantenski objekt naj bo vsaj 120 m oddaljen od hlevov prašičev. Karantena naj traja najmanj 30 dni in v tem času se morajo dnevno izvajati klinični pregledi prašičev,
- opraviti laboratorijsko testiranje; prašičem v karanteni moramo odvzeti kri dvakrat, in sicer prvič 24 do 48 ur po namestitvi v karantenski objekt in drugič 5 do 7 dni pred koncem karantene. Prašiče testiramo glede na prisotnost protiteles in virusa (McCaw, 1995; Batista, 2005; Pitkin, 2011; Zimmerman in sod., 2012).

2.8.1.1.2 *Seme*

Seme, ki ga uporabljamo za umetno osemenjevanje, mora izvirati iz PRRS negativne reje. Naravni pripust je prepovedan (Pitkin, 2011).

2.8.1.1.2 *Indirektno širjenje virusa*

Virus PRRS se prenaša mehanično na številne načine:

- transportna sredstva; so pogosto način prenosa virusa v čredo. Transportna sredstva morajo biti očiščena, razkužena ter posušena. Klančina za nalaganje prašičev mora biti postavljena tako, da tovornjaku ni treba zapeljati na dvorišče. Prav tako ne samejo na dvorišče tovornjaki za odvoz kadavrov. Okoli farme je treba postaviti ograjo in razkuževalne bariere na vhodih na farmo (Dee in sod., 2006; Pitkin, 2011).
- ljudje; (zaposleni, obiskovalci, veterinarji,...) lahko prenesejo virus na telesu, obleki in obutvi. Virus PRRS ostane kužen na slami, plastiki, škornjih in nerjavečem jeklu do 24 ur pri temperaturi 25 do 27 °C, pri temperaturi -2 °C pa do 30 dni (Dee in sod., 2003). Obiskovalci naj ne bodo v stiku s prašiči 24 ur pred prihodom na farmo. Pred vstopom na farmo je priporočljivo tuširanje in nujna je uporaba čiste obleke in obutve. Veterinar, ki je odgovoren za rejo, mora imeti svojo delovno obleko in obutev na farmi. Vsi pripomočki, kot so npr. zanka za prašiče, tetovirne klešče itn., morajo biti shranjeni na farmi. Veterinar tudi ne sme uporabljati materiala in instrumentov, ki jih je že prej uporabljal na drugi farmi. Če ne gre drugače, je treba material in instrumente sterilizirati (Dee in sod., 2002; Otake in sod., 2002; Dee in sod., 2003; Pitkin, 2011).
- insekti; kot so muhe in komarji, lahko mehanično prenašajo virus iz razdalje do 2,4 kilometra od okužene farme (Otake in sod., 2003). Zato je nujna uporaba mrež proti insektom na oknih. Poleg tega pa je treba skrbeti za čistočo, uporabljati insekticide, vabe, kosit travo in izsuševati stoječe vode v okolici farme (Otake in sod., 2003; Pitkin in sod., 2009; Pitkin, 2011).
- aerosol; dokazano je, da je prenos virusa možen tudi z aerosolom, zlasti pri nizkih temperaturah in visoki vlažnosti (Dee in sod., 2005; Otake in sod., 2010; Pitkin, 2011).
- meso prašičev; virus PRRS lahko v mesu prašičev preživi 7 dni na 4 °C in več mesecev na zamrznjenem mesu pri temperaturi -20 °C (Pitkin, 2011).

2.8.1.2 Notranja biovarnost

Z ukrepi za notranjo biovarnost preprečujemo širjenje virusa na farmi in s tem zmanjšamo posledice okužbe na farmi. PRRS ima tendenco samoozdravitve, če izvajamo biovarnostne ukrepe (Pitkin, 2011).

2.8.1.2.1 Direkten prenos virusa

Direkten prenos virusa lahko preprečimo na več načinov:

- gradnja objekta z ločenimi prostori za posamezno kategorijo prašičev.
- sistem reje »all in/all out« omogoča, da je prostor prazen in ga lahko natančno očistimo, osušimo in razkužimo.
- delna depopulacija najbolj kritične kategorije prašičev. To so tekači, ki jih prestavimo na ločeno lokacijo.
- premestitev sesnih pujskov k dojiljam je dovoljena znotraj 24 ur od prasitve.
- premestitev bolnih prašičev v bolnišnični boks, ki naj bo ločen od ostalih prašičev. Priporočljiva je evtanazija slabotnih pujskov.
- prepoved vnosa lastnih mladic v plemensko čredo najmanj 6 mesecev. To je nujen ukrep za vzpostavitev stabilne plemenske črede (Otake in sod., 2002; Dee in sod., 2003; Dee in sod., 2004; Dee in sod., 2006; Pitkin in sod., 2009; Pitkin in sod., 2011).

2.8.1.2.2 Indirekten prenos virusa

Indirekten prenos virusa lahko preprečimo na več načinov:

- tehnologija reje mora zagotavljati sistem reje »all in/all out«, ki omogoča natančno čiščenje, osušitev in razkuževanje hlevov pred naselitvijo novih prašičev. V nasprotnem primeru ostane virus v prostoru in pomeni vir okužbe za novo naseljene prašiče.
- kategorije prašičev morajo biti ločene po prostorih.
- delavci in obiskovalci lahko z rokami, obleko in obutvijo posredno prenesejo virus na farmo in med posameznimi hlevi na farmi. Zato je nujno preobuvanje, preoblačenje v sveža oblačila, razkuževanje rok in uporaba rokavic.
- dezinfekcijske bariere morajo biti nameščene pred vhodom v posamezne hleve. Raztopina se mora menjavati dnevno.

- zaščitna obleka mora biti čista in za vsak objekt druga.
- obutev ali obujke je treba menjavati med posameznimi hlevi.
- zaščitne rokavice se morajo menjati med gnezdi.
- virus se zelo dobro prenaša tudi z injekcijskimi iglami (vakcinacija in uporaba antibiotikov), zato svetujejo uporabo sterilnih igel, ki jih menjamo med gnezdi, pri plemenskih prašičih pa uporabljamо sterilne igle za vsako žival.
- nosne zanke naj bodo shranjene na farmi, v nasprotnem primeru morajo biti sterilne.
- insekti, kot so muhe, komarji in drug mrčes so lahko vektorji virusa, zato namestimo na okna mreže, uporabimo insekticide ter vabe.
- glodavci; redno izvajanje deratizacije.
- voda; virus se prenaša tudi z vodo in pri temperaturi 25 do 27 °C preživi 9 do 11 dni (Amass in Baysinger, 2006). Zato je nujna uporaba čiste vode.
- aerosol; virus se prenaša tudi po zraku, zato je priporočljiva namestitev sistema filtrov za zrak (Otake in sod., 2002; Dee in sod., 2003; Dee in sod., 2004; Dee in sod., 2006; Amass in Baysinger, 2006; Pitkin in sod., 2009; Pitkin in sod., 2011).

Vsaka farma mora imeti načrt biovarnostih ukrepov. Ta med drugim vključuje izobraževanje in urjenje ljudi, ki delajo na farmi, saj je človek pomemben dejavnik učinkovite biovarnosti. Prav tako je zelo pomembno, da veterinarji, ki skrbijo za zdravstveno varstvo prašičev, poznajo biovarnostne ukrepe in jih tudi sami izvajajo. Z upoštevanjem biovarnostnih protokolov zmanjšamo možnost vnosa virusa PRRS v čredo in s tem vzdržujemo dobro zdravstveno stanje, ki omogoča dobre proizvodne rezultate. Širitev biovarnosti na večje območje na način, da kmetje na določenem območju izvajajo tako notranje kot zunanje biovarnostne ukrepe, zmanjša širjenje virusa PRRS in vpliva na učinkovito eliminacijo in kasnejše izkoreninjenje PRRS v regiji (Pitkin in sod., 2011).

2.8.2 Kontrola bolezni

S kontrolo bolezni zmanjšamo obolenost in smrtnost na farmi, ki je posledica kroženja virusa v čredi. S tem dosežemo razvoj specifične imunosti proti farmskemu sevu virusa ter izboljšamo proizvodne rezultate (Dee, 1997; Dee, 1998; Morrison, 2012).

2.8.2.1 Aklimatizacija mladic

Aklimatizacija pomeni izpostavljanje serološko negativnih nadomestnih mladic homolognemu sevu virusa za dovolj dolgo obdobje, da se mladice prekužijo in razvijejo specifično imunost (Fano in sod., 2005; Vashisht in sod., 2008). Ključna populacija pri kontroli PRRS so nadomestne mladice (Dee, 1997; Batista in sod., 2004; Presente in sod., 2006; Vashisht in sod., 2008). Dosledna aklimatizacija nadomestnih plemenskih prašičev izboljša proizvodne rezultate (Zimmerman in sod., 2012). Presente in sodelavci (2006) so potrdili, da lahko aklimatizacija mladic v kombinaciji z biovarnostjo pred premestitvijo v plemensko čredo prepreči izbruh PRRS s farmskim sevom virusa. Pred premestitvijo v plemensko čredo prašiče testiramo z ELISA in z metodo RT-PCR. V plemensko čredo preselimo mladice, ki so pozitivne glede na protitelesa in negativne glede na prisotnost virusa (Dee in sod., 1994; Dee, 1997; Zimmerman in sod., 2012). Aklimatizacija mladic traja od 30 do 60 dni, to je dovolj časa, da se okužijo in tudi prebolijo bolezen (Dee, 1997; Dee, 2003). Aklimatizacijo dosežemo tako, da mladice izpostavimo tekačem z viremiko kot donorjem virusa mladicam, lahko pa v ta namen uporabimo tkiva mrtvorojenih, slabotnih in mumificiranih pujskov. Tretja možnost je serumizacija s farmskim (homolognim) sevom virusa ali vakcinacija z živo oslabelo vakcino (Batista in sod., 2002; Dee, 2003; Zimmerman in sod., 2012). Uporaba odstavljencev v viremiji je sorazmerno hitra in zelo poceni (Vashisht in sod., 2008). Iz tkiv mrtvorojenih, slabotnih in mumificiranih pujskov lahko pripravimo vakcino in z njo i/m cepimo nadomestne mladice, ki se še niso srečale z virusom (Batista in sod., 2002; Zimmerman in sod., 2012). Serumizacija se bolj in bolj uveljavlja zaradi velike heterogenosti virusa PRRS in dejstva, da komercialna vakcina ne spodbudi dobre zaščite proti novim podtipom virusa PRRS (Batista in sod., 2002). Živa oslabela vakcina kot tudi mrtva vakcina se lahko uporabita za aklimatizacijo mladic, vendar z omejenim učinkom zaradi velike genetske raznolikosti med virusi PRRS (Zimmerman in sod., 2006; 2012).

2.8.2.2 Umetno osemenjevanje

Če želimo zmanjšati škode zaradi PRRS je pomembno, da dosledno uporabljamo preverjeno negativno seme, saj se virus prenaša tudi s semenom. Ugotovili so, da so merjasci s hkratno bakterijsko okužbo in okužbo z virusom PRRS, dalj časa izločali virus PRRS s semenom (Christopher-Hennings in sod. 2000; 2001). Kvaliteta semena je pri akutno bolnih merjascih slabša, zmanjša se tudi libido (Prieto in sod., 1994). Ne glede na status farme je treba vedno uporabljati negativno seme, saj je lahko seme v nasprotnem primeru stalen vir okužbe (Zimmerman in sod., 2012).

2.8.2.3 Kontrola endemskih bolezni na farmi

Virus PRRS deluje imunosupresivno, zaradi česar se na farmi poveča pogostnost vseh endemičnih bolezni kot so, streptokokni meningitis, sindrom multisistemskega poodstavitevnega hiranja, enzootska pnevmonija, Glässerjeva bolezen. Poviša se pojavljanje parazitoze in posledično poraste uporaba antibiotikov za zdravljenje sekundarnih infekcij. Pod pojmom kontrola se tako razume tudi ukrepanje zoper endemične in druge sekundarne bolezni (Batista, 2005; Zimmerman in sod., 2006; Zimmerman in sod., 2012).

2.8.3 Eliminacija bolezni

Eliminacija bolezni pomeni, da pri prašičih ni več kliničnih znakov in virusa, še vedno pa lahko dokažemo protitelesa. Uspeh eliminacije lahko posredno spremljamo s serološkimi metodami tako, da ugotavljamo, ali pada titer specifičnih protiteles v plemenski čredi pri zaporednih odvzemih, ali z molekularnimi metodami, ko ne dokažemo več virusne nukleinske kisline v plemenski čredi. Eliminacija PRRS je potrjena, ko so pri vseh plemenskih prašičih titri protiteles nizki in homogeni in ko so starejši pitanci serološko negativni. Navadno vodi eliminacija bolezni v njeno izkoreninjenje, kar pomeni, da je eliminacija bolezni predstopnja njenega izkoreninjenja (Zimmerman in sod., 2012). Prva faza pri eliminaciji bolezni je stabilizacija plemenske črede. Stabilna plemenska čreda je čreda, kjer imajo vse plemenske živali čim bolj enotne titre protiteles in v njej ni več virusa (Dee, 1998).

Eliminacijo bolezni lahko dosežemo z imunizacijo plemenske črede, kamor prištevamo naravno prekužitev, vakcinacijo in serumizacijo (Dee in Molitor, 1998; Torremorell in Christianson, 2002; Torremorell in sod, 2003; Cho in Dee, 2006; Corzo in sod., 2010; Štukelj in Valenčak, 2012; Zimmerman in sod., 2012).

Eliminacija bolezni ni možna, če ne preprečimo vnosa novega virusa PRRS na farmo. To pa lahko dosežemo z izvajanjem strogih biovarnostnih ukrepov in uvedbo dvojne zapore reje. Dvojna zapora reje pomeni, da vsaj 200 dni ne smemo na farmo dodajati novih prašičev niti lastnih mladic v plemensko čredo (Torremorell in Christianson, 2002).

Pomembno je, da kupujemo prašiče iz preverjeno negativnih rej ter da je seme za umetno osemenjevanje iz certificirano negativnih centrov (Desrosiers in Boutin, 2002; Nodelijk in sod., 2003).

2.8.3.1 Imunizacija

Cilj imunizacije je vzpostaviti stabilno plemensko čredo v kateri imajo vsi plemenski prašiči protitelesa proti virusu PRRS in noben prašič ne izloča več virusa. Ko dosežemo, da so vse svinje imune, so pujski zaščiteni s kolostrumom. Zaščita, ki jo dobijo sesni pujski od mater, traja 3 do 5 tednov, medtem ko traja zaščita po preboleli okužbi do 300 dni (Nielsen in Bøtner, 1997; Drew, 2000; Zimmerman in sod., 2012, Mateu in Diaz, 2008).

2.8.3.1.1 Naravna prekužitev

V pozitivnih farmah lahko zaustavimo kroženje virusa PRRS z naravno prekužitvijo. Naravna prekužitev je prekužitev celotne plemenske črede s homolognim sevom virusa PRRS. Na farmo ne vnašamo novih prašičev, vsaj 6 mesecev ne premeščamo lastnih mladic v plemensko čredo in izvajamo biovarnostne ukrepe (Torremorell in Christianson, 2002; Dee, 2003). Ko se prašiči med seboj okužijo, postanejo imuni in virus v imuni populaciji ne kroži več, kar privede do samoozdravitve, torej do eliminacije bolezni (Torremorell in Christianson, 2002). Prva faza prekuževanja traja 1 do 2 meseca. V tem času se vsi prašiči srečajo z virusom PRRS, 3 do 4 mesece po okužbi si prašiči opomorejo in razvijejo imunost proti sevu, kateremu so bili izpostavljeni. Po 4 do 6 mesecih postane plemenska čreda stabilna (Torremorell in Christianson, 2002; Dee, 2009). Pri naravni prekužitvi gre za homologno zaščito, ki naj bi bila najboljša zaščita, vendar pa je za razvoj takšne zaščite nujna zapora reje (Meier in sod., 2000; Torremorell in Christianson, 2002; Molina in sod., 2008b). Farme, ki so primerne za naravno prekužitev imajo ločene proizvodne faze in so dovolj oddaljene od ostalih farm. Za umetno osemenjevanje morajo uporabljati preverjeno negativno seme (Torremorell in Christianson, 2002). Uspešnost te metode je 90 % na farmah, kjer imajo posamezne proizvodne faze na ločenih mestih (Zimmerman in sod., 2012). Na farmah, kjer so vse proizvodne faze na isti lokaciji, pa je naravna prekužitev manj uspešna. Pri takih farmah je nujno preprečiti prenos virusa s tekačev na plemensko čredo (Torremorell in Christianson, 2002; Dee, 2003).

Ob začetku izvajanja naravne prekužitve na farmi je treba ugotoviti možen vir okužbe, kar pomeni dognati, kje virus kroži, pri kateri kategoriji in starosti prašičev in pri kateri starosti se prašiči okužijo. Na podlagi ugotovitev pa moramo določiti optimalne biovarnostne ukrepe in prilagoditi tok prašičev, da se tako zmanjša možnost prenosa virusa. Če na podlagi ugotovitev ne moremo preprečiti širjenja virusa na farmi, je potrebno dodatno izvesti delno depopulacijo

kategorije prašičev (Torremorell in Christianson, 2002). Torremorell in Christianson (2002) opisujeta 5 faz naravne prekužitve na farmi, kjer so posamezne proizvodne faze na ločenih lokacijah: v prvi fazi je treba na farmi ugotoviti okuženo skupino, skupino v fazi pridobivanja protiteles in imuno skupino. Sledi druga faza, v kateri izvedemo zaporo farme, ki naj traja najmanj 6 mesecev (v večini primerov je čas zapore daljši), to je čas, ki je potreben, da prašiči pridobijo imunost in da zaustavimo kroženje virusa v reji. V tretji fazi je treba najti vir negativnih nadomestnih mladic, v četrti fazi pa na farmo premestimo mladice, ki še niso imele stika z virusom PRRS, da ugotovimo, ali smo odstranili virus s farme. V zadnji peti fazi pa je treba eliminirati virus iz preostale populacije prašičev. Zato je najpreprostejša depopulacija tekačev, ki nam omogoči dobro čiščenje in razkuževanje hlevov.

Naravna prekužitev je pogosto uporabljana metoda eliminacije PRRS zlasti v ZDA (Corzo in sod., 2010), saj je skupaj z zaporo reje učinkovita in najcenejša metoda eliminacije PRRS (Schaefer in Morrison, 2007; Yeske, 2010). Slaba stran naravne prekužitve je, da traja zapora 6 mesecev, zaradi česar se zmanjša število plemenskih svinj, zato je manj prasitev. Morrison (2011) predлага, naj pred zaporo v plemensko čredo dodamo večje število mladic, ki bi zadoščale za nemoteno proizvodnjo v času prepovedi dodajanja nadomestnih mladic.

2.8.3.1.2 Vakcinacija

Namen vakcinacije je spodbuditi dober imunski odziv, ki bo ščitil prašiče pred okužbo z virusom PRRS. Obstajajo tako mrtve kot žive oslabljene vakcine. Obe vrsti vakcin vsebujujo samo en podtip virusa bodisi virus Lelystad (genotip 1) bodisi VR-2332 (genotip 2). Vakcine z živim oslabljenim virusom povzročijo boljšo imunost v primerjavi z mrtvimi vakcinami, pripravljenimi iz inaktiviranih, mrtvih virusov, vendar pa ostaja nevarnost izbruha bolezni zaradi vakcinalnega virusa (Murtaugh in sod., 2010; Charerntantanakul, 2012). Takšne vakcine naj se ne bi uporabljale kot preventiva v negativnih čredah, pri brejih plemenskih svinjah in merjascih. Že nekaj let so na tržišču tudi polivalentne vakcine, v katerih so virus PRRS in *Haemophilus parasuis*, virus PRRS, *Haemophilus parasuis* in *Erysipelotrix rhusiopathiae* ter virus PRRS, prašičji parvovirus in *Leptospira interrogans* (Dee, 2003).

Trenutno registrirane vakcine niso učinkovite v primeru, da farmski sev virusa ni zelo soroden z vakcinalnim sevom, poleg tega pa lahko žive vakcine povzročijo izbruh bolezni z vakcinalnim sevom virusa in tako lahko krožita na farmi dva tipa virusa PRRS, vakcinalni in divji sev (Cano

in sod., 2007a; Cano in sod., 2007b). Murtaugh in Genzow (2011) poudarjata, da gre pri uporabi vakcinalnega heterolognega seva kljub vsemu za neko navzkrižno zaščito, zaradi česar se po vakcinaciji za nekaj časa umirijo klinični znaki in se izboljšajo proizvodni rezultati. Zato vakcine označujejo kot »pomoč pri zmanjšanju« kliničnih znakov (Dee, 2003). Učinkovita vakcina bi morala izpolnjevati vsaj tri zahteve: učinkovitost, univerzalnost in varnost. Cilj priprave učinkovite vakcine je spodbuditi navzkrižno zaščito proti heterolognim podtipom virusa (Mateu in Diaz, 2008).

Žive oslabljene vakcine povzročajo razmeroma slab humorálni in celični imunski odziv. Specifična protitelesa proti virusu PRRS se pojavijo približno 2 tedna po vakcinaciji in dosežejo vrh v 4 tednih po vakcinaciji (Corzo in sod., 2010). Večina protiteles je usmerjena proti virusnemu proteinu N, ta protitelesa pa nimajo nevtralizacijske sposobnosti. V raziskavi, ki so jo izvedli z aplikacijo žive oslabele vakcine prašičem, ki so jih predhodno okužili z divjim virusom PRRS, vakcina ni zagotovila oz. povzročila razvoja specifičnih protiteles proti divjemu virusu PRRS. To kaže, da vakcina ni učinkovita, če vakcinalni sev ni zelo soroden divjemu virusu PRRS (Bassaganya-Rier in sod., 2004; Martelli in sod., 2007; Martelli in sod., 2009). Zaradi slabega imunskega odgovora po vakcinaciji, je treba za zmanjšanje reprodukcijskih izgub ponavljati vakcinacijo z živo oslabljeno vakcino (Bassaganya-Rier in sod., 2004). PRRS živa oslabljena vakcina pa pomaga zaščititi mladice pred viremijo, zmanjša prenatalno in postnatalno smrtnost in okužbo med brejostjo, kljub temu da ni homologna (Scortti in sod., 2006). Pujski vakciniranih svinj so težji v primerjavi s pujski nevakciniranih svinj (Rowland, 2010). Vakcinacija okuženih svinj pomaga zniževati število abortusov in pregonitev in zvišuje število sesnih pujskov in odstavljenih pujskov (Alexopoulos in sod., 2005; Pejsak in Markowska-Daniel, 2006). Pri tekačih in pitancih se po vakcinaciji umirijo viremija in respiratorni znaki ter se izboljšajo proizvodni rezultati (Charerntantanakul in sod., 2006; Cano in sod., 2007a; Cano in sod., 2007b).

Mrtve vakcine proti virusu PRRS so registrirane v EU in drugod po svetu, ne pa v ZDA (Charerntantanakul, 2012). Drugače kot žive oslabljene vakcine, te ne spodbudijo nastanka protiteles, ki bi bila dokazljiva z ELISA (Kim in sod., 2011). Sprožijo tudi slab celični imunski odgovor (Bassaganya-Riera in sod., 2004; Piras in sod., 2005). Vendar pa je pojačan imunski odziv zaznan 2 tedna po drugi vakcinaciji (Bassaganya-Riera in sod., 2004; Kim in sod., 2011). Mrtve vakcine naj bi se uporabljale kot preventivna zaščita črede, ki še ni imela stika z virusom

(Charerntantanakul, 2012). Mrtve vakcine so manj učinkovite kot žive oslabljene vakcine, kljub temu pa pri omenjenih prašičih zmanjšajo reprodukcijske motnje, izgube ter transplacentarni prenos virusa (Scortti in sod., 2007). Mrtve vakcine so v nasprotju z živimi varne (Charerntantanakul, 2012).

Enoten načrt vakcinacije, ki bi bil primeren za vse farme, ne obstaja. Potrebno je pripraviti individualne programe, ki upoštevajo način reje na farmi, posebnosti objektov in tok prašičev. Študijam, ki so jih opravili različni avtorji, so skupne nekatere ugotovitve: vakcinacija je učinkovitejša, če jo izvedemo dvakrat v obdobju dveh mesecev in hkrati z njo izvedemo zaporo reje za 60 dni; heterolognega farmskega seva virusa PRRS ne moremo eliminirati zgolj z vakcinacijo, lahko pa skrajšamo čas širjenja virusa, zmanjšamo pojavnost kliničnih znakov in izboljšamo proizvodne parametre. Prav tako prašiči, ki so bili predhodno izpostavljeni vakcinalnemu sevu, niso zaščiteni proti divjemu sevu PRRS po eksperimentalni okužbi. Tako so sklepali, da je vakcinacija, ki se ponavlja vsak mesec, učinkovita metoda kontrole, ni pa metoda za eliminacijo PRRS s farme (Dee in Philips, 1998; Cano in sod., 2007a).

Gillespie in Caroll (2003) poročata o možnih tehnikah eliminacije PRRS z vakcinacijo na farmi prašičev, kjer so vse proizvodne faze na isti lokaciji. Eliminacija PRRS je potekala v dveh korakih, najprej so ugotovili serološki profil posameznih kategorij prašičev in zatem, kje kroži virus. Temu je sledila stabilizacija plemenske črede. V ta namen so hkrati vakcinirali celotno plemensko čredo z živo oslabljeno vakcino. Z drugim korakom pa so prekinili prenos virusa z drugih kategorij prašičev, pri katerih so uporabili živo oslabljeno vakcino in izvedli različne biovarnostne ukrepe. Vsak mesec so opravili pregled glede na prisotnost virusa in protiteles. Za potrditev eliminacije virusa iz plemenske črede so uporabili prašiče, ki še niso imeli stika z virusom in ki so jih mesečno testirali na prisotnost protiteles. Uporabljali so tudi metodo depopulacije in vakcinacijo tekačev. Ko so dosegli stabilnost plemenske črede, depopulacija ni bila več potrebna. Avtorja sta predlagala tudi zapora reje. Kroženje virusa se je zaustavilo v 60 dneh, kolikor je trajala tudi zapora reje. Nato so pričeli dodajati zdrave mladice, ki so jih uporabili za kontrolo stabilne plemenske črede. Kadar mladic niso uporabili za kontrolo stabilne plemenske črede, so jih pred premestitvijo dvakrat vakcinirali s komercialno živo oslabljeno vakcino.

Eliminacija na farmi, kjer so vse proizvodne faze na isti lokaciji je težje izvedljiva kot na tistih, ki imajo proizvodne faze na ločenih lokacijah (Torremorell in Christianson, 2002). Zato je treba

takšno farmo obravnavati kot farmo na dveh lokacijah, kar pomeni stroge biovarnostne ukrepe, tuširanje, preoblačenje, preobuvanje med hlevom plemenske črede in hlevom pitancev; zraven tega morata biti objekta fizično ločena.

2.8.3.1.3 Serumizacija

Zaščita prašičev je učinkovita le, če je homologna, kar pomeni, da so prašiči zaščiteni le, proti istemu ali zelo sorodnemu virusu PRRS, ki je v reji (Lager in sod., 1999; Diaz in sod., 2012a). Homologno zaščito dosežemo s serumizacijo. Z njo hitreje dosežemo imunost kot pa z naravnim prekužitvijo (Štukelj in Valenčak, 2012). Pri serumizaciji odvzamemo kri tekačev različnih starosti, saj pri tej kategoriji najdemo največjo količino virusa (Ruen in sod., 2007). Z metodo RT-PCR določimo količino nukleinske kisline virusa PRRS v serumu posameznih živali. Iz serumov, v katerih smo dokazali nukleinsko kislino PRRS, pripravimo inokulum, s katerim cepimo vse plemenske prašiče naenkrat, da ustvarimo enotno serološko pozitivno čredo (Batista in sod., 2002; Pugh in sod., 2005). Infektivni odmerek za povzročitev serokonverzije variira od 7 do 247 živih virusnih partiklov na prašiča (Pugh in sod., 2006). Po treh mesecih sledi preverjanje uspešnosti serumizacije z ELISA (Dee, 2009; Štukelj in Valenčak, 2012). Obstaja pa potencialna nevarnost prenosa drugih patogenih mikrobov hkrati s cepljenjem farmskega seva virusa. Bruner (2007) poroča, da je po inokulaciji farmskega seva virusa brejim svinjam prišlo do številnih motenj v reprodukciji. Isti avtor poroča o reprodukcijskih izgubah ob drugi inokulaciji istega seva virusa. Medtem ko Batista in sod. (2002) poročajo, da ni prišlo do razvoja kliničnih znakov bolezni.

Serumizacija se lahko uporablja pri:

- aklimatizaciji mladic in merjascev (Batista in sod., 2002; Hill in sod., 2004),
- eliminaciji PRRS (Pittman, 2007; Ruen in sod., 2007).

Opriessnig in sod. (2007) so ugotovili, da je serumizacija učinkovita in poceni metoda eliminacije in izkoreninjenja PRRS. Uspeh metode je pogojen tudi z upoštevanjem biovarnostnih ukrefov v reji (Torremorell in Christianson, 2002).

2.8.3.2 Delna depopulacija

Delna depopulacija je dodaten ukrep pri drugih metodah za eliminacijo PRRS na farmi (Dee in sod., 1997; Dee, 2003). Uporabimo jo po predhodni stabilizaciji plemenske črede (Torremorell in Christianson, 2002). Tekači so na okuženi farmi najbolj utrjivejša kategorija prašičev, saj v obdobju po odstavitevi izgubijo kolostralna protitelesa v starosti 3 do 5 tednov, kar ima za posledico okužbo, če je v reji virus. Pri delni depopulaciji odstranimo tekače s farme in s tem prekinemo širjenje virusa v čredi in onemogočimo prenos virusa na druge kategorije prašičev (Dee in sod., 1997; Dee in sod., 2003). Dee in sodelavci (1997) so 24 mesecev ugotavljali učinkovitost delne depopulacije na 34 farmah, kjer so ali po 4 ali po 6 mesecih ponovno vhlevili kategorijo tekačev. Ugotovili so, da je bila delna depopulacija učinkovita na 20 farmah, na 14 pa so še vedno dokazali virus, ker lastniki niso spoštovali zapore reje. Na vseh farmah pa so se po delni depopulaciji izboljšali proizvodni rezultati.

Delna depopulacija je učinkovita metoda eliminacije PRRS (Dee in sod., 1993). Metoda je učinkovita zlasti pri načinu reje, kjer so vse proizvodne faze na isti lokaciji (Torremorell in Christianson, 2002).

2.8.3.3 Metoda zgodnje odstaviteve

Metodo zgodnje odstaviteve od pozitivnih svinj uporabljam za proizvodnjo negativnih pujskov (Zimmerman in sod., 2012). Tudi ta metoda je navadno dopolnilna metoda ob drugih metodah za eliminacijo PRRS. Za učinkovitost metode je nujen sistem reje »all in/all out« (Donadeu in sod., 1999; Gramer in sod., 1999). Sesne pujske odstavimo in premestimo na ločeno lokacijo pri starosti 5 do 7 dni, ko so še kolostralno zaščiteni. Če tega ne storimo, pujski lahko zbolijo, ko nimajo več kolostralnih protiteles. Donadeu in sodelavci (1999) poročajo, da so pri 15 % zgodnje odstavljenih pujskov dokazali virus PRRS. Torremorell in sodelavci (2002) navajajo, da je treba pred preselitvijo vse pujske testirati tako serološko z ELISA kot tudi z metodo RT-PCR.

2.8.4 Ukrepanje ob pojavu PRRS v svetu

Enotnih programov eliminacije in izkoreninjenja PRRS ni niti v Evropi niti v ZDA. Programi, ki se izvajajo, so bodisi lokalni bodisi regionalni. Edina država, ki ji je uspelo izkoreniniti PRRS, je Čile (Torremorell in sod., 2008). V ZDA so s programom izkoreninjenja najprej začeli

leta 2002 v vzhodnem delu Minnesota, nato ji je leta 2004 sledil Stevens County, ki je zahodni del Minnesota. Približno 90 % rejcev se je vključilo v program in prevalenca bolezni se je zmanjšala za 50 %. Program se zaradi uspeha hitro širi še na ostale regije, med drugimi se je priključila tudi severna Minnesota. Tako zdaj poteka v ZDA približno 20 regionalnih programov s ciljem eliminacije in eradicacije PRRS. Prav tako potekajo številni programi v Kanadi v Ontariu in Quebecu. Za začetek izvajanja regionalnih programov so ustanovili odbor, ki so ga sestavljeni predstavniki rejcev prašičev, predstavniki mesno-predelovalne industrije in veterinarji. Vse delo opravijo na prostovoljni osnovi in vse stroške krijejo rejci sami, vključujejo pa se tudi v različne projekte, kot je na primer PRRS CAP. Kljub temu ni do danes še nobena država v ZDA prosta PRRS (Morrison, 2011b; Morrison, 2012). V Evropi potekajo programi na regionalnem nivoju na Danskem, Nizozemskem in v Franciji, vendar med seboj niso povezani. Vse programe izvajajo najprej v čredi, kasneje pa tudi na širšem območju. Tudi tu opravijo se prostovoljno, saj rejce motivira boljši finančni učinek, saj že sama kontrola bolezni izboljša proizvodne rezultate, zmanjša se uporaba antibiotikov in vakcin in v nekaterih državah ima meso prašičev, prostih PRRS, višjo ceno. Pri vseh programih je nujna udeležba veterinarjev, ki skrbijo za izobraževanje rejcev, za širjenje informacij in nadzorujejo izvajanje programa (Elvstroem, 2012; Mieli, 2012; Duinhof in Dam, 2012).

2.8.5 PRRS v Sloveniji

Pred vstopom v EU (do leta 2004) v Sloveniji niso dokazali protiteles proti virusu PRRS (Valenčak, 2004). V letu 2005 je javna veterinarska služba prenehala izvajati monitoring na PRRS, ki je obsegal pregled določenega števila plemenskih svinj in vseh plemenskih merjascev glede na prisotnost protiteles proti virusu PRRS z ELISA, in je trajal od leta 1995 do 2004 v okviru Odredbe o izvajanju sistematičnega spremljanja stanja kužnih bolezni in cepljenj. Ekonomski izgube zaradi pojava PRRS pri prašičih so evidentirali tudi rejci v Sloveniji (Štukelj in Valenčak, 2008; Štukelj in Valenčak, 2010). V letu 2010 je Nacionalni veterinarni inštitut (NVI) Veterinarske fakultete po naročilu Veterinarske uprave Republike Slovenije (VURS) opravil študijo glede pojavnosti PRRS v Sloveniji. V okviru študije smo pregledali vse reje, ki imajo 30 in več plemenskih prašičev in ugotovili, da je bila serološka prevalenca bolezni 44,8 %, v 45,2 % rej smo dokazali tudi virus PRRS. Primerjava nukleotinov zaporedij 21 sevov virusa PRRS iz te študije je pokazala zelo veliko genetsko različnost. Na podlagi analize zaporedij s programom DNASTAR smo lahko razdelili vzorce v pet genetskih skupin virusov PRRS. V

prvo skupino (tip EU 1a), ki je na primerjanem odseku nukleotidov še najbolj podobna referenčnemu virusu Lelystad, s 94,6 do 96,1-odstotno identičnostjo nukleotidnega zaporedja. V drugo genetsko skupino (tip EU 1b) je bil uvrščen virus s 93,4-odstotno identičnostjo s sevom Lelystad. V tretjo genetsko skupino (tip EU 1c) je bil uvrščen virus s 93,8-odstotno identičnostjo s sevom Lelystad. V četrto genetsko skupino (tip EU 1d) sta bila uvrščena virusa z 91,9 do 92,2-odstotno identičnostjo v zaporedju nukleotidov z referenčnim sevom Lelystad. V peto skupino (tip EU 1e), ki je po številu uvrščenih virusov tudi največja (70 % rej), je bilo uvrščenih 14 virusov. Ta skupina ugotovljenih virusov PRRS se na nukleotidnem nivoju tudi najbolj razlikuje od seva Lelystad s komaj 89,1 do 89,9-odstotno identičnostjo. Z referenčnim sevom, ki spada v ameriški tip virusa PRRS VR-2332 (genotip 2), so imeli ugotovljeni virusi iz te študije (EU 1a, EU 1b, EU 1c, EU 1d in EU 1e) le 63,6 do 67,1-odstotno identičnost na nukleotidnem nivoju. (Toplak in sod., 2010).

Leta 2011 smo v okviru letne Odredbe o izvajanju sistematičnega spremljanja stanja kužnih bolezni in cepljenj preiskali serume vseh plemenskih merjascev z ELISA in ugotovili približno 40-odstotno prevalenco bolezni. V Sloveniji se v pozitivnih rejah srečujemo v glavnem z virusi PRRS iz genotipa 1, ki pa so genetsko uvrščeni v 14 različnih podtipov, vsi pa sodijo v skupino 1 (Toplak in sod., 2010; Toplak in sod., 2012a). Znotraj skupine 1 pa so razvrščeni v 12 genetskih skupin in sicer 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h, 1i, 1j, 1k, 1m s 85,7 do 93,8-odstotno identičnostjo zaporedja nukleotidov med skupinami. V štirih vzorcih smo potrdili tudi genotip 2 (Toplak in sod., 2012b).

2.8.6 Zakonodaja o PRRS v Evropi in v Sloveniji

PRRS je uvrščen na listo OIE bolezni prašičev, kar pomeni, da morajo države ob potrditvi bolezni (lahko samo ob potrditvi protiteles) bolezen prijaviti (World Health Organisation for Animal Health, 2012). Za ukrepanje zoper PRRS ni evropske zakonodaje.

PRRS je v Pravilniku o boleznih živali naveden v prilogi 1, v kateri so naštete bolezni v skladu s kodeksom o zdravju živali OIE pri posamezni vrsti živali. Priloga 1 pomeni, da bolezen prijavljamo (Pravilnik o boleznih živali, 2007).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

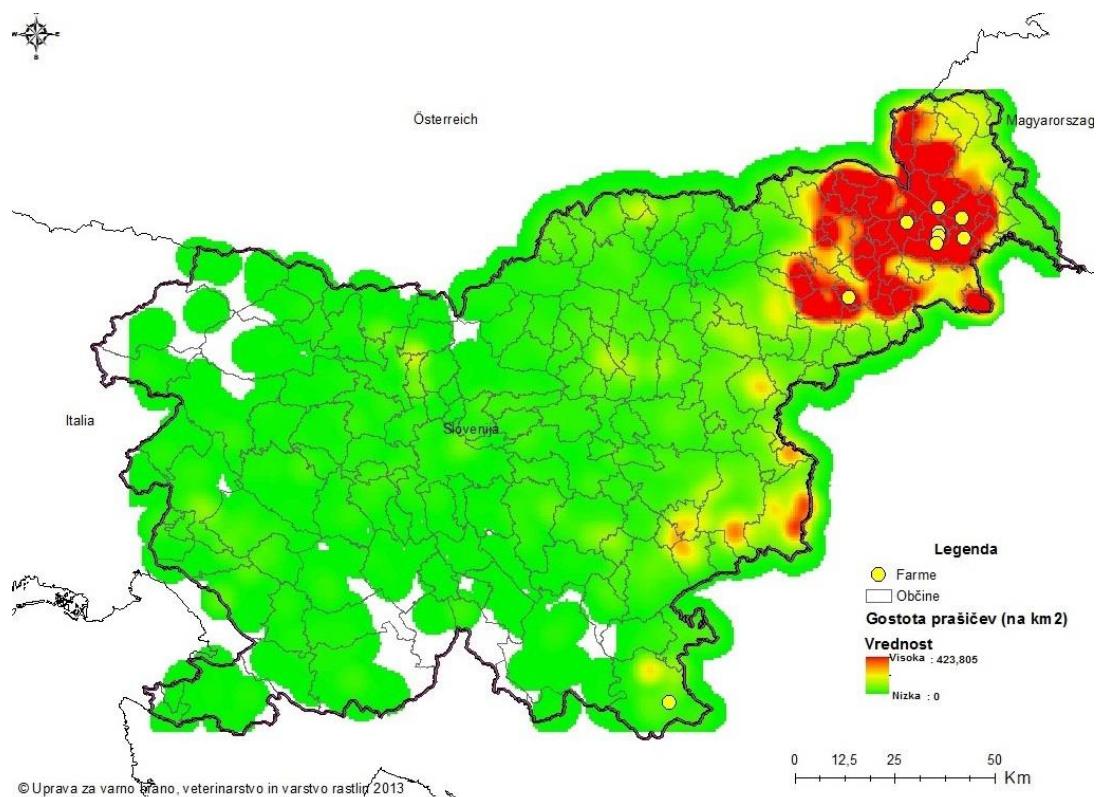
3.1.1 Farme

Raziskavo smo opravili na 9 farmah (slika 6, slika 7). Vse farme, ki smo jih vključili v raziskavo, imajo na eni lokaciji združene vse proizvodne faze in vse kategorije prašičev: plemenske svinje, plemenske merjasce, sesne pujske, tekače in pitance. Farme 1, 2, 3, 7, 8 in 9 so imele le en objekt z več sobami za vzrejo prašičev. Farma 4 je imela na dvorišču štiri ločene objekte, v enem je bila porodnišnica, v drugem so bili skupaj nastanjeni tekači in breje plemenske svinje, v tretjem objektu pa pitanci, v četrtem objektu je bilo nastanjenih še nekaj plemenskih prašičev. Farma 5 je imela tri objekte, v prvem objektu sta bili v ločenih prostorih porodnišnica in čakališče, v drugem pitališče ter v tretjem vzrejališče. Farma 6 je imela dva objekta, v enem objektu so bili v ločenih prostorih porodnišnica, čakališče in vzreja, v drugem objektu pa je bilo pitališče. Na vseh farmah pujske odstavlja pri 28 dneh, v pitanje pa gredo v starosti 11 do 12 tednov, prašiče redijo do teže okoli 115 kg.

Farma 1 je imela 12 plemenskih svinj in je bila brez merjasca, farma 2 je imela 7 plemenskih svinj in je bila prav tako brez merjasca, farma 3 pa je imela 14 plemenskih svinj in enega merjasca. Na farmah 1, 2 in 3 smo opravili naravno prekužitev.

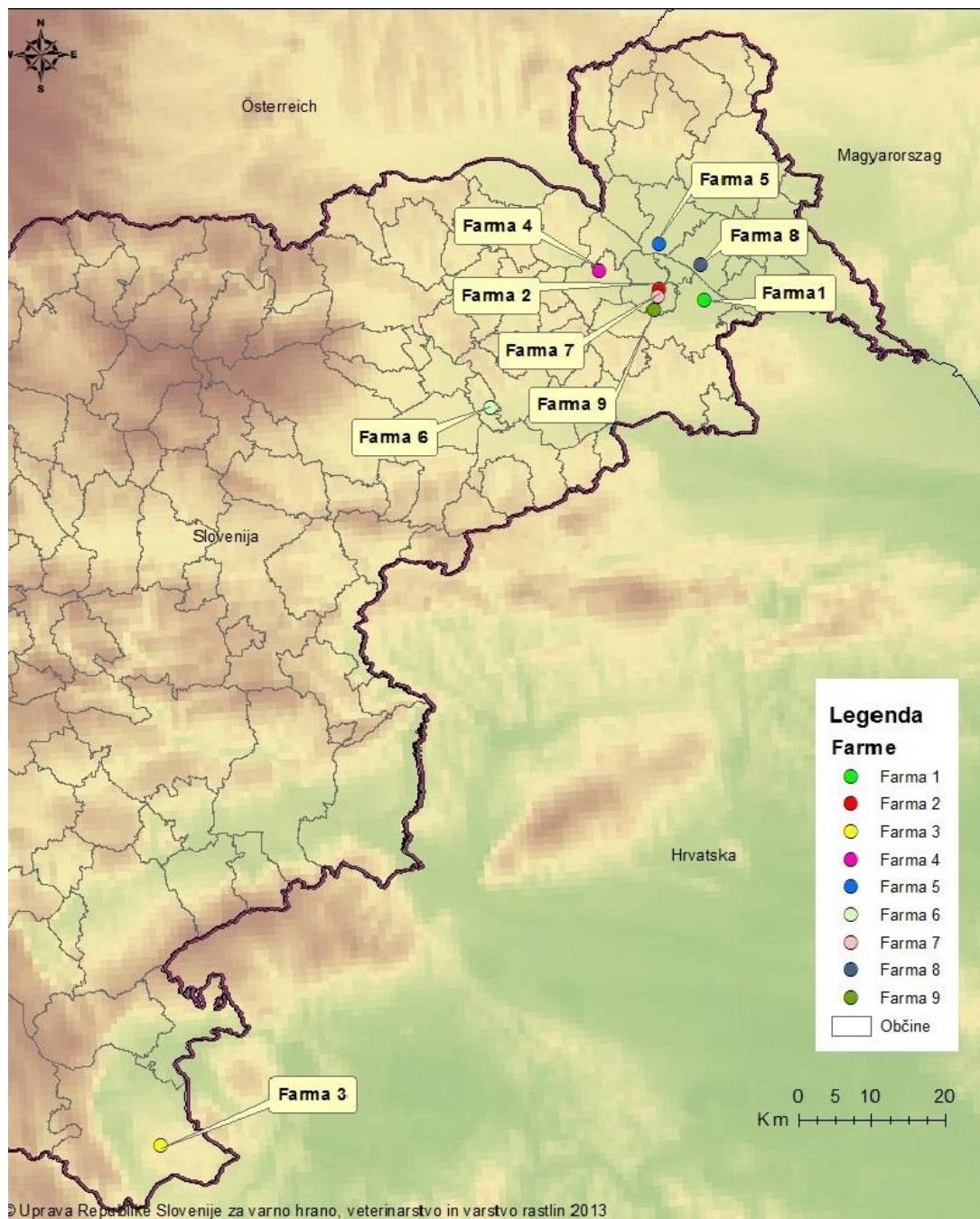
Farma 4 je imela 72 plemenskih svinj in 2 merjasca, farma 5 je imela ob pričetku študije 130 plemenskih svinj in 2 merjasca, ob koncu študije pa le še 95 plemenskih svinj in 2 merjasca, farma 6 je imela 61 plemenskih svinj in enega merjasca, na koncu študije pa le še 47 plemenskih svinj in enega merjasca. Na farmah 4, 5 in 6 smo izvedli serumizacijo.

Farma 7 je imela ob pričetku raziskave 20 plemenskih svinj in je bila brez merjasca, farma 8 je imela 15 plemenskih svinj in je bila brez merjasca, farma 9 pa je imela 28 plemenskih svinj in 2 merjasca. Na farmah 7, 8 in 9 smo izvedli vakcinacijo.



Slika 6: Lokacija farm v Sloveniji.

Figure 6: Farm location in Slovenia.



Slika 7: Lokacija farm vključenih v študijo.

Figure 7: Location of the farms from the study.

3.1.2 Serumi

Individualne serume prašičev smo zbirali od marca 2009 do aprila 2013 (tabela 1).

Tabela 1: Skupno število preiskanih serumov z ELISA in skupno število preiskanih serumov z metodo RT-PCR .

Table 1: Number of tested sera in ELISA and number of tested sera by RT-PCR.

Farma	Skupno št. odvzetih serumov	Št. preiskanih serumov z ELISA	Št. preiskanih serumov z metodo RT-PCR
Farma 1	74	74	12
Farma 2	36	36	6
Farma 3	72	72	40
Farma 4	302	302	136
Farma 5	738	738	470
Farma 6	353	353	323
Farma 7	94	94	34
Farma 8	85	85	20
Farma 9	110	110	65
Skupaj	1864	1864	1106

3.1.3 Inokulum za serumizacijo

Inokulum za serumizacijo smo pripravili iz individualnih serumov tekačev in pitancev (kri 5 tekačev v starosti 6 tednov, 5 tekačev v starosti 8 tednov, 5 tekačev v starosti 10 tednov in 5 pitancev v starosti 12 tednov), pri katerih smo z metodo RT-PCR ugotovili nukleinsko kislino virusa PRRS. Pozitivne serume s posamezne farme smo združili v en vzorec (pool) in dobro premešali. Enemu delu seruma smo dodali štiri dele gojišča RPMI-1640 (Gibco, Nemčija) in 1 % antibiotika in antimikotika (Invitrogen, Nemčija). Inokulum smo do uporabe hranili v hladilniku pri temperaturi 4 do 8 °C, največ 1 dan.

3.1.4 Vakcina

Uporabili smo vakcino Porcillis® PRRS proizvajalca Intervet. Vakcina vsebuje oslabljeni virus Lelystad, ki spada v genotip 1 virusa PRRS. Vsaka doza v količini 2 ml pri intramuskularni aplikaciji (i/m) ali pa 0,2 ml pri intradermalni aplikaciji (i/d) vsebuje najmanj 10^4 TCID₅₀ virusa PRRS. Aktivna komponenta v cepivu je raztopljena v Diluvac Forte.

3.2 METODE

3.2.1 Odvzem vzorcev

Vzorce krvi tekačev, pitancev in plemenskih prašičev smo jemali iz žile vena cava cranialis.

3.2.2 Vzorčenje

Prvo vzorčenje na farmi smo izvedli, da bi ugotovili protitelesa proti virusu PRRS na farmi.

Uspešnost eliminacije PRRS smo preverjali približno na tri mesece z odvzemom vzorcev krvi vsem plemenskim prašičem, ne glede na to, ali smo izbrali naravno prekužitev, serumizacijo ali vakcinacijo.

Za kontrolo uspešnosti eliminacije PRRS smo dodatno jemali vzorce pri tekačih in mlajših pitancih od 6 do 14 tednov in pri pitancih v starosti približno 6 mesecev (tik pred klanjem).

3.2.3 Priprava serumov

Krvne vzorce smo centrifugirali 10 minut pri 2600g, nato smo serume prelili v več manjših epruvet po 1 ml in jih do izvedbe ELISA hranili v hladilniku pri temperaturi med 4 °C do 8 °C.

V primeru, da smo na vzorcih izvedli tudi molekularna testiranja, smo serume prelili s sterilnimi nastavki s filtrom v sterilne vijalke po 1,2 ml in jih do preiskave hranili na -20 °C.

3.2.4 Zapora reje

Na vseh farmah smo uvedli dvojno zaporo, ki temelji na prenehanju vnašanja novih prašičev na farmo in na dodajanju lastnih mladic v plemensko čredo in sicer za obdobje najmanj 6 mesecev. Po preteku 6 mesecev smo se za vsako individualno rejo posebej, na podlagi rezultatov preiskave na protitelesa odločili, ali trajanje zapore reje za določen čas podaljšamo ali pa zaporo opustimo.

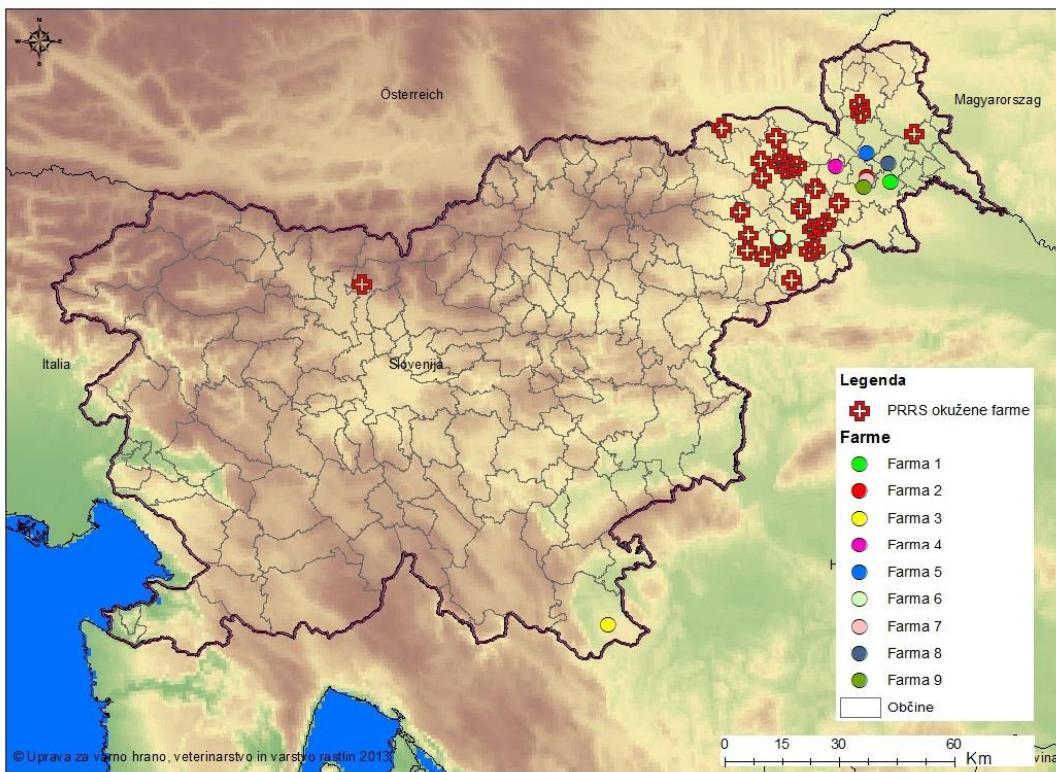
3.2.5 Biovarnostni ukrepi

Ob začetku ukrepanja smo za vsako farmo določili oddaljenost od najbližje druge farme. Pri oceni smo upoštevali najmanjšo oddaljenost 300 m, kot jo priporočajo Pitkin in sodelavci (2011). Prav tako smo pri oceni upoštevali status najbližje farme glede PRRS. Na vseh farmah

smo ob začetku študije uvedli zunanje in notranje biovarnostne ukrepe. Rejci so se obvezali, da bodo izvajali sledeče ukrepe: uporaba negativnega semena, ločeni prostori za različne kategorije prašičev, preoblačenje in preobuvanje delavcev pri prehodih med kategorijami prašičev, sistem reje »all in/all out«, dezinfekcijske bariere pred vhodom v prostor, zamenjava dezinfekcijske raztopine na vsakih 24 ur in ločen prostor za bolne živali. Na farmah so redno izvajali deratizacijo in dezinsekcijo. Vsi ti ukrepi so v skladu z biovarnostnim protokolom za PRRS, ki so ga pripravili Pitkin in sod. (2011) in tudi z McREBELL™ (**M**anagement **C**hanges to **R**educe **E**xposure to **B**acteria to **E**liminate **L**osses) PRRS programom (McCaw, 1995; McCaw, 2000).

Ob naših obiskih na farmi smo nadzorovali izvajanje naslednjih biovarnostnih ukrepov:

- dvojna zapora,
- uporaba preverjeno negativnega semena na farmah, kjer niso imeli lastnega merjasca,
- kategorije prašičev, ločene po prostorih,
- preoblačenje in preobuvanje delavcev,
- sistem reje »all in/all out«,
- razkuževalne bariere pred vhodom v posamezni prostor in dnevna menjava dezinfekcijske raztopine,
- poseben boks za bolne prašiče v ločenem prostoru,
- deratizacija in dezinsekcija.



Slika 8: Farme, na katerih smo izvajali eliminacijo PRRS in glede na virus pozitivne farme, ki smo jih ugotovili v študiji o pojavljanju PRRS v Sloveniji v letu 2010.

Figure 8: Farms from the study where the elimination of PRRS was implemented and the PRRS positive farms in Slovenia from the study performed in the year 2010.

V letu 2010 je bila opravljena študija o pojavnosti PRRS v Sloveniji (Toplak in sod., 2010). Slika prikazuje glede na PRRS pozitivne farme iz študije, opravljene leta 2010 ter 9 farm, vključenih v študijo eliminacije PRRS (slika 8).

3.2.6 Naravna prekužitev

Naravno prekužitev smo izvedli na farmah 1, 2 in 3. V šestih mesecih naj bi vsi plemenski prašiči pridobili specifična protitelesa proti farmskem podtipu virusa PRRS.

3.2.7 Serumizacija

Serumizacijo smo izvedli na farmah 4, 5 in 6. S posebej pripravljenim inokulumom smo na isti dan cepili vse prašiče v plemenski čredi. Vsakemu plemenskemu prašiču smo dali isti dan 2 ml inokuluma intramuskularno.

3.2.8 Vakcinacija

Na farmi 7 smo opravili vakcinacijo dvakrat v časovnem razmiku treh mesecev, na farmah 8 in 9 pa enkrat. Za ta namen smo uporabili komercialno vakcino Porcillis® PRRS. Vsakemu plemenskemu prašiču smo dali isti dan 2 ml pripravka intramuskularno.

3.2.9 Testi

3.2.9.1 Encimsko imunski test (ELISA)

Pri vseh vzorcih seruma smo opravili encimsko imunski test (ELISA). To je indirektna metoda za dokazovanje protiteles proti genotipu 1 in genotipu 2 virusa PRRS. Uporabili smo komercialni ELISA proizvajalca IDEXX: IDEXX PRRS X3.

Pri izvedbi testa smo upoštevali navodila proizvajalca.

Mikroplošče smo spirali z avtomatskim spiralnikom Antos AW1 (Velika Britanija).

Vrednost optične gostote smo izmerili pri 650 nm s čitalcem Anthos HtII (Velika Britanija).

Opis postopka:

Komponente testa ELISA so bile shranjene v hladilniku na +2 do +8 °C, tik pred uporabo smo jih segreli na sobno temperaturo (18 do 25 °C).

Za nanos vzorcev smo uporabili multikanalno pipeto.

Najprej smo razredčili raztopino za spiranje v razmerju 1:10 (en del raztopine za spiranje in 9 delov destilirane vode).

Preiskovane vzorce ter pozitivni in negativni nacionalni serum smo razredčili v razmerju 1:40 z razredčevalcem za vzorce. Kontrolnih serumov nismo redčili.

Vzorce smo redčili na U mikroplošči za redčenje in jih pred nanosom na mikroploščo premešali. Na ploščo smo nanesli po 195 µl razredčevalca in 5 µl preiskovanega seruma. Enako smo pripravili redčenje za pozitivni in negativni nacionalni serum. Za vsak serum smo menjali nastavke za pipeto. Vzorce smo pred nanosom na mikroploščo premešali.

Na eni mikroplošči smo lahko preiskali 88 vzorcev serumov.

Protokol:

1. Na mikroploščo PRRS X3 smo nanesli 100 µl nerazredčene negativne kontrole v jamici A1, B1, 100 µl nerazredčene pozitivne kontrole v jamici C1, D1 in 100 µl razredčenega negativnega nacionalnega seruma v jamici E 1, F 1.
2. nato smo nanesli 100 µl razredčenega preiskovanega seruma v pripadajoče jamice.
3. Redčenja smo inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi od 20 °C do 25 °C.
4. Mikroploščo smo sprali s pufom 3 do 5-krat.
5. V vsako jamico smo naneseli 100 µl konjugata.
6. Mikroploščo smo inkubirali 30 minut na sobni temperaturi.
7. Ponovili smo korak 4.
8. Nanesli smo 100 µl substrata TMB v vsako jamico.
9. Mikroploščo smo inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi.
10. Nanesli smo 100 µl »stop solution« v vsako jamico.
11. Izmerili smo vrednost optične gostote (OD) s čitalcem pri valovni dolžini 650 nm.

Interpretacija rezultatov:

Rezultati ELISA so veljavni, če:

- je povprečna vrednost OD pozitivne kontrole (PC_x) minus negativna kontrola (NC) večja ali enaka 0.150.
- je povprečna vrednost OD negativne kontrole (NC_x) manjša ali enaka 0.150.

Prisotnost ali odsotnost protiteles proti PRRS smo izračunali iz razmerja med vzorcem in pozitivno kontrolo (S/P) na sledeči način:

$$\frac{S}{P} = \frac{\text{vzorec } A(650) - NC\bar{X}}{PC\bar{X} - NC\bar{X}}$$

Če je razmerje S/P manjše od 0,4 je vzorec ovrednoten kot negativen, kar pomeni, da vzorec ne vsebuje protiteles proti virusu PRRS.

Če je S/P razmerje večje ali enako 0,4 je vzorec ovrednoten kot pozitiven, kar pomeni, da vzorec vsebuje protitelesa proti virusu PRRS.

Za izračun smo uporabili program proizvajalca IDEXX (XCHEK™ 3,2 IDEXX Laboratory Comprehensive Information Management Software).

Vrednosti S/P smo razdelili v štiri skupine:

- negativni vzorci - S/P vrednost manj kot 0,4,
- nizko pozitivni vzorci - S/P vrednost med 0,4 in 1,
- pozitivni vzorci - S/P vrednost med 1 in 2,
- visoko pozitivni vzorci - S/P vrednost več kot 2.

Proizvajalec ELISA sicer predvideva interpretacijo rezultatov samo na pozitivne (S/P vrednost nad 0,4) in negativne (S/P vrednost pod 0,4), mi pa smo v študiji uvedli dodatno razdelitev pozitivnih vzorcev, da bi natančneje spremljali spremembe v vrednosti S/P pri posameznih prašičih.

3.2.9.2 Dokaz virusa

3.2.9.2.1 Molekularne metode

3.2.9.2.1.1 Izolacija RNA

Za izolacijo RNA iz vzorcev serumov smo uporabili komercialni komplet reagentov QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen, Nemčija). Princip izolacije RNA temelji na selektivni vezavi RNA na membrano iz silikatnega gela, ki je vezan v dno QIAamp kolon.

Postopek izolacije smo izvajali po navodilih proizvajalca komercialnega kompleta:

1. Pripravili smo ustrezno količino mešanice pufra AVL in "carrier" RNA in po 560 µl mešanice prenesli v 1.5 ml epruvete (Eppendorf, Nemčija).
2. Dodali smo 140 µl vzorca in vsebino epruvete dobro premešali na vibracijskem mešalniku ter inkubirali 10 minut na sobni temperaturi. S postopkom kratkega centrifugiranja smo odstranili vsebino s pokrova epruvete.
3. Vsebini epruvete smo dodali 560 µl 96 - 99 % etanola (Merck, ZDA). Vsebino smo nato premešali in kratko centrifugirali.
4. 630 µl mešanice smo nanesli na QIAamp kolono in centrifugirali 1 minuto pri 6.000 x g. Filtrat v zbirni epruveti smo zavrgli in postopek ponovili.
5. Na QIAamp kolono smo nanesli 500 µl pufra AW1 in centrifugirali 1 minuto pri 6.000 x g. Filtrat smo zavrgli, zamenjali zbirno epruveto in nanesli 500 µl pufra AW2. Sledilo je centrifugiranje 3 minute pri 20.000 x g.
6. Kolono QIAamp smo prenesli v 1,5 ml epruveto (Eppendorf, Nemčija) in na membrano kolone nanesli 60 µl pufra AVE. Sledila je inkubacija 1 minuto in nato centrifugiranje 1 minuto pri 6.000 x g. Kolono smo zavrgli, izolirano RNA pa shranili pri < - 60 °C.

3.2.9.2.1.2 Metoda reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR)

Metodo RT-PCR smo izvajali v eni stopnji. Uporabljali smo reagente komercialnega kompleta One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Nemčija), ki vsebuje encima reverzna transkriptaza in polimeraza in tako združuje procesa reverzne transkripcije in pomnoževanja.

Z metodo RT-PCR smo pomnoževali okrog 290 bp dolg odsek virusnega genoma PRRS, ki kodira protein nukleokapside v regiji v ORF 7. Par začetnih oligonukleotidov PRRS P1 in

PRRS P2 (Donadeu in sod., 1999) je uporaben za pomnoževanje sevov genotipa 1 in genotipa 2 (tabela 2). Končni volumen reakcijske mešanice je bil 25 µl.

Tabela 2: Začetna oligonukleotida za pomnoževanje odseka v regiji gena za nukleokapsido (Donadeu in sod., 1999).

Table 2: Oligonucleotides for amplification of part of genome of nucleocapsid (Donadeu et al., 1999).

Ime	Nukleotidno zaporedje v smeri 5' – 3'	Dolžina v nt	Pozicija v genomu (glede na Lelystad virus)
PRRS P1	CCA GCC AGT CAA TCA RCT GTG	21	14657 - 14677
PRRS P2	GCG AAT CAG GCG CAC WGT ATG	21	14929 - 14948

Reakcijska mešanica je vsebovala:

- 15 µl z DEPC obdelane vode,
- 5 µl 5 x pufra PCR,
- 1 µl 10 mM mešanice dNTP-jev,
- 0,5 µl 20 pmol/ µl začetnega oligonukleotida PRRS P1,
- 0,5 µl 20 pmol/ µl začetnega oligonukleotida PRRS P2,
- 1 µl mešanice encimov RT-PCR.

Reakcijski mešanici smo dodali 2 µl izolirane RNA.

Pomnoževanje je potekalo v avtomatskem termopomnoževalniku (Biometra, Nemčija). Program pomnoževanja je potekal:

1. 1 cikel 30 minut 50 °C,
2. 1 cikel 15 minut 94 °C,
3. 40 ciklov (30 sekund 94 °C, 30 sekund 60 °C, 1 minuta 72 °C),
4. 1 cikel 10 minut 72 °C,
5. ohlajanje reakcije na 4 °C.

3.2.9.2.1.3 Analiza produktov RT-PCR z elektroforezo v agaroznem gelu

Za analizo produktov RT-PCR smo pripravili 1,8-odstotni agarozni gel tako, da smo 100 ml 1 x pufra TAE (Tris-acetat EDTA) dodali 1,8 g agaroze v prahu (Merck, ZDA). S segrevanjem v mikrovalovni pečici smo agarozo raztopili in jo ohlajeno na približno 60 °C zlili v nosilec z nameščenim glavničkom. Po 30 minutah se je gel strdil. Z nosilcem smo ga vstavili v kadičko z 1 x pufrom TAE in odstranili glavniček. V posamezno vdolbinico smo nanesli 12 µl produkta RT-PCR, pomešanega s 3 µl nosilnega barvila (0,35 % brom-fenol modrilo). V vsako izvajanje elektroforeze smo vključili molekularni označevalce DNA (GenRuler 100 bp DNA ladder, Fermentas, Nemčija). Elektroforeza je potekala pri napetosti 100 volтов 60 minut. Po končani elektroforezi smo produkte RT-PCR obarvali z etidijevim bromidom, tako da smo vstavili gel v kadičko z raztopino etidijevega bromida (0,5 µg/ml) za 15 minut. Etidijev bromid se je v tem času vezal v dvojne vijačnice DNA. Obarvani gel smo sprali z vodo in ga prenesli v UV-transiluminator E-BOX VX2 (Vilber Lourmat, Nemčija) ter z računalniškim programom in kamero dokumentirali rezultate.

V agaroznem gelu so se pomnoženi odseki ločili po velikosti zaradi različne hitrosti potovanja. Velikost produktov smo določili s primerjavo velikosti produktov molekularnega označevalca DNA.

Rezultate smo ovrednotili glede na pričakovano velikost produkta RT-PCR. Če smo dobili produkt pričakovane velikosti okrog 300 bp, smo rezultat ocenili kot pozitiven, če pa produkta nismo dobili ali je bil nespecifične velikosti, smo rezultat ocenili kot negativen.

3.2.9.2.1.4 Določanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje)

Določanje nukleotidnega zaporedja smo izvedli direktno iz produktov RT-PCR pozitivnih vzorcev. Z uporabo začetnih oligonukleotidov PRRS P1 in PRRS P2 smo vzorce sekvencirali v obeh smereh. Določanje nukleotidnega zaporedja so izvedli v podjetju Macrogen (Amsterdam, Nizozemska).

3.2.9.2.1.5 Obdelava nukleotidnih zaporedij in primerjava za določitev razlik med virusi PRRS

Za obdelavo rezultatov sekvenciranja smo uporabili paket programov Lasergen (DNASTAR, ZDA, verzija 5, 05), ki nam omogočajo natančno analizo posameznega nukleotidnega zaporedja

ali več zaporedij hkrati. V omenjenem programu smo poravnali obe nukleotidni zaporedji istega vzorca, ki smo ju dobili pri sekvenciranju z dvema začetnima nukleotidoma (PRRS P1 in PRRS P2).

Za urejanje posameznega nukleotidnega zaporedja smo uporabljali program BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), s katerim smo primerjali nukleotidno zaporedje, ugotovljeno pri naših vzorcih, z nukleotidnimi zaporedji, ki so dostopna v genski banki (GenBank). S programom BLAST smo preverili morebitno insercijo, delecijo ali zamenjavo posameznih nukleotidov ter ugotavliali odstotek homologije med našimi in primerjanimi zaporedji v genski banki podatkov. Urejeno zaporedje smo shranili v programu EditSeq pod zaporedno številko farme in imenom vzorca.

Program MegAlignTM (Lasergen, DNASTAR, ZDA) omogoča poravnavo dveh ali več izbranih zaporedij nukleotidov virusov PRRS. Program grafično prikaže filogenetsko drevo - sorodnost primerjanih nukleotidnih zaporedij in v tabeli prikaže odstotke podobnosti in različnosti med njimi. Za poravnavo zaporedij smo uporabili metodo Clustal W.

3.2.9.2.2 Izolacija virusa PRRS na pljučnih alveolarnih makrofagih

3.2.9.2.2.1 Priprava mikroplošče s pljučnimi alveolarnimi makrofagi

Izolacijo virusa PRRS iz vzorcev smo opravili na prašičjih pljučnih alveolarnih makrofagih. Pljučne alveolarne makrofage smo dobili od prašičev, prostih specifičnih bolezni (SPF) iz Technical University iz Danske (DTU). Ampule s pljučnimi alveolarnimi makrofagi smo do uporabe hranili v tekočem dušiku pri -196 °C.

Ampulo s pljučnimi alveolarnimi makrofagi (PAM) smo vzeli iz tekočega dušika in jih prestavili v vodno kopel na 37 °C, da so se celice PAM odtalile. Nato smo 4,5 ml PAM celic prenesli v 45 ml gojišča (Opti-MEM®), kateremu je bil dodan 10-odstotni fetalni bovini serum - FBS). Nato smo celice PAM z gojiščem centrifugirali na 800 x g 10 min. Odlili smo supernatant in resuspendirali pelet v 5 ml gojišča.

Število celic PAM smo prešteli v komori - hemocitometer po Neubauerju s pomočjo mikroskopa Eclipse TS 100, proizvajalca Nikon.

Komora za štetje celic je modificirano predmetno stekelce, ki ima vgravirani dve ploskvi z mrežo s štirimi polji po 16 kvadratkov, v katerih z mikroskopom štejemo celice.

1. Najprej smo na komoro položili pokrovno stekelce.
2. Iz 5 ml suspenzije celic PAM smo vzeli 100 µl in jih razredčili v 900 µl tripanskega modrila (1:10).
3. S pipeto smo nanesli mešanico suspenzije celic in tripanskega modrila skozi režo v obe polji na komori za štetje celic. Počakali smo 1 do 2 minuti, da so se celice usedle.
4. Celice PAM, ki so v enem vidnem polju s 16 kvadrati, prav tako v drugem, tretjem in četrtem vidnem polju s 16 kvadrati, smo prešteli in izračunali potrebno razredčitev 500.000 celic v 1 ml.
5. Za eno mikroploščo smo potrebovali 11 ml suspenzije celic PAM.
6. Na mikroploščo smo nanesli po 100 µl suspenzije celic PAM v vsako jamico in inkubirali 1 uro v termostatu na 37 °C s 5 % CO₂.

3.2.9.2.2.2 Izolacija virusa na celicah PAM

1. Na mikroploščo s celicami PAM smo v dve jamici nanesli po 50 µl posameznega serumskega vzorca in 50 µl pozitivne kontrole (Lelystad virus in Hesse virus, ki smo ju prejeli od prof. Stadejeka s Poljske) in negativne kontrole (negativni serum prašiča brez protiteles proti virusu PRRS in brez virusa PRRS).
2. S pipeto smo prenesli 50 µl suspenzije posamezne jamice v vsako naslednjo jamico po mikroplošči tako, da smo dobili trikratne razredčitve na mikroplošči (1:3 do 1:6561).
3. Vzorce smo inkubirali do 2 dni v termostatu na 37 °C s 5 % CO₂.
4. Dnevno smo spremljali, pod mikroskopom Axiovert 25, proizvajalec Zeiss, morebiten pojav citopatskega efekta.
5. Po prvi pasaži smo mikroploščo z inokuliranimi vzorci zamrznili na < -60 °C za 1 uro.
6. Medtem smo pripravili novo mikroploščo s celicami PAM.
7. Mikroploščo z vzorci smo odtopili in iz plošče z inokuliranimi vzorci prenesli po 50 µl v jamice iste pozicije nove mikroplošče in inkubirali 2 dni v termostatu na 37 °C s 5 % CO₂.
8. Dnevno smo spremljali z mikroskopom morebiten pojav citopatskega efekta.
9. Drugo pasažo smo izvedli enako, kot je opisano za prvo pasažo.
10. Rezultate smo ovrednotili glede na prisotnost citopatskega efekta s pomočjo svetlobnega mikroskopa Axiovert 25, proizvajalec Zeiss.

3.2.10 Statistična obdelava

S statističnim paketom SAS/STAT (The SAS System for Linux, Release 9.2, SAS Inst. Inc., Cary, NC) smo izvedli analizo podatkov. Opazovana lastnost je bila vrednost S/P. Pri tem smo uporabili metodo najmanjših kvadratov v proceduri GLM (Dunnett, 1955). Znotraj vsake farme smo primerjali razlike med zaporednimi odvzemi (model 1), pri čemer nam je kot kontrola na večini farm služil prvi odvzem, le pri farmah 5 in 7 smo kot kontrolo izbrali odvzem, ko smo izvedli drugo serumizacijo (farma 5) oz. vakcinacijo (farma 7). Za oceno značilnosti razlik med srednjimi vrednostmi S/P razmerja smo uporabili Dunnettov multipli test sredine.

Model 1: $y_{ij} = \mu + O_i + e_{ij}$

Uporabljene oznake v modelih so: y_{ij} - opazovana lastnost, μ - srednja vrednost populacije, O_i - zaporedni odvzem ($i=1$ do 3 oz. 6) ter e_{ij} - ostanek.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI S FARME 1

4.1.1 Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 1

Na farmi 1, kjer smo izvajali eliminacijo PRRS z naravno prekužitvijo, smo vzorčili osemkrat (tabela 3). S preiskavo plemenskih prašičev smo ugotovili protitelesa proti virusu PRRS pri 7 plemenskih svinjah, 5 plemenskih svinj je v ELISA reagiralo negativno. Štiri mesece po začetku ukrepanja je 6 plemenskih svinj reagiralo v ELISA negativno, 3 nizko pozitivno, 1 pozitivno in 1 visoko pozitivno. Pet mesecev po začetku ukrepanja smo pregledali 5 pitancev in ugotovili, da so vsi reagirali negativno na prisotnost protiteles. Sedem mesecev po začetku ukrepanja smo v plemenski čredi (12 plemenskih svinj) ugotovili, da je bila polovica vzorcev negativna glede na protitelesa, pri treh vzorcih smo ugotovili nizko pozitivne S/P vrednosti, pri dveh pozitivne in pri enem visoko pozitivno. Deset mesecev po začetku ukrepanja je 8 plemenskih svinj reagiralo negativno, 1 plemenska svinja nizko pozitivno, 1 plemenska svinja pa pozitivno. Sedemnajst mesecev po začetku ukrepanja smo pregledali 10 plemenskih svinj in 4 pitance. Vsi vzorci pitancev so bili negativni v ELISA. Sedem plemenskih svinj je reagiralo negativno, 2 nizko pozitivno in 1 pozitivno. Enaindvajset mesecev po začetku ukrepanja smo preiskali vzorce krvi 5 plemenskih svinj in 5 pitancev in ugotovili, da je 9 pregledanih vzorcev negativnih, ena plemenska svinja pa je reagirala nizko pozitivno v ELISA. Pri vzorčenju 32 mesecev po začetku ukrepanja smo ugotovili, da so vsi pregledani prašiči (12 plemenskih prašičev in 26 pitancev) negativni na prisotnost protiteles proti virusu PRRS.

Tabela 3: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 1.

Table 3: The ELISA results of detection of PRRS virus antibodies on Farm 1.

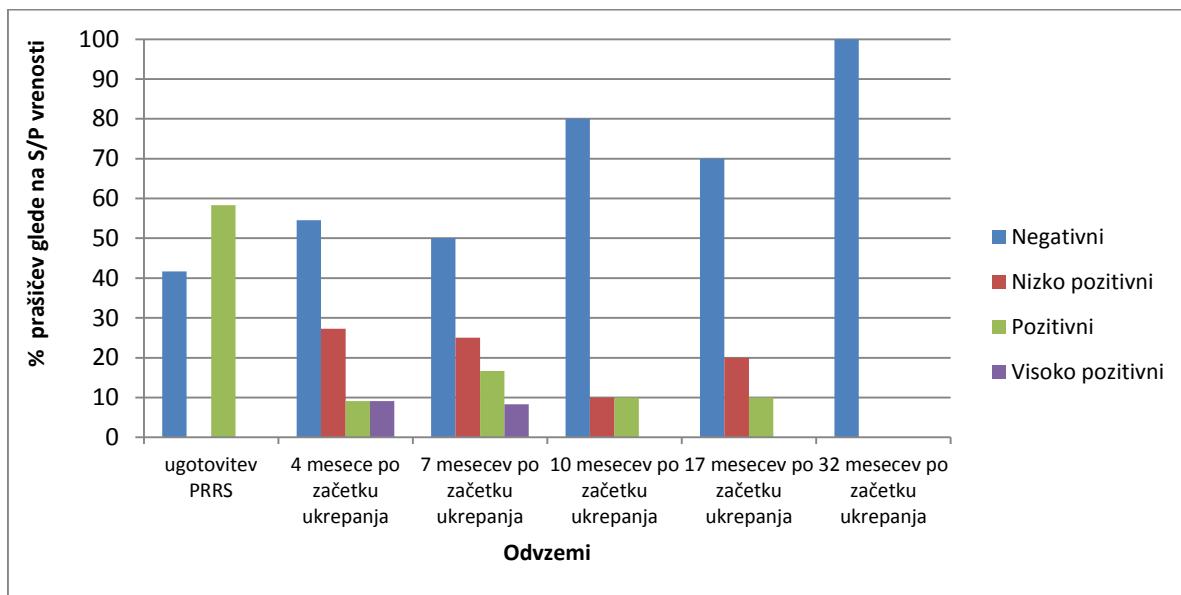
Vzorčenje	Skupno število testiranih prašičev		Število negativnih prašičev		Število nizko pozitivnih prašičev		Število pozitivnih prašičev		Število visoko pozitivnih prašičev	
	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči
Ugotovitev PRRS	12	/	5	/	0	/	7	/	0	/
4 mesece po začetku ukrepanja	11	/	6	/	3	/	1	/	1	/
5 mesecev po začetku ukrepanja	/	5	/	5	/	0	/	0	/	0
7 mesecev po začetku ukrepanja	12	/	6	/	3	/	2	/	1	/
10 mesecev po začetku ukrepanja	10	/	8	/	1	/	1	/	0	/
17 mesecev po začetku ukrepanja	10	4	7	4	2	0	1	0	0	0
21 mesecev po začetku ukrepanja	5	5	4	5	1	0	0	0	0	0
32 mesecev po začetku ukrepanja	12	26	12	26	0	0	0	0	0	0

Legenda: v stolpcu »prašiči« so zajete kategorije od tekačev do pitancev.

Negativni (vrednosti S/P pod 0,4), nizko pozitivni prašiči (vrednosti S/P med 0,4 in 1), pozitivni prašiči (vrednosti S/P med 1 in 2), visoko pozitivni prašiči (vrednosti S/P več kot 2).

Graf 1: Prikaz rezultatov ELISA za plemenske prašiče na farmi 1.

Graph 1: The ELISA results of the breeding pigs on Farm 1.



Pred začetkom ukrepanja smo na farmi 1 ugotovili 41,3 % negativnih plemenskih svinj in 58,7 % pozitivnih (graf 1). Štiri mesece po začetku ukrepanja smo ugotovili 54,5 %, negativnih svinj in 9,1 % (ena svinja) visoko pozitivnih plemenskih svinj. Sedem mesecev po začetku ukrepanja se je odstotek negativnih živali znižal na 50, ista plemenska svinja pa je reagirala visoko pozitivno kot pri prejšnjem vzorčenju. Deset mesecev po začetku ukrepanja smo ugotovili 80 % negativnih plemenskih svinj, visoko pozitivnih pa nismo več dokazali. Pri zadnjem vzorčenju 32 mesecev po začetku ukrepanja pri plemenskih prašičih nismo več dokazali protiteles proti virusu PRRS.

4.1.2 Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 1

4.1.2.1 Spreminjanje povprečnih vrednosti S/P v plemenski čredi v zaporednih odvzemih na farmi 1

Statistično značilna razlika je med prvim in petim odvzemom ter med prvim in šestim ter sedmim odvzemom (tabela 4).

V ELISA je povprečna S/P vrednost ob ugotovitvi PRRS znašala 0,907. Povprečne vrednosti S/P so se pri nadalnjih odvzemih zniževale na 0,704 (7 mesecev po ukrepanju), na 0,231 (17 mesecev po ukrepanju) in na 0,007 (32 mesecv po ukrepanju). Pri vzorčenju 32 mesecev po začetku ukrepanja smo ugotovili, da so vse vrednosti S/P pod 0,4 (vsi pregledani prašiči so negativni) (graf 2). Najvišjo vrednost S/P (2,875) smo zabeležili štiri mesece po ukrepanju.

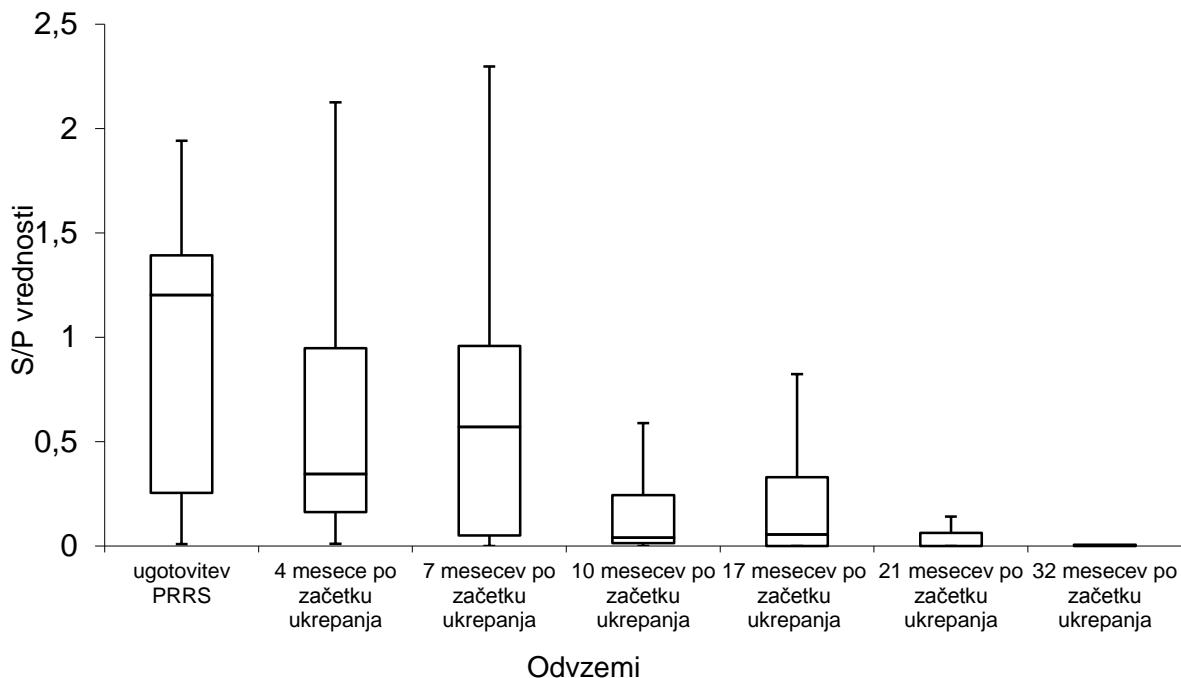
Tabela 4: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P pred začetkom ukrepanja) za farmo 1.

Table 4: Least square means for S/P value with standard errors and significance of differences between successive sampling (comparison with S/P value before taking a measure) for Farm 1.

Odvzem	povprečje S/P	Standardna napaka	P-vrednost
Ugotovitev PRRS	0,907	± 0,168	
4 mesece po začetku ukrepanja	0,690	± 0,176	0,8503
7 mesecev po začetku ukrepanja	0,704	± 0,168	0,8698
10 mesecev po začetku ukrepanja	0,191	± 0,220	0,0513
17 mesecev po začetku ukrepanja	0,231	± 0,156	0,0200
21 mesecev po začetku ukrepanja	0,034	± 0,176	0,0031
32 mesecev po začetku ukrepanja	0,007	± 0,153	0,0002

Graf 2: Prikaz vrednosti S/P med posameznimi odvzemi pri plemenskih prašičih na farmi 1.

Graph 2: S/P changing between each sampling in the breeding herd on Farm 1.



Stolpci prikazujejo mediano, minimalno in maksimalno vrednost, spodnjo in zgornjo četrtinino rezultatov ter srednjih 50 % vrednosti v posamezni skupini.

4.1.3 Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 1

4.1.3.1 Dokaz nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 1

Sedem mesecev po začetku ukrepanja smo odvzeli vzorce od vseh 12 plemenskih svinj. Z metodo RT-PCR pri nobeni plemenski svinji nismo dokazali virusne nukleinske kisline virusa PRRS (tabela 5).

Tabela 5: Rezultati RT-PCR na farmi 1.

Table 5: Results of RT-PCR on Farm 1.

Testiranje	Skupno število	Število vzorcev						Rezultati					
		pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t	pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t
7 mesecev po začetku ukrepanja	12	12	np	np	np	np	neg	np	np	np	np	np	np

Legenda: pl. p – plemenski prašiči, t – starost v tednih, neg – negativno, np – ni pregledano

4.1.4 Biovarnostni ukrepi na farmi 1

4.1.4.1 Izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 1

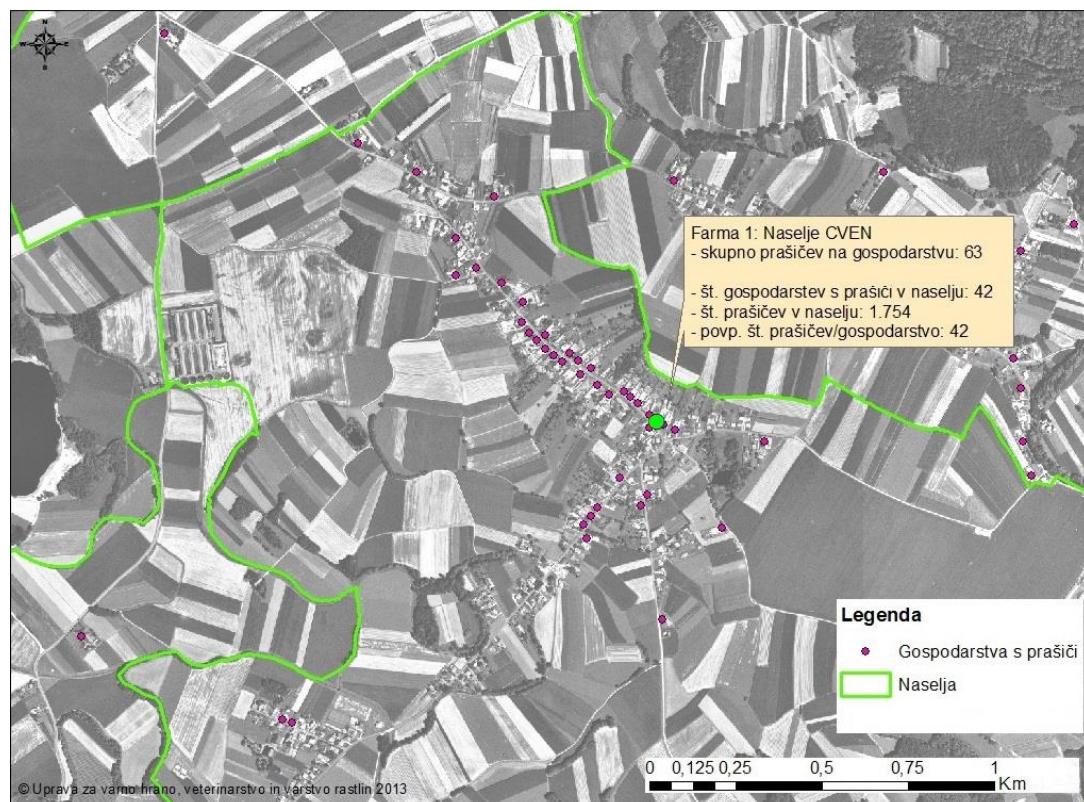
Farma 1 je v naselju Cven (slika 9). V radiju 1 kilometer je še 37 farm, za katere nismo poznali statusa glede PRRS. V naselju je 1.754 prašičev v 42 gospodarstvih s povprečno 42 prašiči. Ob ugotovitvi PRRS na farmi se je rejec obvezal, da bo takoj začel izvajati predpisane biovarnostne ukrepe (tabela 6). Od ugotovitve PRRS je rejec 10 mesecev izvajal dvojno zaporo. Po tem obdobju pa je kupoval prašiče, negativne na protitelesa proti virusu PRRS. Kljub temu je rejec pri nakupljenih prašičih izvajal še 60 dnevno karanteno. Prašiče je testiral še enkrat na protitelesa proti virusu PRRS in jih šele nato vključil v svojo rejo. Pred uvedbo ukrepov je rejec vozil svinje na oploditev k okoliškim merjascem, katerih status glede PRRS ni bil poznan. Od uvedbe ukrepov je osemenjeval svinje le s semenom iz osemenjevalnega središča, ki je prosto PRRS. Farma je imela vse kategorije prašičev ločene po prostorih, delo pa so si organizirali tako, da je en družinski član skrbel za plemensko čredo, drugi pa za ostale kategorije prašičev na način, da je najprej oskrbel kategorijo tekačev in nato pitancev. Na farmi niso izvajali sinhronizacije bukanja, zaradi česar niso mogli izvajati sistema »all in/all out«. Prve 4 mesece od začetka ukrepanja niso uporabljali dezinfekcijskih barier, ki so jih po našem opozorilu namestili pred vhode v prostore farme. Bolnišničnih boksov niso imeli. Vse slabotne pujiske so sproti usmrtili. Izvajali so dezinsekcijo in deratizacijo.

Tabela 6: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 1.

Table 6: Required and implemented biosecurity measures on Farm 1.

Biovarnostni ukrepi na farmi	Ugotovitev PRRS	Izvajanje biovarnostnih ukrepov na farmi					
		4 mesecev po začetku ukrepanja	7 mesecev po začetku ukrepanja	10 mesecev po začetku ukrepanja	17 mesecev po začetku ukrepanja	21 mesecev po začetku ukrepanja	32 mesecev po začetku ukrepanja
Farma oddaljena več kot 300 m od najbližje farme	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Znan PRRS status najbližje farme	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Dvojna zapora	ne	da	da	da	ne	ne	ne
Uporaba preverjeno negativnega semena	ne	da	da	da	da	da	da
Kategorije prašičev ločene po prostorih	da	da	da	da	da	da	da
Preoblačenje in preobuvanje delavcev	da	da	da	da	da	da	da
All in/all out sistem reje	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Razkuževalne bariere	ne	ne	da	da	da	da	da
Ločen prostor za bolne prašiče	da	da	da	da	da	da	da
Deratizacija in dezinfekcija	da	da	da	da	da	da	da

4.1.4.2 Satelitski posnetek lokacije farme 1 v naselju in oddaljenost od drugih farm



Slika 9: Prikaz lokacije farme 1 in sosednih gospodarstev s prašiči.

Figure 9: Location of Farm 1 and neighbouring pig farms.

4.2 REZULTATI S FARME 2

4.2.1 Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 2

Na farmi 2 smo izvajali eliminacijo PRRS z naravno prekužitvijo. Pri prvem vzorčenju smo na farmi preiskali 5 plemenskih prašičev, da bi ugotovili PRRS (tabela 7). V ELISA so trije plemenski prašiči reagirali nizko pozitivno, dva pa negativno. En mesec po začetku ukrepanja smo preiskali vse plemenske svinje. Trije vzorci so v ELISA reagirali negativno, 3 vzorci nizko pozitivno in 1 vzorec visoko pozitivno. Štiri mesece po ukrepanju so v ELISA 3 plemenske svinje reagirale negativno, 3 nizko pozitivno in 1 pozitivno. Plemenska svinja, ki je reagirala visoko pozitivno pri prejšnjem odvzemu, je štiri mesece po ukrepanju reagirala pozitivno. Sedem mesecev po začetku ukrepanja so 3 plemenske svinje ostale negativne, tri pa nizko pozitivne. Pred tem vzorčenjem je rejec izločil eno plemensko svinjo. Deset mesecev po ukrepanju smo odvzeli vzorce 5 pitancev, ki so v ELISA reagirali negativno. Od 6 pregledanih plemenskih svinj so 4 plemenske svinje reagirale negativno, 2 plemenski svinji pa nizko pozitivno. Pri zadnjem odvzemu, 22 mesecev po začetku ukrepanja, smo ugotovili, da so vsi pregledani prašiči (6 plemenskih svinj in 24 pitancev) brez protiteles proti virusu PRRS.

Tabela 7: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 2.

Table 7: The ELISA results of detection of PRRS virus antibodies on Farm 2.

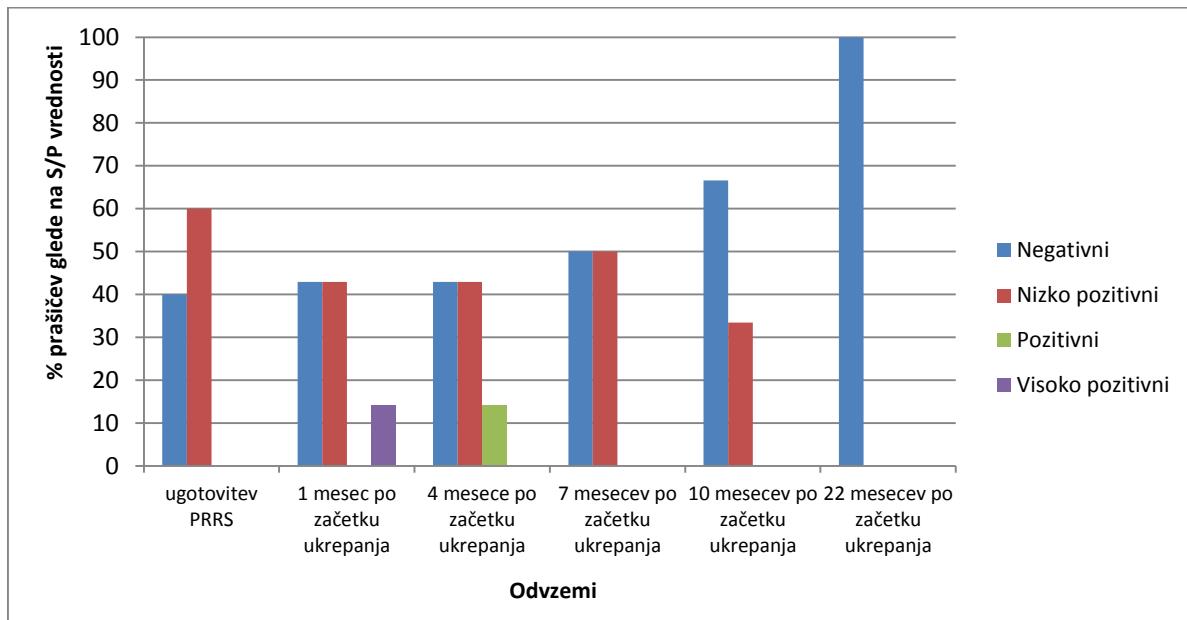
Vzorčenje	Skupno število testiranih prašičev		Število negativnih prašičev		Število nizko pozitivnih prašičev		Število pozitivnih prašičev		Število visoko pozitivnih prašičev	
	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči
Ugotovitev PRRS	5	/	2	/	3	/	0	/	0	/
1 mesec po začetku ukrepanja	7	/	3	/	3	/	0	/	1	/
4 mesece po začetku ukrepanja	7	/	3	/	3	/	1	/	0	/
7 mesecev po začetku ukrepanja	6	/	3	/	3	/	0	/	0	/
10 mesecev po začetku ukrepanja	6	5	4	5	2	0	0	0	0	0
22 mesecev po začetku ukrepanja	6	24	6	24	0	0	0	0	0	0

Legenda: v stolpcu »prašiči« so zajete kategorije od tekačev do pitancev.

Negativni (vrednosti S/P pod 0,4), nizko pozitivni prašiči (vrednosti S/P med 0,4 in 1), pozitivni prašiči (vrednosti S/P med 1 in 2), visoko pozitivni prašiči (vrednosti S/P več kot 2).

Graf 3: Prikaz rezultatov ELISA za plemenske prašiče na farmi 2.

Graph 3: The ELISA results of the breeding pigs on Farm 2.



Pred začetkom ukrepanja smo na farmi 2 ugotovili 40 % plemenskih prašičev negativnih na protitelesa proti virusu PRRS in 60 % nizko pozitivnih (graf 3). En mesec po začetku ukrepanja se je odstotek negativnih plemenskih prašičev zvišal na 42,9, hkrati se je znižal odstotek nizko pozitivnih plemenskih prašičev na 42,9. V naslednjih vzorčenjih smo ugotovili, da se odstotek negativnih plemenskih prašičev v reji zvišuje. Pri zadnjem odvzemenu, so vsi plemenski prašiči v ELISA reagirali negativno na prisotnost protiteles proti virusu PRRS.

4.2.2 Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 2

4.2.2.1 Spreminjanje povprečnih vrednosti S/P v plemenski čredi v zaporednih odvzemih na farmi 2

Statistično značilno razliko smo ugotovili med prvim in šestim odvzemom (tabela 8). Povprečna vrednost S/P je v prvem mesecu ukrepanja, ko smo pregledali vse plemenske prašiče, znašala 0,715. V nadaljnjih odvzemih se je povprečna vrednost S/P zniževala do 22 mesecev, ko smo ugotovili, da so vsi pregledani plemenski prašiči negativni. Maksimalno vrednost S/P (1,295) smo zabeležili v prvem mesecu po ukrepanju (graf 4).

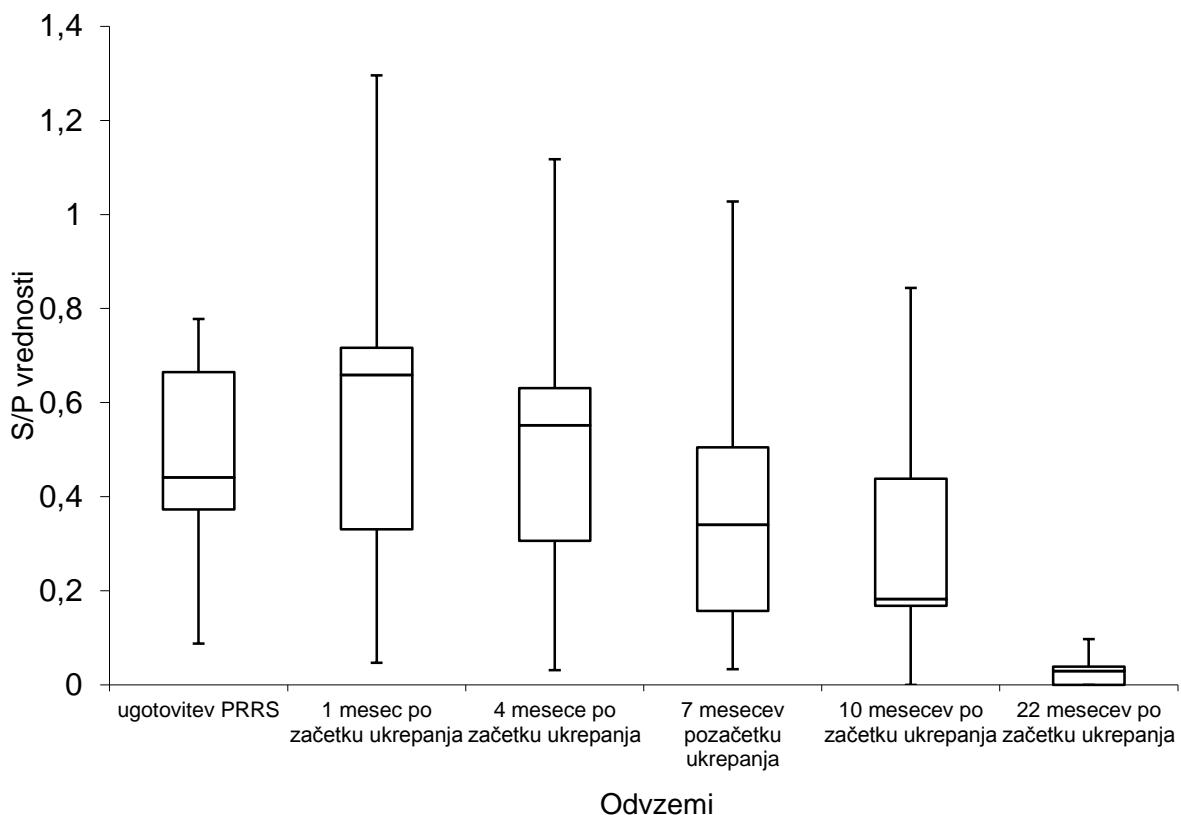
Tabela 8: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P pred začetkom ukrepanja) za farmo 2.

Table 8: Least square means for S/P value with standard errors and significance of differences between successive sampling (comparison with S/P value before taking a measure) for Farm 2.

Odvzem	povprečje S/P	Standardna napaka	P-vrednost
Ugotovitev PRRS	0,469	± 0,269	
1 mesec po začetku ukrepanja	0,715	± 0,227	0,879
4 mesece po začetku ukrepanja	0,599	± 0,227	0,985
7 mesecev po začetku ukrepanja	0,516	± 0,246	0,999
10 mesecev po začetku ukrepanja	0,485	± 0,246	1,000
22 mesecev po začetku ukrepanja	0,047	± 0,156	0,032

Graf 4: Prikaz vrednosti S/P med posameznimi odvzemi pri plemenskih prašičih na farmi 2.

Graph 4: S/P changing between each sampling in breeding pigs on Farm 2.



Stolpci prikazujejo mediano, minimalno in maksimalno vrednost, spodnjo in zgornjo četrtino rezultatov ter srednjih 50 % vrednosti v posamezni skupini.

4.2.3 Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 2

4.2.3.1 Dokaz nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 2

Za dokaz virusa PRRS z metodo RT-PCR smo sedem mesecev po ukrepanju odvzeli vzorce krvi vsem plemenskim prašičem. Nukleinske kisline virusa PRRS nismo ugotovili pri nobenem plemenskem prašiču (tabela 9).

Tabela 9: Rezultati RT-PCR na farmi 2.

Table 9: Results of RT-PCR on Farm 2.

Testiranje	Skupno število	Število vzorcev						Rezultati					
		pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t	pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t
7 mesecev po začetku ukrepanja	6	6	np	np	np	np	np	neg	np	np	np	np	np

Legenda: pl. p – plemenski prašiči, t – starost v tednih, neg – negativno, np – ni pregledano

4.2.4 Biovarnostni ukrepi na farmi 2

4.2.4.1 Izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 2

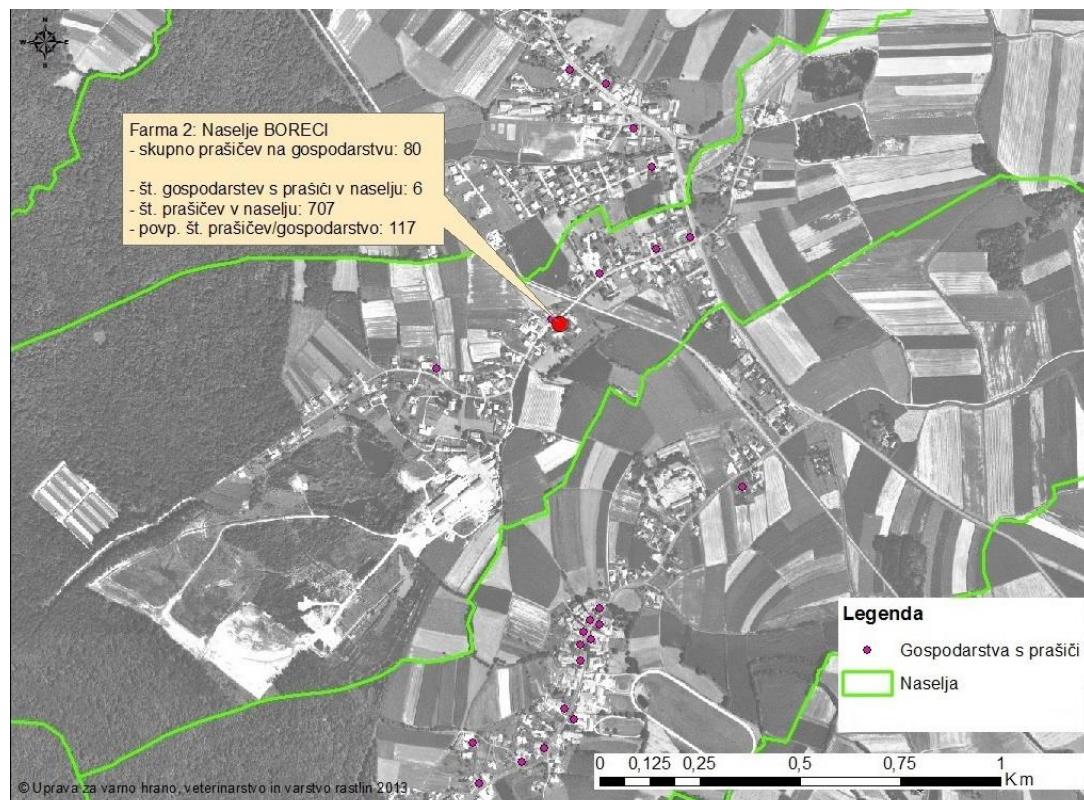
Farma 2 je v naselju Boreci (slika 10). V naselju je bilo 707 prašičev v 6 gospodarstvih. V radiju 1 kilometer je še 17 farm, za katere nismo poznali statusa glede PRRS. Ob ugotovitvi pozitivnih prašičev na protitelesa se je rejec obvezal, da bo takoj začel izvajati predpisane biovarnostne ukrepe (tabela 10). Z uvedbo ukrepov je rejec izvajal dvojno zaporo reje 7 mesecev, po tem obdobju pa je kupoval prašiče, negativne na protitelesa proti virusu PRRS, prav tako je pri nakupljenih prašičih izvajal še 60 dnevno karanteno. Pred vnosom v rejo smo prašiče pregledali glede na protitelesa proti virusu PRRS in šele po tem jih je rejec vključil v rejo. Od uvedbe ukrepov je rejec osemenjeval svinje samo s semenom iz osemenjevalnega središča, ki je prosto PRRS. Farma je imela kategorije prašičev ločene po prostorih. Delo so si organizirali tako, da so najprej oskrbeli plemensko čredo in uporabili obleko in obutev, ki jo uporabljajo le v tem prostoru. Nato se preoblečejo in oskrbijo še ostale kategorije, nazadnje kategorijo pitancev. Na farmi 2 niso izvajali sistema reje »all in/all out«. Dezinfekcijske bariere so namestili takoj ob začetku izvajanja ukrepov. Po uvedbi ukrepov so bolne prašiče namestili v bolnišnični boks, ki so ga imeli v ločenem prostoru. Izvajali so dezinsekcijo in deratizacijo.

Tabela 10: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 2.

Table 10: Required and implemented biosecurity measures on Farm 2.

Biovarnostni ukrepi na farmi	Izvajanje biovarnostnih ukrepov na farmi					
	Ugotovitev PRRS	1 mesec po začetku ukrepanja	4 meseca po začetku ukrepanja	7 mesecov po začetku ukrepanja	10 mesecov po začetku ukrepanja	22 mesecov po začetku ukrepanja
Farma oddaljena več kot 300 m od najbližje farme	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Znan PRRS status najbližje farme	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Dvojna zapora	ne	da	da	da	ne	ne
Uporaba preverjeno negativnega semena	ne	da	da	da	da	da
Kategorije prašičev ločene po prostorih	da	da	da	da	da	da
Preoblačenje in preobuvanje delavcev	da	da	da	da	da	da
All in/all out sistem reje	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Razkuževalne bariere	ne	da	da	da	da	da
Ločen prostor za bolne prašiče	ne	da	da	da	da	da
Deratizacija in dezinsekcija	da	da	da	da	da	da

4.2.4.2 Satelitski posnetek lokacije farme 2 v naselju in oddaljenost od drugih farm



Slika 10: Prikaz lokacije farme 2 in sosednih gospodarstev s prašiči.

Figure 10: Location of Farm 2 and neighbouring pig farms.

4.3 REZULTATI S FARME 3

4.3.1 Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 3

Na farmi 3 smo izvajali eliminacijo PRRS z naravno prekužitvijo. Ob prvem vzorčenju smo protitelesa proti virusu PRRS dokazali pri vseh 15 plemenskih prašičih (tabela 11). Po prvem vzorčenju in pred uvedbo ukrepov je rejec dodal v plemensko čredo še 2 plemenski svinji. Tri mesece po začetku ukrepanja smo pregledali vseh 17 plemenskih prašičev, od teh sta 2 reagirala negativno na prisotnost protiteles v ELISA, 3 nizko pozitivno, 5 pozitivno in 7 visoko pozitivno. Šest mesecev po začetku ukrepanja se je znižal stalež plemenske črede za 3 svinje. Ugotovili smo, da je en plemenski prašič v ELISA reagiral negativno (drugi prašič kot pri prejšnjem odvzemu), 2 nizko pozitivno, 2 pozitivno in 9 visoko pozitivno. Devet mesecev po ukrepanju smo ugotovili, da je rejec v plemensko čredo dodal 1 plemensko svinjo. Od 15 pregledanih plemenskih prašičev je ena plemenska svinja reagirala negativno (nova plemenska svinja) v ELISA, 3 so reagirale nizko pozitivno, 3 pozitivno in 8 visoko pozitivno. Pri pregledu 11 pitancev smo ugotovili 4 negativne, 1 nizko pozitivnega, 1 pozitivnega in 5 visoko pozitivnih na prisotnost protiteles proti virusu PRRS.

Tabela 11: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 3.

Table 11: The ELISA results of detection of PRRS virus antibodies on Farm 3.

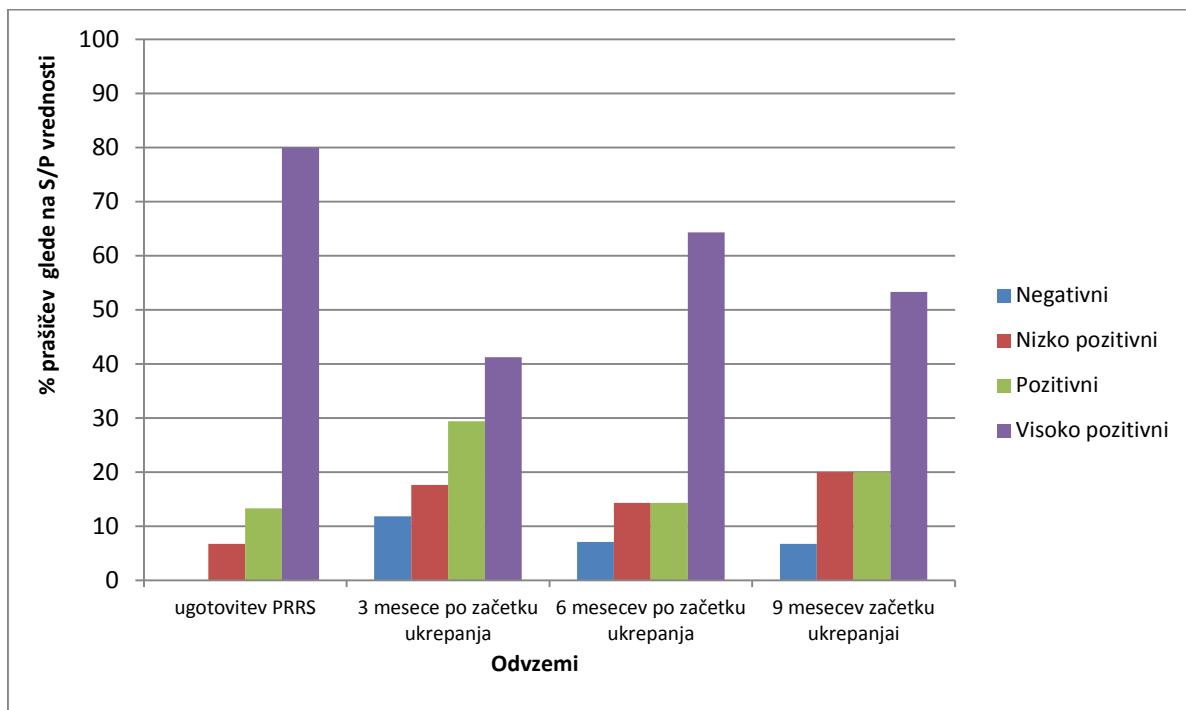
Vzorčenje	Skupno število testiranih prašičev		Število negativnih prašičev		Število nizko pozitivnih prašičev		Število pozitivnih prašičev		Število visoko pozitivnih prašičev	
	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči
Ugotovitev PRRS	15	/	0	/	1	/	2	/	12	/
3 mesece po začetku ukrepanja	17	/	2	/	3	/	5	/	7	/
6 mesecev po začetku ukrepanja	14	/	1	/	2	/	2	/	9	/
9 mesecev po začetku ukrepanja	15	11	1	4	3	1	3	1	8	5

Legenda: v stolpcu »prašiči« so zajete kategorije od tekačev do pitancev.

Negativni (vrednosti S/P pod 0,4), nizko pozitivni prašiči (vrednosti S/P med 0,4 in 1), pozitivni prašiči (vrednosti S/P med 1 in 2), visoko pozitivni prašiči (vrednosti S/P več kot 2).

Graf 5: Prikaz rezultatov ELISA za plemenske prašiče na farmi 3.

Graph 5: The ELISA results of the breeding pigs on Farm 3.



Ob uvedbi ukrepov so vsi plemenski prašiči v ELISA reagirali pozitivno na prisotnost protiteles proti virusu PRRS (graf 5). Tri mesece po ukrepanju se je odstotek visoko pozitivnih plemenskih prašičev znižal na 41,2, ugotovili pa smo 11,7 % negativnih prašičev, 17,6 % nizko pozitivnih in 29,4 % pozitivnih plemenskih prašičev. Šest mesecev po ukrepanju se je odstotek visoko pozitivnih plemenskih prašičev zvišal na 64,3, znižal pa se je odstotek negativnih, nizko pozitivnih in pozitivnih plemenskih prašičev. Devet mesecev po ukrepanju smo ugotovili 53,3 % visoko pozitivnih plemenskih prašičev. Odstotek nizko pozitivnih in pozitivnih plemenskih prašičev je narastel na 20 od predhodnih 14,3 (6 mesecev po začetku ukrepanja).

4.3.2 Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 3

4.3.2.1 Spreminjanje povprečnih vrednosti S/P v plemenski čredi v zaporednih odvzemih na farmi 3

Statistično značilno razliko smo ugotovili med prvim in drugim odvzemom ter med prvim in četrtem odvzemom (tabela 12). Ob ugotovitvi PRRS je povprečna vrednost S/P znašala 2,823, 3 mesece po začetku ukrepanja se je povprečna vrednost S/P znižala na 1,747. Šest in 9 mesecev po začetku sta povprečni vrednosti S/P ponovno narasli na 1,973 oz. 1,921 (tabela 12). Razlika med zadnjimi tremi odvzemi je bila majhna, saj so vse S/P vrednosti pri visoko pozitivnih prašičih gibale okoli 3, vendar so bile nižje kot pri prvem odvzemu (graf 6).

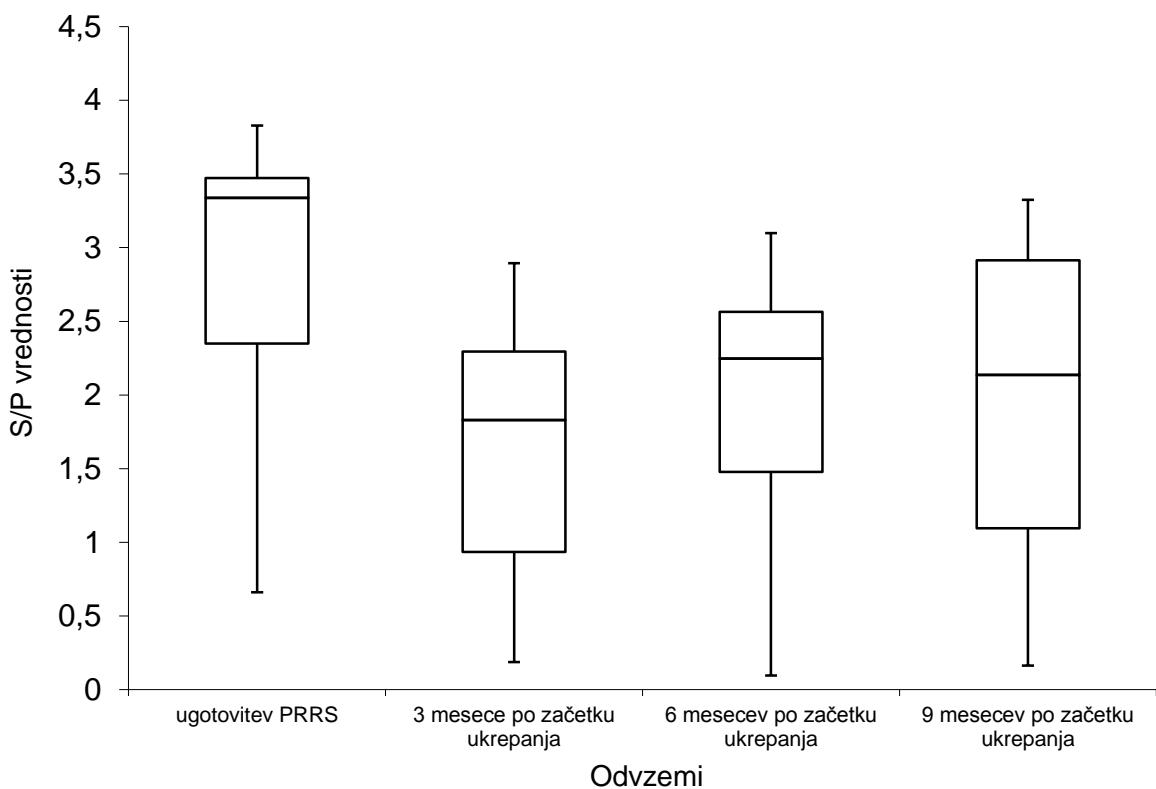
Tabela 12: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P pred začetkom ukrepanja) za farmo 3.

Table 12: Least square means for S/P value with standard errors and significance of differences between successive sampling (comparison with S/P value before taking a measure) for Farm 3.

Odvzem	povprečje S/P	Standardna napaka	P-vrednost
Ugotovitev PRRS	2,823	± 0,247	
3 mesece po začetku ukrepanja	1,747	± 0,247	0,0090
6 mesecev po začetku ukrepanja	1,973	± 0,255	0,0530
9 mesecev po začetku ukrepanja	1,921	± 0,265	0,042

Graf 6: Prikaz vrednosti S/P med posameznimi odvzemi pri plemenskih prašičih na farmi 3.

Graph 6: S/P changing between each sampling in the breeding pigs on Farm 3.



Stolpci prikazujejo mediano, minimalno in maksimalno vrednost, spodnjo in zgornjo četrtinico rezultatov ter srednjih 50 % vrednosti v posamezni skupini.

4.3.3 Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 3

4.3.3.1 Dokaz nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 3

Šest mesecev po uvedbi ukrepov smo z metodo RT-PCR pregledali 14 plemenskih prašičev, devet mesecev po uvedbi ukrepov pa 15 plemenskih prašičev in 11 tekačev (tabela 13). Pri nobenem plemenskem prašiču nismo ugotovili nukleinske kisline virusa PRRS. Nukleinsko kislino virusa smo dokazali pri 8 tednov starih tekačih, ne pa tudi pri tekačih starih 6 tednov.

Tabela 13: Rezultati RT-PCR na farmi 3.

Table 13: Results of RT-PCR on Farm 3.

Testiranje	Skupno število	Število vzorcev						Rezultati					
		pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t	pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t
6 mesecev po začetku ukrepanja	14	14	np	np	np	np	np	neg	np	np	np	np	np
9 mesecev po začetku ukrepanja	26	15	4	4	np	np	3	neg	neg	poz	np	np	neg

Legenda: pl. p – plemenski prašiči, t – starost v tednih, neg – negativno, poz – pozitivno, np – ni pregledano

4.3.3.2 Rezultati določanja nukleotidnega zaporedja

Na farmi 3 smo 9 mesecev po ukrepanju ugotovili prisotnost nukleinske kisline virusa PRRS z metodo RT-PCR pri 8-tedenskih tekačih. Iz produktov RT-PCR smo izvedli direktno določanje nukleotidnega zaporedja. Primerjava 258 nukleotidov regije ORF 7 je pokazala, da ima ugotovljen sev virusa PRRS 93,4-odstotkov identičnih nukleotidov z referenčnim sevom Lelystad (slika 20).

4.3.4 Biovarnostni ukrepi na farmi 3

4.3.4.1 Izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 3

Farma 3 je edina prašičja farma v naselju Bojanci in okolici (slika 11). Ob ugotovitvi PRRS se je rejec obvezal, da bo izvajal predpisane biovarnostne ukrepe na farmi (tabela 14). Od začetka uvedbe ukrepov rejec 3 mesece v rejo ni dodajal novih plemenskih prašičev. Po tem obdobju je dodal v plemensko čredo lastno mladico, eno plemensko svinjo je izločil in jo nadomestil s plemensko svinjo iz reje z nepoznamim statusom glede PRRS. S tem načinom je rejec kršil predpisano dvojno zaporu reje. Za razplod je rejec ves čas uporabljal lastnega merjasca. Posamezne kategorije prašičev niso bile ločene po prostorih. Delo so imeli organizirano tako, da so najprej oskrbeli plemensko čredo in šele nato ostale kategorije. V reji niso izvajali sistema »all in/all out«. Dezinfekcijske bariere so namestili takoj ob uvedbi ukrepov. Bolnišnični boks

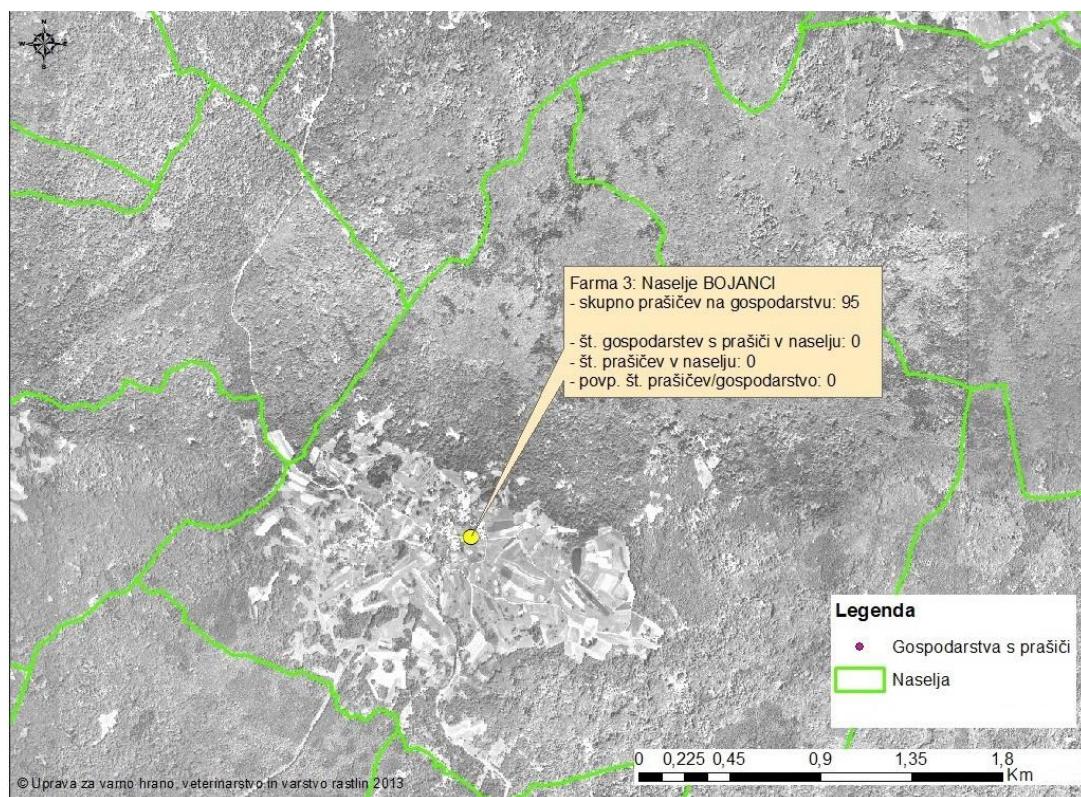
je bil v prostoru skupaj z drugimi prašiči (do 3 mesecev po ukrepanju), po našem opozorilu pa so bolne prašiče premestili v ločen prostor. Na farmi so izvajali dezinsekcijo in deratizacijo.

Tabela 14: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 3.

Table 14: Required and implemented biosecurity measures on Farm 3.

Biovarnostni ukrepi na farmi	Izvajanje biovarnostnih ukrepov na farmi			
	Ugotovitev PRRS	3 mesece po začetku ukrepanja	6 mesecev po začetku ukrepanja	9 mesecev po začetku ukrepanja
Farma oddaljena več kot 300 m od najbližje farme	da	da	da	da
Znan PRRS status najbližje farme	ne	ne	ne	ne
Dvojna zapora	ne	da	ne	ne
Uporaba preverjeno negativnega semena	ne	ne	ne	ne
Kategorije prašičev ločene po prostorih	ne	ne	ne	ne
Preoblačenje in preobuvanje delavcev	ne	ne	ne	ne
All in/all out sistem reje	ne	ne	ne	ne
Razkuževalne bariere	ne	da	da	da
Ločen prostor za bolne prašiče	ne	ne	da	da
Deratizacija in dezinsekcija	da	da	da	da

4.3.4.2 Satelitski posnetek lokacije farme 3 v naselju in oddaljenost od drugih farm



Slika 11: Prikaz lokacije farme 3 in sosednih gospodarstev s prašiči.

Figure 11: Location of Farm 3 and neighbouring pig farms.

4.4 REZULTATI S FARME 4

4.4.1 Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 4

Na farmi 4 smo izvajali eliminacijo PRRS s serumizacijo. Za potrditev PRRS na farmi smo najprej odvzeli vzorce krvi 10 plemenskim prašičem in 10 pitancem (tabela 15). V ELISA sta 2 plemenska prašiča reagirala pozitivno na protitelesa proti virusu PRRS in 8 visoko pozitivno. Vseh 10 pregledanih pitancev je v ELISA reagiralo visoko pozitivno.

Krvne vzorce smo odvzeli vsem 74 plemenskim prašičem, da smo dobili izhodiščno stanje. Isti dan smo vse plemenske prašiče serumizirali. V ELISA je na protitelesa reagiralo visoko pozitivno 59 prašičev, 10 pozitivno, 4 nizko pozitivno, pri enem plemenskem prašiču pa nismo dokazali protiteles. Dva meseca po serumizaciji smo pri pregledu celotne plemenske črede v ELISA ugotovili 56 visoko pozitivnih, 17 pozitivnih, 1 plemenski prašič pa je reagiral negativno na protitelesa (isti plemenski prašič kot pri prejšnjem odvzemom). Šest mesecev po serumizaciji smo v rejti ugotovili 3 negativne plemenske prašiče (en prašič je isti kot pri prejšnjih dveh testiranjih), 13 nizko pozitivnih, 24 pozitivnih in 35 visoko pozitivnih. Rejec je pred odvzemom vzorcev (6 mesecev po serumizaciji) v plemensko čredo dodal novega merjasca, ki ga je kupil na sejmu in zamenjal 5 starih svinj s 5 mladicami iz lastne reje. Enajst mesecev po izvedbi serumizacije smo pregledali 10 pitancev, da bi ovrednotili uspešnost eliminacije PRRS iz reje. Pri devetih pitancih smo v ELISA dokazali protitelesa (visoko pozitivni), 1 vzorec pa je bil ovrednoten kot pozitiven. Trinajst mesecev po serumizaciji smo pri večini od 24 pregledanih pitancev dokazali protitelesa proti virusu PRRS. V ELISA smo 11 vzorcev ovrednotili kot visoko pozitivno, 8 pozitivno, 2 nizko pozitivno, v 3 vzorcih pa nismo dokazali protiteles.

Tabela 15: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 4.

Table 15: The ELISA results of detection of PRRS virus antibodies on Farm 4.

Vzorčenje	Skupno število testiranih prašičev		Število negativnih prašičev		Število nizko pozitivnih prašičev		Število pozitivnih prašičev		Število visoko pozitivnih prašičev	
	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči
Ugotovitev PRRS	10	10	0	0	0	0	2	0	8	10
Pred serumizacijo	74	/	1	/	4	/	10	/	59	/
2 meseca po serumizaciji	74	/	1	/	0	/	17	/	56	/
6 mesecev po serumizaciji	75	/	3	/	13	/	24	/	35	/
11 mesecev po serumizaciji	/	10	/	0	/	0	/	1	/	9
13 mesecev po serumizaciji	/	24	/	3	/	2	/	8	/	11

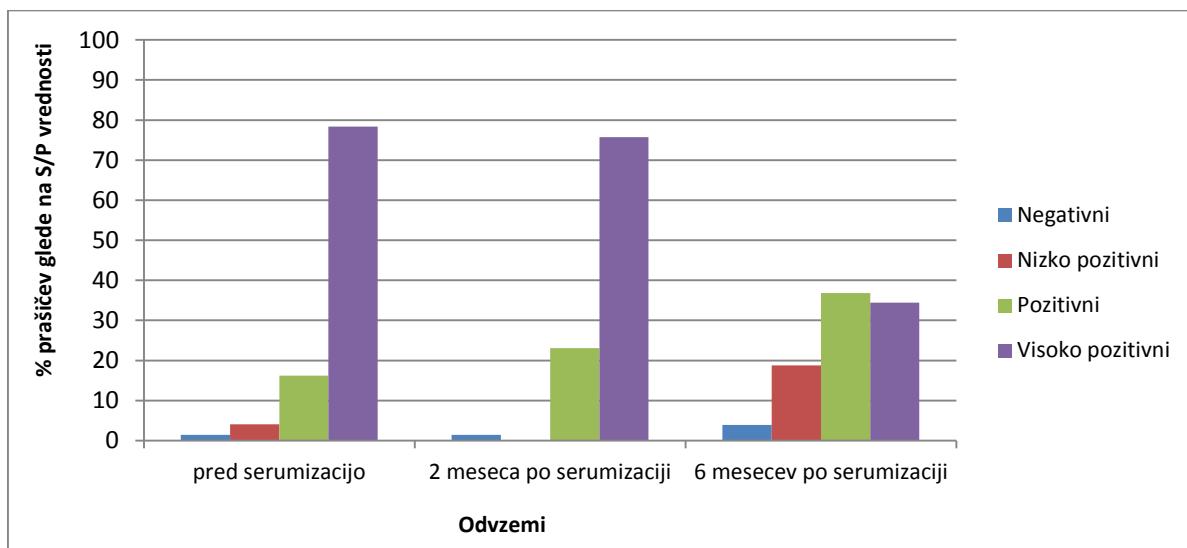
Legenda: v stolpcu »prašiči« so zajete kategorije od tekačev do pitancev.

Negativni (vrednosti S/P pod 0,4), nizko pozitivni prašiči (vrednosti S/P med 0,4 in 1), pozitivni prašiči

(vrednosti S/P med 1 in 2), visoko pozitivni prašiči (vrednosti S/P več kot 2).

Graf 7: Prikaz rezultatov ELISA za plemenske prašiče na farmi 4.

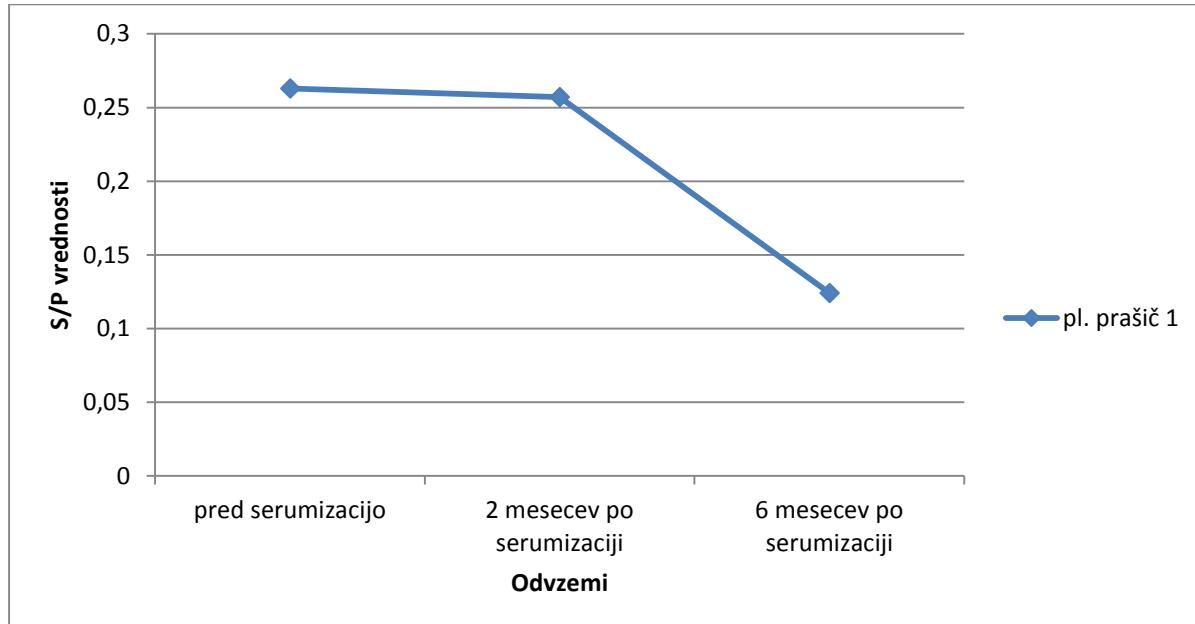
Graph 7: The ELISA results of the breeding pigs on Farm 4.



Pred izvedbo serumizacije smo v plemenski čredi ugotovili 1,4% negativnih prašičev na protitelesa. Preostalih 78,4 % prašičev je v ELISA reagiralo visoko pozitivno, 13,5% pozitivno in 5,4% nizko pozitivno (graf 7). Dva meseca po serumizaciji se je odstotek visoko pozitivnih plemenskih prašičev znižal na 75,7, odstotek pozitivnih prašičev se je zvišal na 23,1, pri enem prašiču pa nismo dokazali protiteles. Šest mesecev po serumizaciji je odstotek visoko pozitivnih plemenskih prašičev znašal 34,4, odstotek pozitivnih plemenskih prašičev se je zvišal na 36,8, prav tako pa tudi nizko pozitivnih plemenskih prašičev na 18,8. Odstotek negativnih plemenskih prašičev se je zvišal na 4.

Graf 8: Prikaz vrednosti S/P pri posameznih plemenskih prašičih, ki so pred serumizacijo reagirali negativno v ELISA.

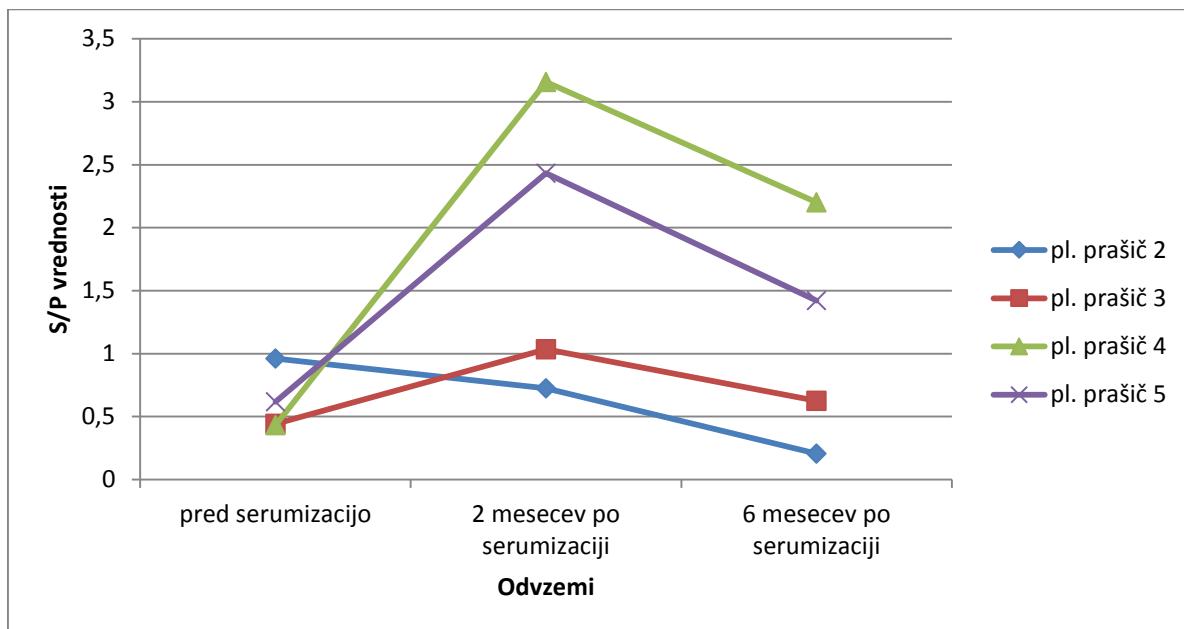
Graph 8: S/P values for individual breeding pig that reacted negative in ELISA before serumization.



Pri primerjavi vrednosti S/P pri enem plemenskem prašiču smo ugotovili, da se je vrednost S/P tako 2 kot 6 mesecev po izvedeni serumizaciji znižala (graf 8).

Graf 9: Prikaz vrednosti S/P pri posameznih plemenskih prašičih, ki so pred serumizacijo reagirali nizko pozitivno v ELISA.

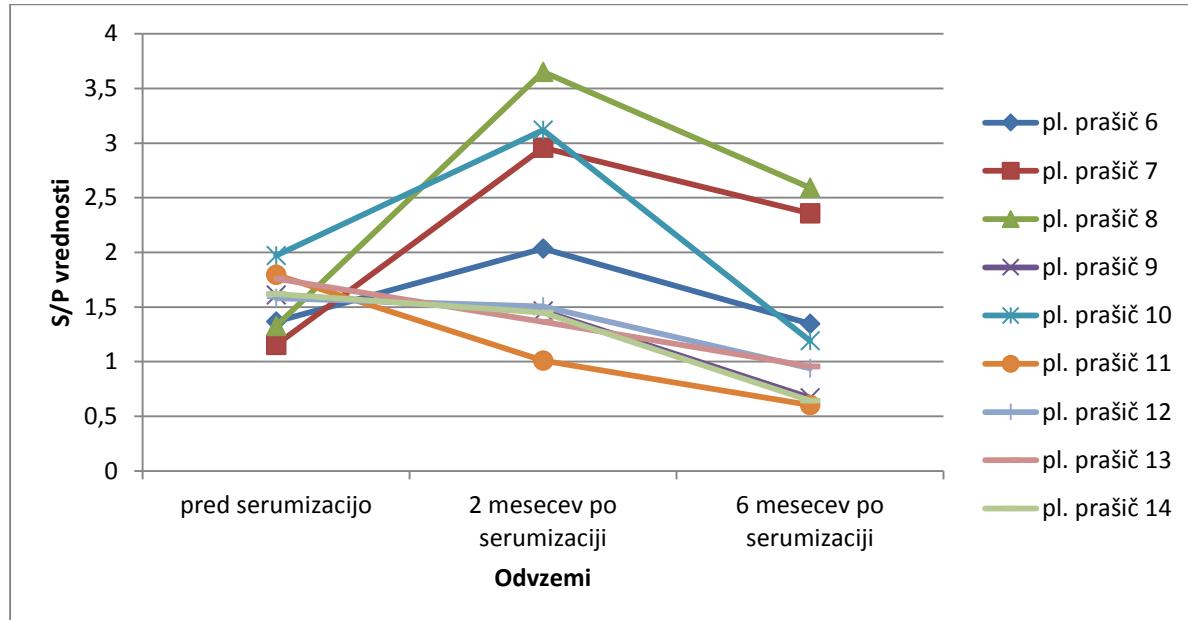
Graph 9: S/P values for individual breeding pig that reacted low positive in ELISA before serumization.



Pri primerjavi vrednosti S/P pri 4 plemenskih prašičih smo ugotovili, da je vrednost S/P pri treh narasla 2 meseca po izvedeni serumizaciji. Šest mesecev po serumizaciji so se vrednosti S/P pri vseh vzorcih prašičev znižale. Pri enem plemenskem prašiču smo pri vseh treh vzorčenjih ugotovili padanje vrednosti S/P (graf 9).

Graf 10: Prikaz vrednosti S/P pri posameznih plemenskih prašičih, ki so pred serumizacijo reagirali pozitivno v ELISA.

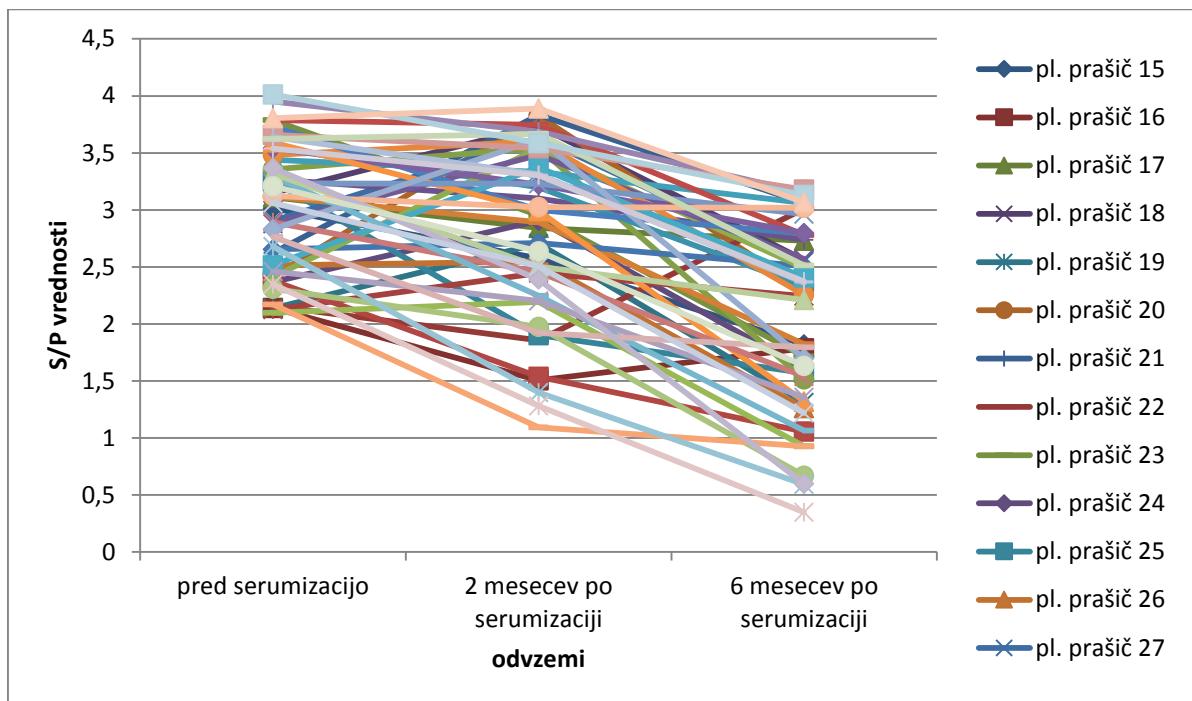
Graph 10: S/P values for individual breeding pig that reacted positive in ELISA before serumization.



Pri primerjavi vrednosti S/P pri 9 plemenskih prašičih smo ugotovili, da se je 2 mesece pa serumizaciji vrednost S/P zvišala pri 4 plemenskih prašičih, pri 5 plemenskih prašičih pa se je znižala. Šest mesecev po serumizaciji so se vrednosti S/P pri vseh plemenskih prašičih znižale glede na rezultate prejšnjega odvzema (graf 10).

Graf 11: Prikaz vrednosti S/P pri posameznih plemenskih prašičih, ki so pred serumizacijo reagirali visoko pozitivno v ELISA.

Graph 11: S/P values for individual breeding pig that reacted high positive in ELISA before serumization.



Pri primerjavi vrednosti S/P pri 12 plemenskih prašičih smo ugotovili, da so prašiči, pri katerih so vrednosti S/P presegale 2 različno reagirali na serumizacijo, saj smo 2 meseca po serumizaciji pri nekaterih prašičih ugotavljali zvišanje, pri drugih pa znižanje S/P vrednosti. Šest mesecev po serumizaciji smo pri večini prašičev zabeležili znižanje vrednosti S/P, pri dveh prašičih (pl. prašič 16 in 22), pa smo zabeležili zvišanje vrednosti S/P (graf 11).

4.4.2 Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 4

4.4.2.1 Spreminjanje povprečnih vrednosti S/P v plemenski čredi v zaporednih odvzemih na farmi 4

Statistično značilna razlika je med prvim in tretjim odvzemom (tabela 16), medtem ko med prvim in drugim odvzemom nismo ugotovili statistično značilne razlike.

Iz grafikona kvantilov je razvidno, da so vrednosti S/P pred serumizacijo in 2 meseca po serumizaciji podobne, prav tako smo dobili podobne vrednosti pri povprečju S/P. Šest mesecev po serumizaciji se je povprečna vrednost S/P znižala na 1,850 (tabela 16). Pri prvem odvzemu smo ugotovili maksimalno vrednost S/P 4,012 (graf 12).

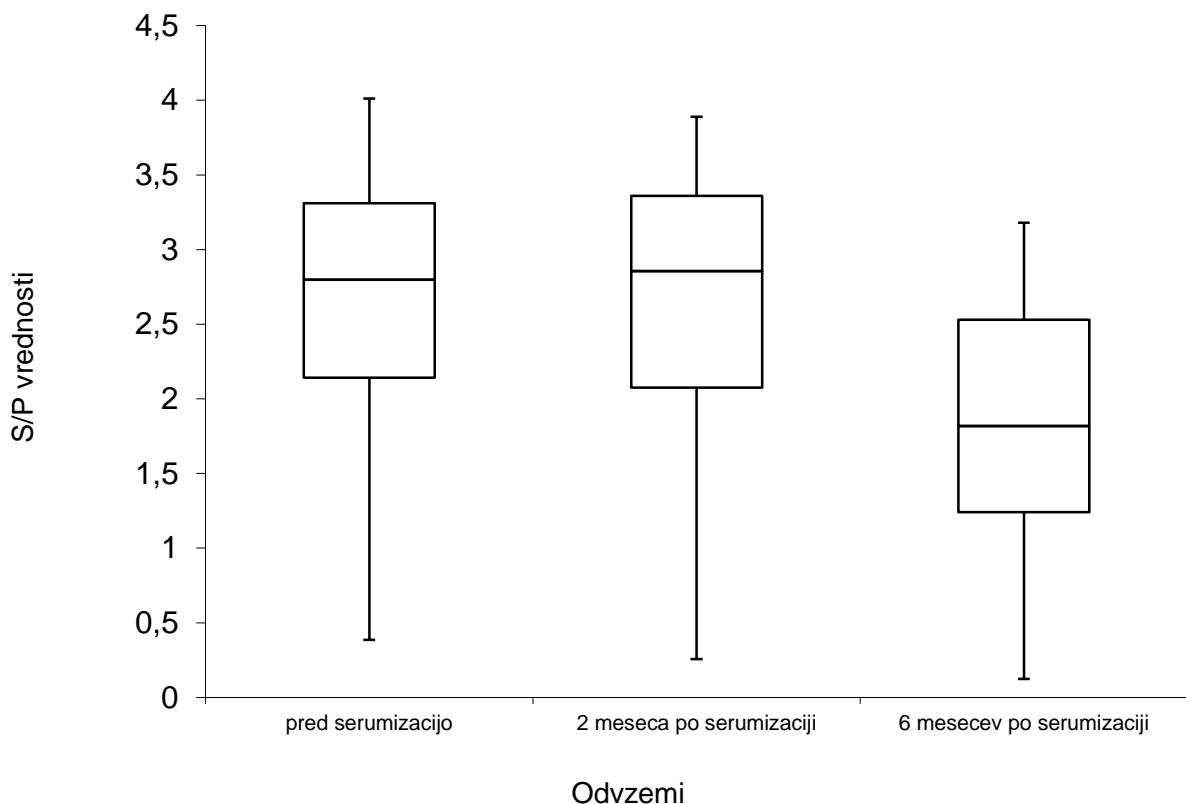
Tabela 16: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P pred serumizacijo) za farmo 4.

Table 16: Least square means for S/P value with standard errors and significance of differences between successive sampling (comparison with S/P value before serumization) for Farm 4.

Odvzem	Povprečje S/P	Standardna napaka	P-vrednost
pred serumizacijo	2,635	± 0,101	
2 meseca po serumizaciji	2,658	± 0,101	0,9811
6 mesecev po serumizaciji	1,850	± 0,100	< 0,0001

Graf 12: Prikaz vrednosti S/P med posameznimi odvzemi pri plemenskih prašičih na farmi 4.

Graph 12: S/P changing between each sampling in breeding pigs on Farm 4.



Stolpci prikazujejo mediano, minimalno in maksimalno vrednost, spodnjo in zgornjo četrtino rezultatov ter srednjih 50 % vrednosti v posamezni skupini.

4.4.3 Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 4

4.4.3.1 Dokaz nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 4

Za potrebe serumizacije smo odvzeli krvne vzorce 15 tekačem v starostni skupini 8, 10 in 12 tednov (5 tekačev v vsaki starostni skupini) in jih preiskali z metodo RT-PCR. Nukleinsko kislino virusa PRRS smo dokazali pri 10 tekačih v starosti 8 in 10 tednov. Iz 10 serumskih vzorcev, v katerih smo dokazali nukleinsko kislino virusa PRRS, smo pripravili inokulum za izvedbo serumizacije. Šest mesecev po izvedbi serumizacije smo z metodo RT-PCR pregledali vzorce serumov vseh 75 plemenskih prašičev, pri nobenem nismo dokazali nukleinske kisline virusa PRRS. Deset mesecev po serumizaciji smo odvzeli krvne vzorce 5 tekačem in 5 pitancem

(tabela 17) in niti pri tekačih niti pri pitancih nismo dokazali nukleinske kisline virusa. Trinajst mesecev po izvedbi serumizacije smo nukleinsko kislino virusa PRRS dokazali pri tekačih starih 6 in 10 tednov, pri tekačih starih 8, 12 in 14 tednov pa nukleinske kisline virusa PRRS nismo dokazali.

Tabela 17: Rezultati RT-PCR na farmi 4.

Table 17: Results of RT-PCR on Farm 4.

Testiranje	Skupno število	Število vzorcev						Rezultati					
		pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t	pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t
pred serumizacijo	25	10	np	5	5	5	np	neg	np	poz	poz	neg	np
6 mesecev po serumizaciji	75	75	np	np	np	np	np	neg	np	np	np	np	np
11 mesecev po serumizaciji	10	np	np	5	np	np	5	np	np	neg	np	np	neg
13 mesecev po serumizaciji	24	np	5	5	5	5	4	np	poz	neg	poz	neg	neg

Legenda: pl. p – plemenski prašiči, t – starost v tednih, neg – negativno, poz – pozitivno, np – ni pregledano

4.4.3.2 Rezultati določanja nukleotidnega zaporedja na farmi 4

Na farmi 4 smo v letih od 2009 do 2011 določali nukleotidno zaporedje iz pozitivnih vzorcev, v katerih smo z metodo RT-PCR dokazali prisotnost nukleinske kisline virusa PRRS. Vzorec z oznako 1/2009 predstavlja inokulum, s katerim smo v reji izvedli serumizacijo. V letu 2010 smo dokazali prisotnost nukleinske kisline virusa PRRS pri enem poginjenem tekaču (oznaka 1/2010), v letu 2011 pa pri 6 in 10 tednov starih tekačih (oznaka 1/2011, 2/2011). Nukleotidna zaporedja smo določali iz štirih vzorcev, ki so v testu RT-PCR reagirali pozitivno. Pri primerjavi 258 nukleotidov v odseku gena, ki kodira protein nukleokapside (ORF 7), smo ugotovili, da odstotek identičnosti nukleotidov med 4 vzorci znaša od 98,4 do 100. Pri primerjavi neukleotidnih zaporedij sevov s farme 4 (1/2009, 1/2010, 1/2011, 2/2011) in nukleotidnega zaporedja referenčnega vzorca Lelystad smo ugotovili od 88,4 do 89,9 % identičnosti nukleotidov (slika 20).

4.4.4 Biovarnostni ukrepi na farmi 4

4.4.4.1 Izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 4

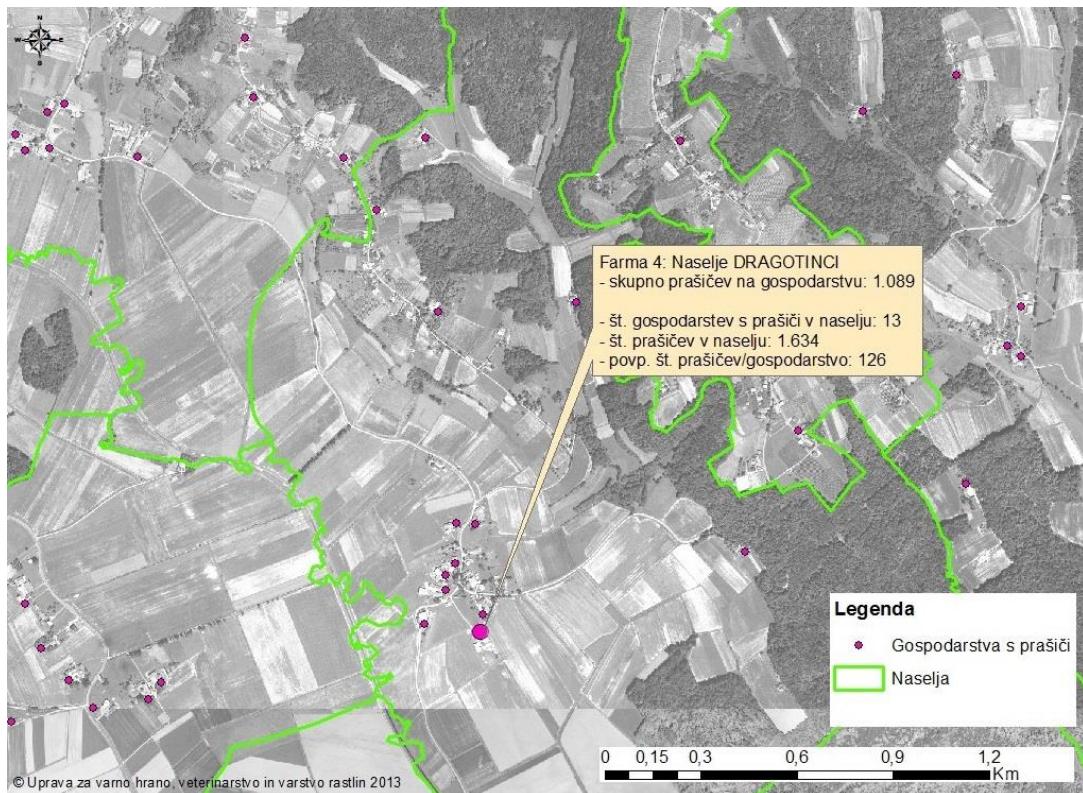
Farma 4 stoji v naselju Dragotinci (slika 12). V radiju 350 metrov od farme je bilo 7 farm, v najbližjem naselju, ki je oddaljeno približno 1,2 kilometra pa še 7. Za farme v neposredni bližini nismo poznali statusa glede PRRS. V naselju je bilo 1.634 prašičev v 13 gospodarstvih. Po ugotovitvi PRRS na farmi se je rejec obvezal, da bo izvajal predpisane biovarnostne ukrepe (tabela 18). Od začetka izvajanja ukrepov in do pregleda reje 2 meseca po začetku rejec ni dodajal novih plemenskih prašičev v plemensko čredo, po tem obdobju pa je dodal novega merjasca in lastne mladice. Za oploditev je uporabljal lastne merjasce. Farma ni imela ločenih prostorov za posamezne kategorije prašičev. Porodnišnica je bila v ločenem prostoru, medtem ko so bili v čakališču skupaj s plemenskimi svinjami nastanjeni tudi tekači, pitance pa je imel rejec v ločenem objektu. Oblek in obutve niso menjali pri prehodih med kategorijami, saj le-te niso bile ločene med seboj. Na farmi niso izvajali sistema reje »all in/all out«. Že pred začetkom izvajanja ukrepov je imel rejec dezinfekcijske bariere, le opozorili smo jih, naj raztopino menjajo vsak dan. Bolnišnični boks so imeli v ločenem prostoru. Izvajali so dezinsekcijo in deratizacijo.

Tabela 18: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 4.

Table 18: Required and implemented biosecurity measures on Farm 4.

Biovarnostni ukrepi na farmi	Izvajanje biovarnostnih ukrepov na farmi				
	Pred serumizacijo	2 meseca po serumizaciji	6 mesecev po serumizaciji	11 mesecev po serumizaciji	13 mesecev po serumizaciji
Farma oddaljena več kot 300 m od najbližje farme	ne	ne	ne	ne	ne
Znan PRRS status najbližje farme	ne	ne	ne	ne	ne
Dvojna zapora	ne	da	ne	ne	ne
Uporaba preverjeno negativnega semena	ne	ne	ne	ne	ne
Kategorije prašičev ločene po prostorih	ne	ne	ne	ne	ne
Preoblačenje in preobuvanje delavcev	ne	ne	ne	ne	ne
All in/all out sistem reje	ne	ne	ne	ne	ne
Razkuževalne bariere	da	da	da	da	da
Ločen prostor za bolne prašiče	da	da	da	da	da
Deratizacija in dezinsekcija	da	da	da	da	da

4.4.4.2 Satelitski posnetek lokacije farme 4 v naselju in oddaljenost od drugih farm



Slika 12: Prikaz lokacije farme 4 in sosednih gospodarstev s prašiči.

Figure 12: Location of Farm 4 and neighbouring pig farms.

4.5 REZULTATI S FARME 5

4.5.1 Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 5

Na farmi 5 smo izvajali eliminacijo PRRS s serumizacijo. Za ugotovitev PRRS na farmi smo naprej odvzeli vzorce 5 plemenskim prašičem in 5 pitancem. Protitelesa proti virusu PRRS smo ugotovili pri 5 plemenskih prašičih, 3 so v ELISA reagirali pozitivno, 2 pa visoko pozitivno. Vseh 5 pitancev je reagiralo v ELISA visoko pozitivno (tabela 19). Tik pred izvedbo I. serumizacije smo odvzeli kri vsem 134 plemenskim prašičem in ugotovili 54 visoko pozitivnih, 43 pozitivnih in 24 nizko pozitivnih, pri 13 prašičih protiteles nismo dokazali. Isti dan smo izvedli I. serumizacijo vseh plemenskih prašičev. Tri mesece po I. serumizaciji smo pri pregledu 134 prašičev plemenske črede ugotovili, da je 6 plemenskih prašičev negativnih, 21 nizko pozitivnih, 51 pozitivnih in 56 visoko pozitivnih. Ker je 6 plemenskih prašičev še vedno reagiralo negativno v ELISA, smo izvedli II. serumizacijo 4 mesece po I. serumizaciji. Tri mesece po II. serumizaciji smo ponovno pregledali vseh 133 plemenskih prašičev in ugotovili, da sta v ELISA 2 vzorca reagirala negativno (ista dva prašiča kot pri prejšnjem odvzemenu), 18 nizko pozitivno, 30 pozitivno in 83 visoko pozitivno. Lastnik je v naslednjih mesecih znatno zmanjšal število plemenskih prašičev s 134 na 88. Šest mesecev po II. serumizaciji smo ponovno preiskali vseh 88 plemenskih prašičev in ugotovili 35 visoko pozitivnih, 39 pozitivnih in 12 nizko pozitivnih. V dveh vzorcih nismo dokazali protiteles, vzorca pa nista pripadala istima dvema prašičema, pri katerih nismo dokazali protiteles pri prejšnjem testiranju. Skupaj s plemenskimi prašiči smo odvzeli vzorce krvi še 10 tekačem in 10 pitancem. V ELISA so 3 vzorci reagirali nizko pozitivno, 7 pozitivno in 6 visoko pozitivno, pri 4 pitancih nismo dokazali protiteles. Osem mesecev po drugi serumizaciji smo preiskali vzorce 9 plemenskih prašičev in 10 pitancev. Pri plemenskih prašičih smo protitelesa dokazali pri vseh 9 prašičih (5 pozitivnih in 4 visoko pozitivne), pri pitancih pa v enem vzorcu nismo dokazali protiteles, 7 jih je reagiralo pozitivno in 2 visoko pozitivno. Deset mesecev po II. serumizaciji smo preiskali kri 20 plemenskih prašičev in 30 prašičev. Ugotovili smo 4 nizko pozitivne vzorce, 10 pozitivnih in 6 visoko pozitivnih. Pri pregledu krvi 30 prašičev (20 tekačev in 10 pitancev) smo z ELISA ugotovili, da sta 2 reagirala negativno, 7 nizko pozitivno, 9 pozitivno in 12 visoko pozitivno. Približno leto dni po II. serumizaciji je lastnik prestavil v plemensko čredo 9 lastnih mladic. Trinajst mesecev po II. serumizaciji smo preiskali 97 plemenskih prašičev in ugotovili, da so v ELISA 3 vzorci reagirali negativno, 24 nizko pozitivno, 45 pozitivno in 25 visoko pozitivno.

Rezultati testiranja 13 pitancev so pokazali, da je 1 vzorec reagiral negativno, 4 nizko pozitivno, 7 pozitivno in 1 visoko pozitivno. Sedemnajst mesecev po II. serumizaciji smo ugotovili, da sta 2 vzorca v ELISA reagirala negativno, 4 nizko pozitivno, 7 pozitivno in 12 visoko pozitivno.

Tabela 19: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 5.

Table 19: The ELISA results of detection of PRRS virus antibodies on Farm 5.

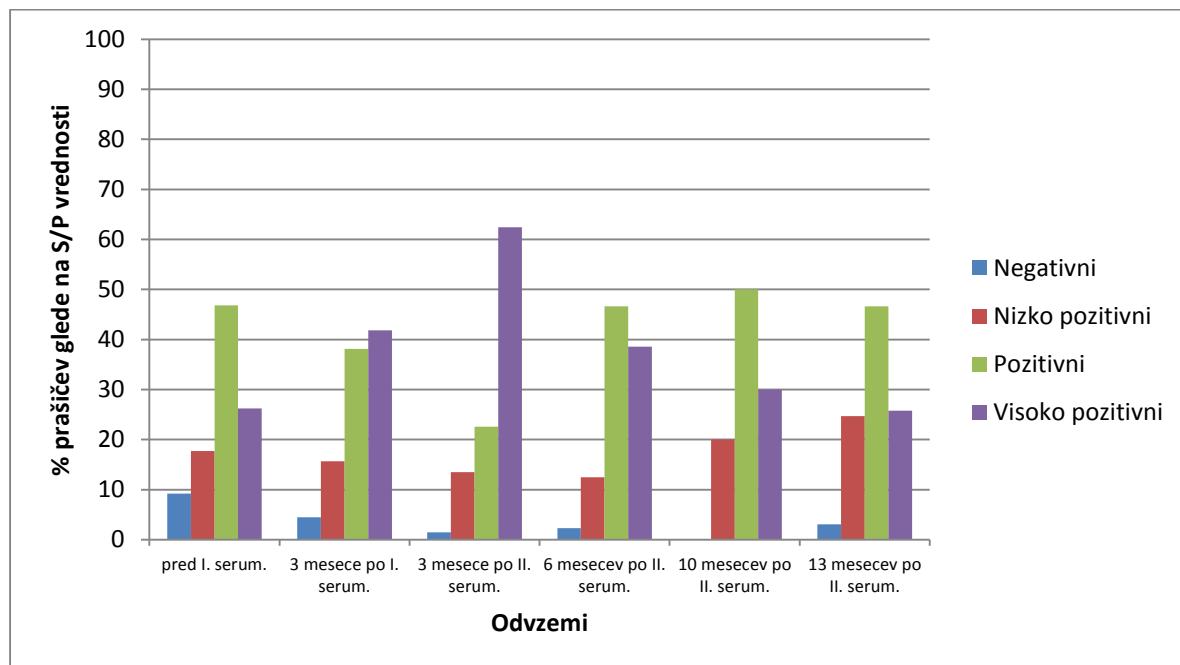
Vzorčenje	Skupno število testiranih prašičev		Število negativnih prašičev		Število nizko pozitivnih prašičev		Število pozitivnih prašičev		Število visoko pozitivnih prašičev	
	plemenski prašič	prašič	pleemenski prašič	prašič	pleemenski prašič	prašič	pleemenski prašič	prašič	pleemenski prašič	prašič
Ugotovitev PRRS	5	5	0	0	0	0	3	0	2	5
Pred I. serumizacijo	134	/	13	/	24	/	43	/	54	/
3 mesece po I. serumizaciji	134	/	6	/	21	/	51	/	56	/
3 mesece po II. serumizaciji	133	/	2	/	18	/	30	/	83	/
6 mesecev po II. serumizaciji	88	20	2	4	12	3	39	7	35	6
8 mesecev po II. serumizaciji	9	10	0	1	0	0	5	7	4	2
10 mesecev po II. serumizaciji	20	30	0	2	4	7	10	9	6	12
13 mesecv po II. serumizaciji	97	13	3	1	24	4	45	7	25	1
17 mesecev po II. serumizaciji	/	25	0	2	0	4	0	7	0	12

Legenda: v stolpcu »prašič« so zajete kategorije od tekačev do pitancev.

Negativni (vrednosti S/P pod 0,4), nizko pozitivni prašiči (vrednosti S/P med 0,4 in 1), pozitivni prašiči (vrednosti S/P med 1 in 2), visoko pozitivni prašiči (vrednosti S/P več kot 2).

Graf 13: Prikaz rezultatov ELISA za plemenske prašiče na farmi 5.

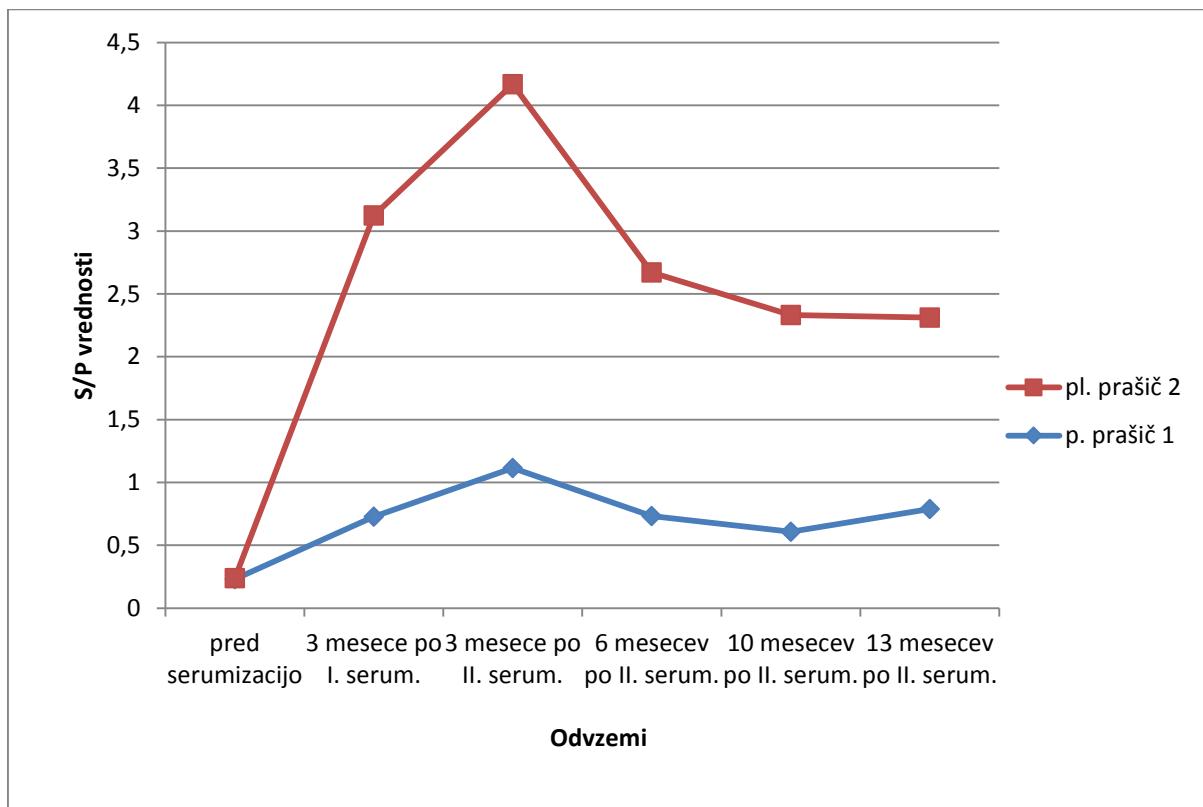
Graph 13: The ELISA results of the breeding pigs on Farm 5.



Pred izvedbo serumizacije je delež negativnih plemenskih prašičev znašal 9,2 %, nizko pozitivnih 17,7 %, pozitivnih 46,8 % ter visoko pozitivnih 26,2 % (graf 13). Tri mesece po I. serumizaciji smo ugotovili, da se je zvišal odstotek visoko pozitivnih plemenskih prašičev na 41,8 %, tri mesece po II. serumizaciji se je zvišal odstotek visoko pozitivnih plemenskih prašičev na 62,4. Pri vseh nadaljnjih odvzemih 6, 10 in 13 mesecev po II. serumizaciji se je odstotek visoko pozitivnih plemenskih prašičev zniževal.

Graf 14: Prikaz vrednosti S/P pri posameznih plemenskih prašičih, ki so pred serumizacijo reagirali negativno v ELISA.

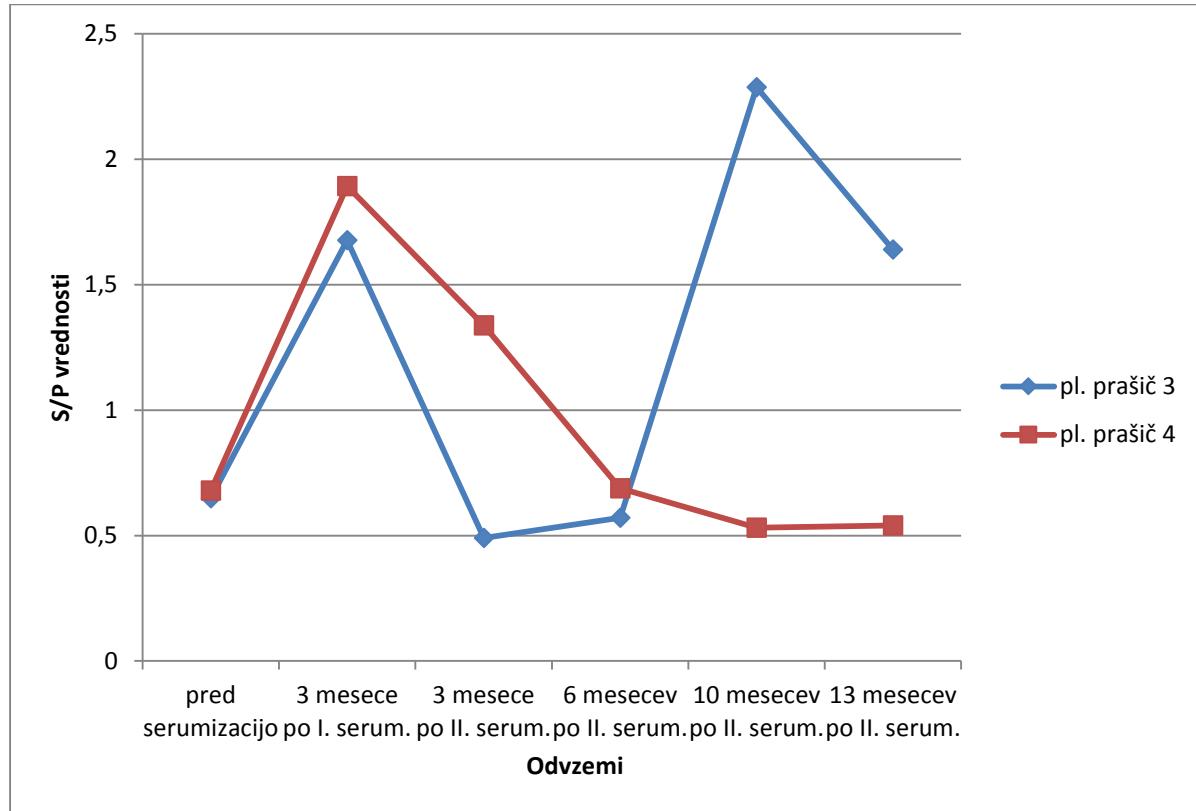
Graph 14: S/P values for individual breeding pig that reacted negative in ELISA before serumization.



Pri primerjavi vrednosti S/P pri 2 plemenskih prašičih smo ugotovili, da je vrednost S/P pri obeh narasla 3 mesece po I. serumizaciji in 3 mesece po II. serumizaciji. Šest mesecev po II. serumizaciji smo pri obeh plemenskih prašičih ugotovili znižanje vrednosti S/P glede na prejšnje odvzeme (graf 14).

Graf 15: Prikaz vrednosti S/P pri posameznih plemenskih prašičih, ki so pred serumizacijo reagirali nizko pozitivno v ELISA.

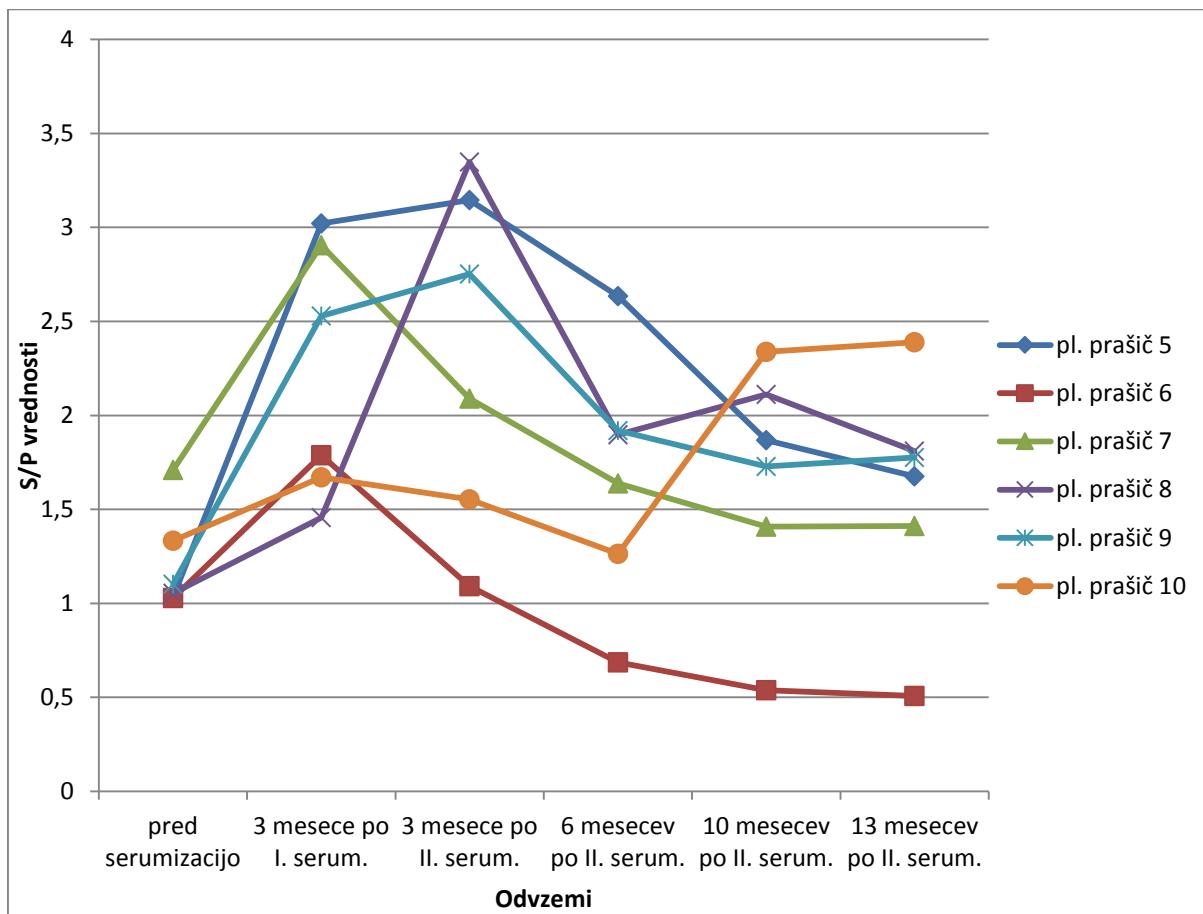
Graph 15: S/P values for individual breeding pig that reacted low positive in ELISA before serumization.



Pri primerjavi vrednosti S/P pri 2 plemenskih prašičih smo ugotovili, da je vrednost S/P pri obeh narasla 3 mesece po izvedeni I. serumizaciji. Šest mesecev po II. serumizaciji smo pri obeh vzorcih ugotovili vrednosti S/P okrog 0,5, nato pa se je vrednost S/P pri plemenskem prašiču 3 zvišala 10 mesecev po serumizaciji, medtem ko se je pri plemenskem prašiču 4 vrednost S/P znižala (graf 15).

Graf 16: Prikaz vrednosti S/P pri posameznih plemenskih prašičih, ki so pred serumizacijo reagirali pozitivno v ELISA.

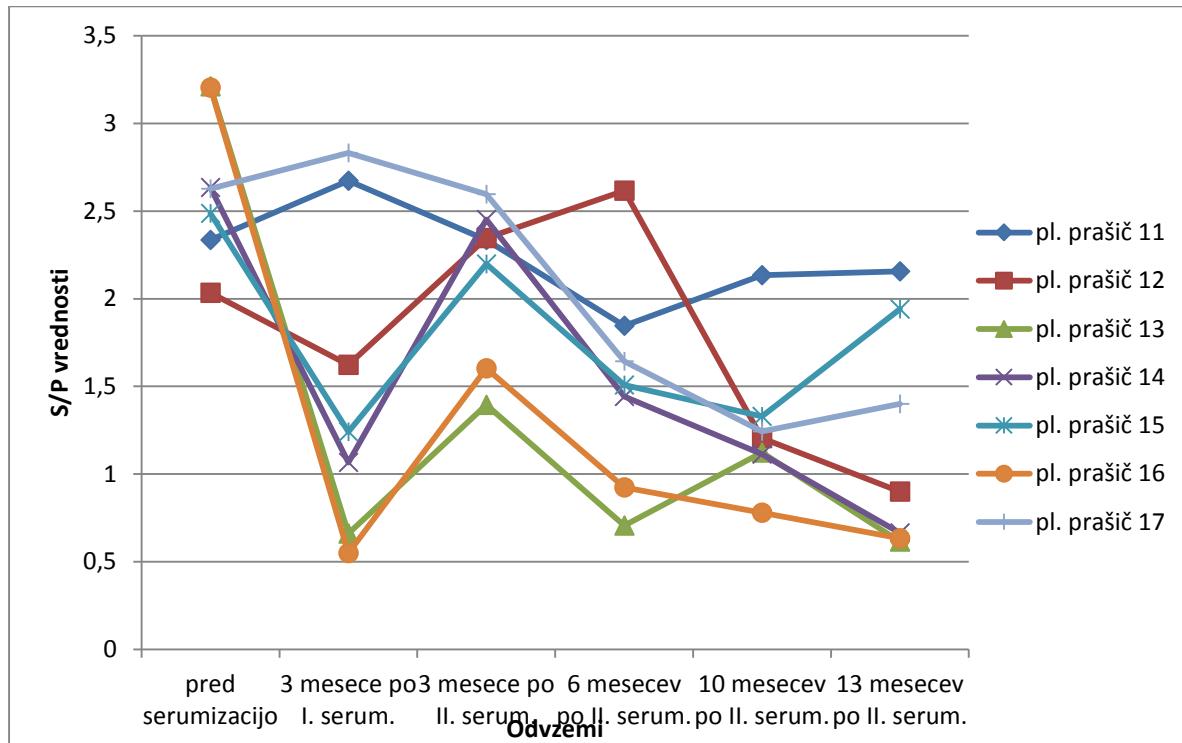
Graph 16: S/P values for individual breeding pig that reacted positive in ELISA before serumization.



Primerjava vrednosti S/P pri 6 plemenskih prašičih je pokazala, da so se vrednosti S/P 3 mesece po I. serumizaciji pri vseh plemenskih prašičih zvišale. Šest mesecev po II. serumizaciji smo pri vseh 6 plemenskih prašičih ugotovili nižje vrednosti S/P glede na prejšnji odvzem. Pri plemenskem prašiču št. 10 pa smo 10 mesecev po II. serumizaciji zabeležili zvišanje vrednosti S/P (graf 16).

Graf 17: Prikaz vrednosti S/P pri posameznih plemenskih prašičih, ki so pred serumizacijo reagirali visoko pozitivno v ELISA.

Graph 17: S/P values for individual breeding pig that reacted high positive in ELISA before serumization.



Pri primerjavi vrednosti S/P pri 7 plemenskih prašičih smo ugotovili, da so se vrednosti S/P 3 mesece po I. serumizaciji pri 5 plemenskih prašičih znižale, pri dveh je vrednost narasla (pl. prašič 11 in 17). Pri vseh 5 vzorcih, pri katerih smo 3 mesece po I. serumizaciji ugotovili nižje vrednosti S/P, smo pri vzorčenju 3 mesece po II. serumizaciji ugotovili višje vrednosti S/P kot pri predhodnem odvzemenu. Pri dveh plemenskih prašičih, pri katerih smo 3 mesece po I. serumizaciji ugotovili višje vrednosti S/P, pa smo 3 mesece po II. serumizaciji ugotovili nižje vrednosti S/P. Trinajst mesecev po serumizaciji smo pri plemenskem prašiču št. 15 ugotovili višjo vrednost S/P glede na predhodni odvzem (graf 17).

4.5.2 Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 5

4.5.2.1 Spreminjanje povprečnih vrednosti S/P v plemenski čredi v zaporednih odvzemih na farmi 5

Statistično značilna razlika je med drugim in tretjim odvzemom ter med drugim in petim odvzemom (tabela 20). Iz tabele je razvidno, da so povprečne vrednosti S/P naraščale do 3. meseca po II. serumizaciji, pri nadalnjih vzorčenjih pa so se znižale (tabela 20). Tri mesece po drugi serumizaciji je bila najvišja S/P vrednost 4,256, kar je bila tudi najvišja S/P vrednost vseh odvzemov (graf 18).

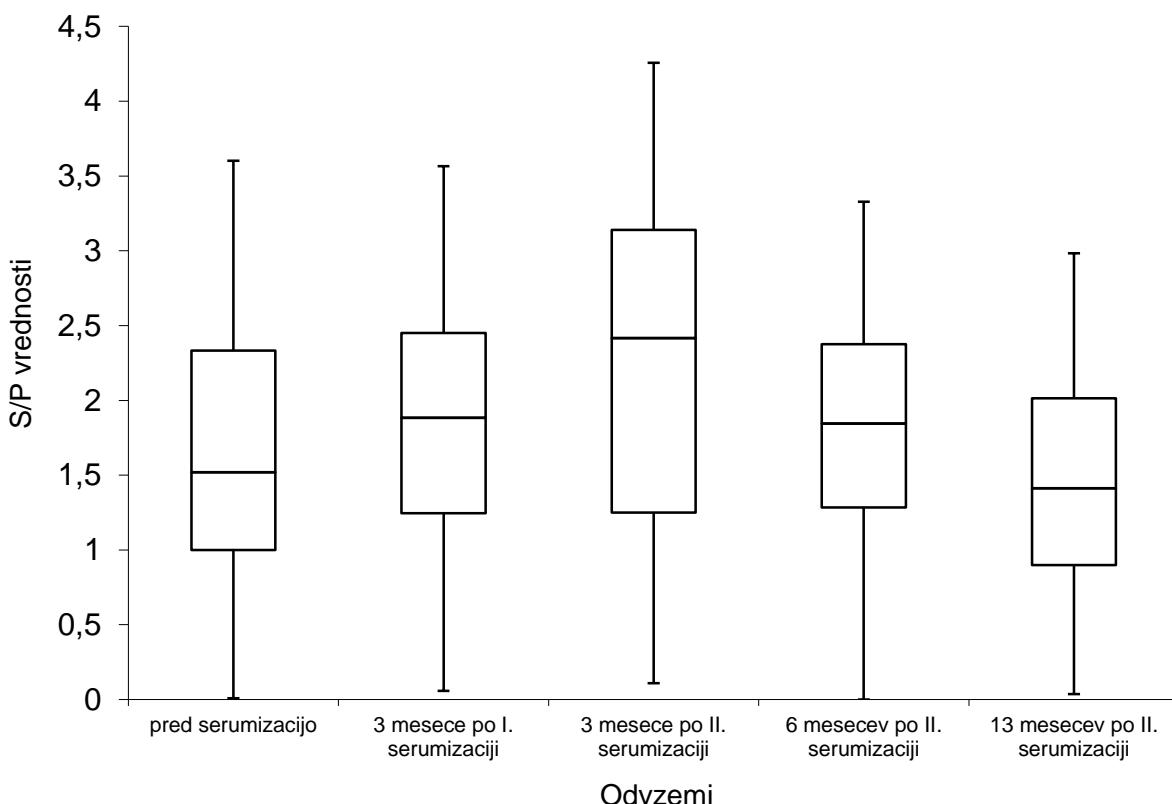
Tabela 20: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P 3 mesece po I. serumizaciji) za farmo 5.

Table 20: Least square means for S/P value with standard errors and significance of differences between successive sampling (comparison with S/P values 3 months after I. serumization) for Farm 5.

Odvzem	povprečje S/P	Standardna napaka	P-vrednost
pred serumizacijo	1,639	± 0,077	0,293
3 mesece po I. serumizaciji	1,820	± 0,077	
3 mesece po II. serumizaciji	2,307	± 0,077	< 0,0001
6 mesecev po II. serumizaciji	1,801	± 0,092	0,999
13 mesecev po II. serumizaciji	1,456	± 0,089	0,0078

Graf 18: Prikaz vrednosti S/P med posameznimi odvzemi pri plemeniskih prašičih na farmi 5.

Graph 18: S/P changing between each sampling in breeding pigs on Farm 5.



Stolpci prikazujejo mediano, minimalno in maksimalno vrednost, spodnjo in zgornjo četrtino rezultatov ter srednjih 50 % vrednosti v posamezni skupini.

4.5.3 Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 5

4.5.3.1 Dokaz nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 5

Za potrebe serumizacije smo odvzeli krvne vzorce 15 tekačem v starosti 6, 8 in 10 tednov. Individualne vzorce smo preiskali z metodo RT-PCR in pozitivne vzorce uporabili za pripravo inokuluma, s katerim smo izvedli serumizacijo. Za drugo serumizacijo (tri mesece po I. serumizaciji) smo odvzeli krvne vzorce 15 tekačem starim 8, 10 in 12 tednov. Serumske vzorce v katerih smo ugotovili nukleinsko kislino virusa PRRS smo združili v inokulum in ga uporabili za II. serumizacijo (tabela 21). Tri mesece po II. serumizaciji smo pregledali celotno plemensko čredo in pri plemeniskih prašičih nismo dokazali virusne nukleinske kisline virusa PRRS. Pet mesecev po II. serumizaciji smo preiskali 7 mladic, pri nobeni nismo dokazali prisotnosti virusa PRRS. Šest mesecev po II. serumizaciji pri nobenem plemenskem prašiču nismo dokazali virusa,

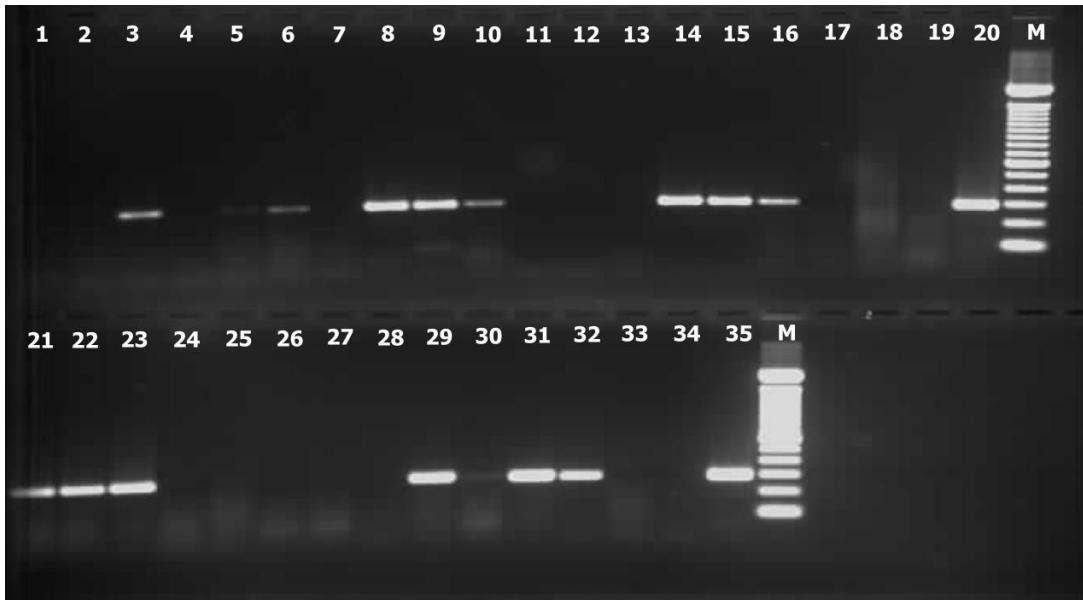
pri odstavljenih v starosti 6, 8 in 10 tednov pa smo dokazali virusno nukleinsko kislino virusa PRRS. Deset mesecev po II. serumizaciji smo preiskali 20 plemenskih prašičev in 20 tekačev ter 10 pitancev. Virusu nismo dokazali pri plemenskih prašičih ter 6-tedenskih tekačih in 14-tedenski pitancih, nukleinsko kislino virusa PRRS pa smo dokazali pri 10-tedenskih tekačih. Trinajst mesecev po II. serumizaciji nismo ugotovili virusne nukleinske kisline pri plemenskih prašičih, podobno kot pri prejšnjem odvzemu pa smo nukleinsko kislino virusa PRRS dokazali pri 10-tedenskih tekačih. Štirinajst mesecev po II. serumizaciji smo pregledali 7 plemenskih mladic, ki so bile v skupini pitancev. Pri pregledanih mladicah nismo dokazali virusa. Sedemnajst mesecev po II. serumizaciji smo preiskali 10 pitancev in 15 tekačev, pri 6 in 10-tedenskih tekačih smo dokazali nukleinsko kislino virusa PRRS.

Tabela 21: Rezultati RT-PCR na farmi 5.

Table 21: Results of RT-PCR on Farm 5.

Testiranje	Skupno število	Število vzorcev						Rezultati					
		pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t	pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t
pred serumizacijo	15	np	5	5	5	np	np	np	poz	poz	poz	np	np
3 mesece po I. serumizaciji	15	np	np	5	5	5	np	np	poz	poz	poz	poz	np
3 mesece po II. serumizaciji	133	133	np	np	np	np	np	neg	np	np	np	np	np
5 mesecev po II. serumizaciji	7	7	np	np	np	np	np	neg	np	np	np	np	np
6 mesecev po II. serumizaciji	108	88	1	4	5	9	1	neg	poz	poz	poz	neg	neg
10 mesecev po II. serum.	50	20	10	np	10	np	10	neg	neg	np	poz	np	neg
13 mesecev po II. serumizaciji	110	97	4	np	4	np	5	neg	neg	np	poz	np	neg
14 mesecev po II. serumizaciji	7	7	np	np	np	np	np	neg	np	np	np	np	np
17 mesecev po II. serumizaciji	25	np	5	np	5	5	10	np	poz	np	poz	neg	neg

Legenda: pl. p – plemenski prašiči, t – starost v tednih, neg – negativno, poz – pozitivno, np – ni pregledano



Slika 13: Analiza produktov RT-PCR v ORF7 z elektroforezo v agaroznem gelu.

Figure 13: Analysis of RT-PCR product in ORF7 with electrophoresis in agarose gel.

Specifična velikost produkta pri pozitivnih vzorcih je okrog 300 nukleotidov (slika 13). Zgornji del slike: 1 do 18; preiskovani vzorci s farme 5, 19 - negativna kontrola, 20 - pozitivna kontrola. M – lestvica označevalca velikosti produktov RT-PCR, velikost naraščanja lestvice po 100 nukleotidov.

Spodnji del slike: 21 do 33; preiskovani vzorci s farme 6, 34 - negativna kontrola, 35 - pozitivna kontrola. M – lestvica označevalca velikosti produktov RT-PCR, velikost naraščanja lestvice po 100 nukleotidov.

4.5.3.2 Rezultati določanja nukleotidnega zaporedja na farmi 5

Na farmi 5 smo v letih od 2010 do 2012 določali nukleotidno zaporedje pri 15 pozitivnih vzorcih v katerih smo z metodo RT-PCR dokazali prisotnost nukleinske kisline virusa PRRS. Pri primerjavi 258 nukleotidov v odseku gena, ki kodira protein nukleokapside (ORF 7), smo ugotovili, da odstotek identičnosti nukleotidov med 15 vzorci znaša od 96,1 do 100. Razvrstitev posameznih pozitivnih vzorcev s farme 5 je na filogenetskem drevesu pokazala dve ločeni genetski skupini, med katerima smo ugotovili od 96,1 do 98,4 % identičnosti nukleotidov. V

prvo skupino so se uvrstili vzorci z oznakami 1/2010, 2/2010, 1/2011, 2/2011, 9/2011, 10/2011, 1/2012, 1/2012, identičnost nukleotidov med njimi pa je znašala od 99,2 do 100 %. V drugo genetsko skupino so se uvrstili vzorci z oznakami 3/2010, 3/2011, 4/2011, 5/2011, 6/2011, 7/2011, 8/2011, identičnost nukleotidov med njimi pa je znašala od 97,7 do 100 %. V reji 5 smo I. serumizacijo opravili z inokulumom, ki spada v prvo genetsko skupino (1/2010, 2/2010). Z določanjem nukleotidnega zaporedja v vzorcu inokuluma za II. serumizacijo smo ugotovili prisotnost virusa, ki je uvrščen v drugo genetsko skupino. Identičnost 258 nukleotidov med obema inokuloma je znašala 98,4 %. Šest mesecev po II. serumizaciji smo ugotovili prisotnost sevov iz obeh genetskih skupin, 10 mesecev po II. serumizaciji smo ugotovili prisotnost druge genetske skupine, 13 in 17 mesecev po II. serumizaciji pa prisotnost prve genetske skupine. Pri primerjavi nukleotidnih zaporedij sevov s farme 5 (1/2010, 2/2010, 3/2010, 1/2011, 2/2011, 3/2011, 4/2011, 5/2011, 6/2011, 7/2011, 8/2011, 9/2011, 10/2011, 1/2012, 1/2012) in nukleotidnega zaporedja referenčnega vzorca Lelystad smo ugotovili od 88,4 do 89,9 % identičnost nukleotidov (slika 20).

4.5.4 Biovarnostni ukrepi na farmi 5

4.5.4.1 Izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 5

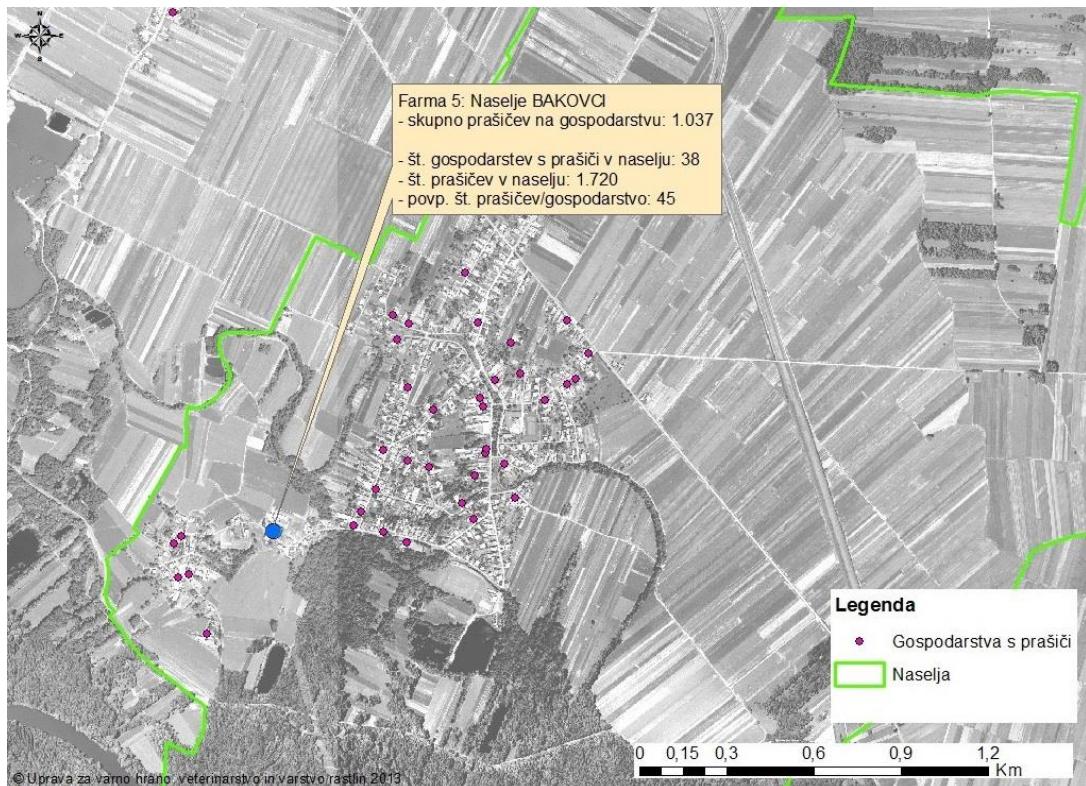
Farma 5 je v naselju Bakovci (slika 14). Najbližja farma je oddaljena približno 300 m, v radiju 1,2 kilometra pa je bilo še 37 prašičjih farm, pri katerih statusa glede PRRS nismo poznali. V naselju je bilo 1.720 prašičev v 38 gospodarstvih. Po ugotovitvi PRRS na farmi se je rejec obvezal, da bo izvajal predpisane biovarnostne ukrepe (tabela 22). V trimesečnem obdobju od začetka izvajanja ukrepov rejec ni dodajal novih plemenskih prašičev v plemensko čredo, po tem obdobju pa je dodajal lastne in kupljene mladice in s tem prekršil enega od dogovorjenih biovarnostnih ukrepov. Za oploditev so uporabljali seme lastnih merjascev. Farma je imela kategorije prašičev v ločenih prostorih. Prašiče so oskrbovali tako domači kot tudi zunanji delavci. Vsak je imel svojo obleko in obutev, dela pa niso imeli razdeljenega tako, da bi vsak posamezni delavec oskrboval vedno isto kategorijo prašičev. Kljub našemu nasvetu se niso odločili za izvajanje sistema reje »all in/all out«. Ves čas študije so uporabljali dezinfekcijske bariere. Bolnih prašičev niso imeli v ločenem prostoru. Izvajali so dezinsekcijo in deratizacijo.

Tabela 22: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 5.

Table 22: Required and implemented biosecurity measures on Farm 5.

Biovarnostni ukrepi na farmi	Izvajanje biovarnostnih ukrepov na farmi					
	Pred serumizacijo	3 mesece po I. serumizaciji	3 mesece po II. serumizaciji	6 mesecev po II. serumizaciji	10 mesecev po II. serumizaciji	13 mesecev po II. serumizaciji
Farma oddaljena več kot 300 m od najbližje farme	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Znan PRRS status najbližje farme	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Dvojna zapora	ne	da	ne	ne	ne	ne
Uporaba preverjeno negativnega semena	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Kategorije prašičev ločene po prostorih	da	da	da	da	da	da
Preoblačenje in preobuvanje delavcev	ne	ne	ne	ne	ne	ne
All in/all out sistem reje	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Razkuževalne bariere	da	da	da	da	da	da
Ločen prostor za bolne prašiče	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Deratizacija in dezinsekcija	da	da	da	da	da	da

4.5.4.2 Satelitski posnetek lokacije farme 5 v naselju in oddaljenost od drugih farm



Slika 14: Prikaz lokacije farme 5 in sosednjih gospodarstev s prašiči.

Figure 14: Location of Farm 5 and neighbouring pig farms.

4.6 REZULTATI S FARME 6

4.6.1 Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 6

Na farmi 6 smo izvajali eliminacijo PRRS s serumizacijo. S prvim vzorčenjem 5 plemenskih prašičev in 5 pitancev smo na farmi ugotovili protitelesa, pri 3 plemenskih prašičih, ki so v ELISA reagirali pozitivno in 2 visoko pozitivno. Vsi testirani pitanci so v ELISA reagirali pozitivno (tabela 23). Tri mesece pred izvedbo serumizacije smo odvzeli krvne vzorce vsem 50 plemenskim prašičem. V ELISA je reagiralo nizko pozitivno 10 plemenskih prašičev, 24 pozitivno in 12 visoko pozitivno, v 4 vzorcih plemenskih prašičev nismo dokazali protiteles proti virusu PRRS. Skupaj s plemenskimi prašiči smo odvzeli vzorce še pri 6 pitancih. V ELISA sta 2 vzorca reagirala pozitivno in 4 visoko pozitivno. Pred izvedbo serumizacije so v plemensko čredo dodali še 12 mladic, ki smo jih serumizirali hkrati s plemensko čredo. Tri mesece po serumizaciji smo preiskali vseh 62 plemenskih prašičev in ugotovili, da so v ELISA 3 vzorci reagirali negativno (vzorci drugih prašičev kot v predhodnem testiranju), 11 nizko pozitivno, 21 pozitivno in 27 visoko pozitivno. Rejec je v naslednjih mesecih izločil 10 plemenskih prašičev, tako je ob odvzemuh krvi 6 mesecev po serumizaciji celotna plemenska čreda štela 52 plemenskih prašičev. Šest mesecev po serumizaciji smo preiskali vseh 52 plemenskih prašičev in ugotovili 5 negativnih (drugi prašiči kot iz predhodnih dveh testiranj), 13 nizko pozitivnih, 16 pozitivnih in 18 visoko pozitivnih. Hkrati smo preiskali še vzorce 30 prašičev (20 tekačev in 10 pitancev) ter ugotovili, da je v ELISA 5 vzorcev reagiralo negativno, 9 nizko pozitivno, 11 pozitivno in 5 visoko pozitivno. V naslednjih mesecih je rejec ponovno izločil še 9 plemenskih prašičev. Devet mesecev po serumizaciji smo pregledali vseh 43 plemenskih prašičev in 26 prašičev (20 tekačev in 6 pitancev). Pri 5 plemenskih prašičih nismo ugotovili protiteles. Vzorci so pripadali istim plemenskim prašičem kot pri vzorčenju 6 mesecev po serumizaciji. Ugotovili smo tudi 4 nizko pozitivne plemenske prašiče, 19 pozitivnih in 15 visoko pozitivnih. Pri pregledu krvi 26 prašičev smo z ELISA ugotovili, da jih je 6 reagiralo nizko pozitivno, 6 pozitivno in 14 visoko pozitivno. Dvanajst mesecev po serumizaciji smo preiskali 43 plemenskih prašičev in ugotovili, da je 6 vzorcev reagiralo negativno (5 prašičev istih kot pri predhodnih testiranjih), 8 nizko pozitivno, 19 pozitivno ter 10 visoko pozitivno. Rezultati testiranja 31 prašičev (26 tekačev in 5 pitancev) so pokazali, da je 20 vzorcev reagiralo negativno, 7 nizko pozitivno in 4 pozitivno.

Tabela 23: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 6.

Table 23: The ELISA results of detection of PRRS virus antibodies on Farm 6.

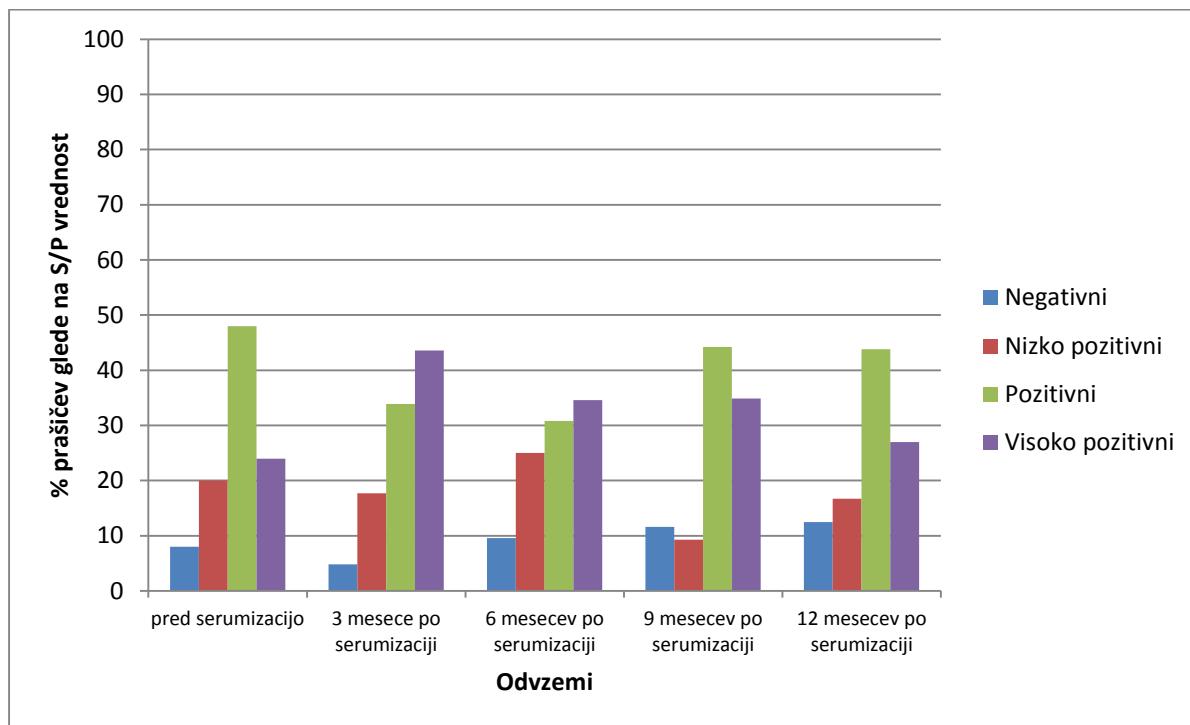
Vzorčenje	Skupno število testiranih prašičev		Število negativnih prašičev		Število nizko pozitivnih prašičev		Število pozitivnih prašičev		Število visoko pozitivnih prašičev	
	plemenski prašiči	prašiči	pleemenski prašiči	prašiči	pleemenski prašiči	prašiči	pleemenski prašiči	prašiči	pleemenski prašiči	prašiči
Ugotovitev PRRS	5	5	0	0	0	0	3	5	2	0
Pred serumizacijo	50	6	4	0	10	0	24	2	12	4
3 mesece po serumizaciji	62	/	3	/	11	/	21	/	27	/
6 mesecev po serumizaciji	52	30	5	5	13	9	16	11	18	5
9 mesecev po serumizaciji	43	26	5	0	4	6	19	6	15	14
12 mesecev po serumizaciji	43	31	6	20	8	7	19	4	10	0

Legenda: v stolpcu »prašiči« so zajete kategorije od tekačev do pitancev.

Negativni (vrednosti S/P pod 0,4), nizko pozitivni prašiči (vrednosti S/P med 0,4 in 1), pozitivni prašiči (vrednosti S/P tmed 1 in 2), visoko pozitivni prašiči (vrednosti S/P več kot 2).

Graf 19: Prikaz rezultatov ELISA za plemenske prašiče na farmi 6.

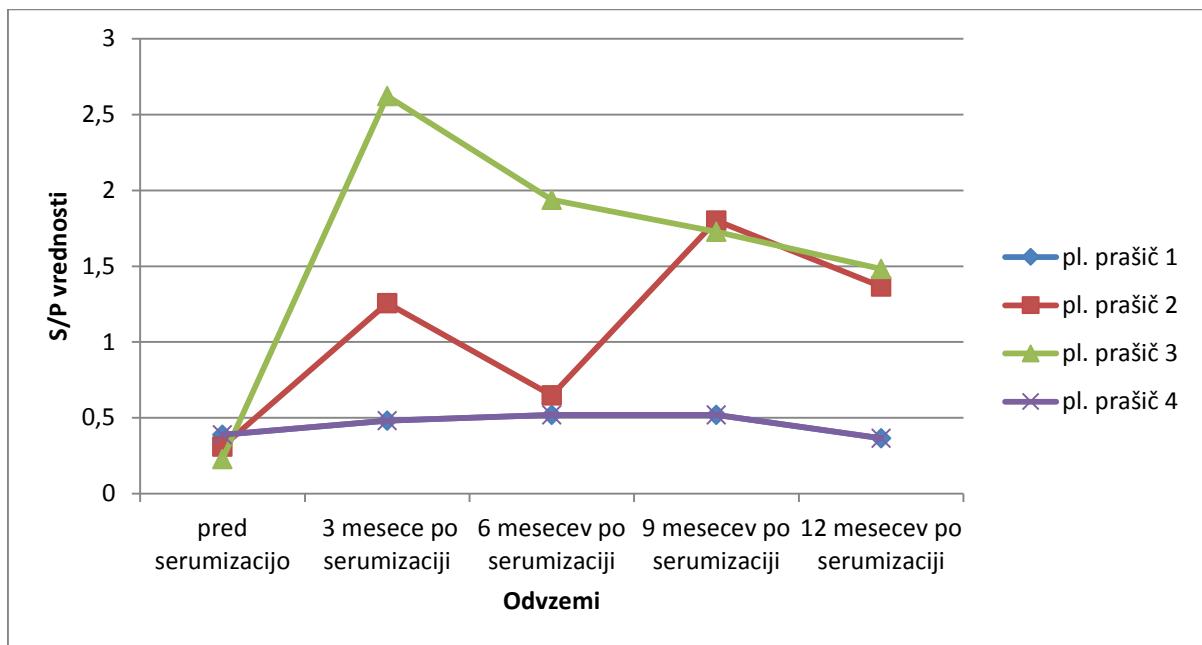
Graph 19: The ELISA results of the breeding pigs on Farm 6.



Pred izvedbo serumizacije smo v plemenski čredi ugotovili 8 % na protitelesa negativnih prašičev, preostalih 20 % je v ELISA reagiralo nizko pozitivno, 48 % pozitivno in 24 % visoko pozitivno (graf 19). Tri mesece po serumizaciji se je odstotek prašičev z visokimi vrednostmi S/P zvišal na 43,6, odstotek pozitivnih plemenskih prašičev se je znižal na 33,9, nizko pozitivnih na 17,7 ter odstotek negativnih na 4,8. Šest mesecev po serumizaciji se je znižal odstotek visoko pozitivnih plemenskih prašičev na 34,6 in pozitivnih na 30,8, povišal pa se je odstotek nizko pozitivnih plemenskih prašičev na 25 ter negativnih na 9,6. Devet mesecev po serumizaciji je ostal odstotek visoko pozitivnih na isti ravni, zvišal pa se je odstotek negativnih na 11,6 in pozitivnih na 44,2. Dvanajst mesecev po serumizaciji se je povišal odstotek negativnih plemenskih prašičev na 12,5 in nizko pozitivnih plemenskih prašičev na 16,7, znižal pa se je odstotek pozitivnih na 43,8 ter visoko pozitivnih plemenskih prašičev na 27.

Graf 20: Prikaz vrednosti S/P pri posameznih plemenskih prašičih, ki so pred serumizacijo reagirali negativno v ELISA.

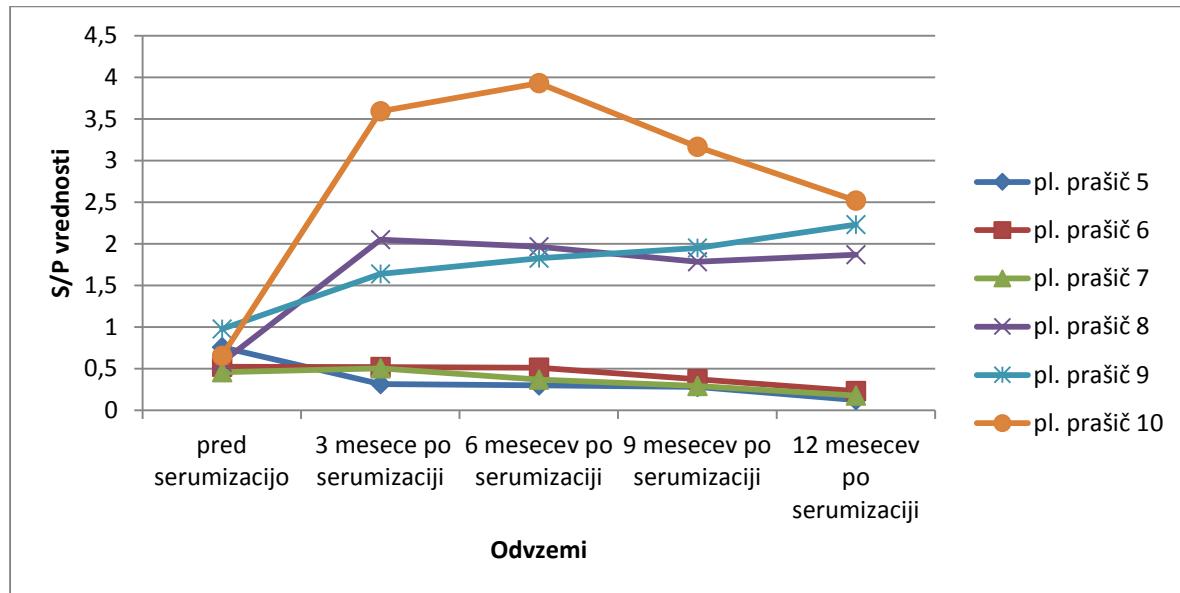
Graph 20: S/P values for individual breeding pig that reacted negative in ELISA before serumization.



Pri primerjavi vrednosti S/P pri 4 plemenskih prašičih smo ugotovili, da je vrednost S/P pri dveh narasla po izvedeni serumizaciji. Tri mesece po serumizaciji, pa smo pri obeh plemenskih prašičih ugotovili znižanje vrednosti S/P. Šest mesecev po serumizaciji smo pri enem plemenskem prašiču (pl. prašič 2) ugotovili zvišano vrednost S/P glede na prejšnji odvzem. Pri dveh plemenskih prašičih smo pri vseh petih vzorčenjih ugotovili vrednosti S/P okrog 0,5 (graf 20).

Graf 21: Prikaz vrednosti S/P pri posameznih plemenskih prašičih, ki so pred serumizacijo reagirali nizko pozitivno v ELISA

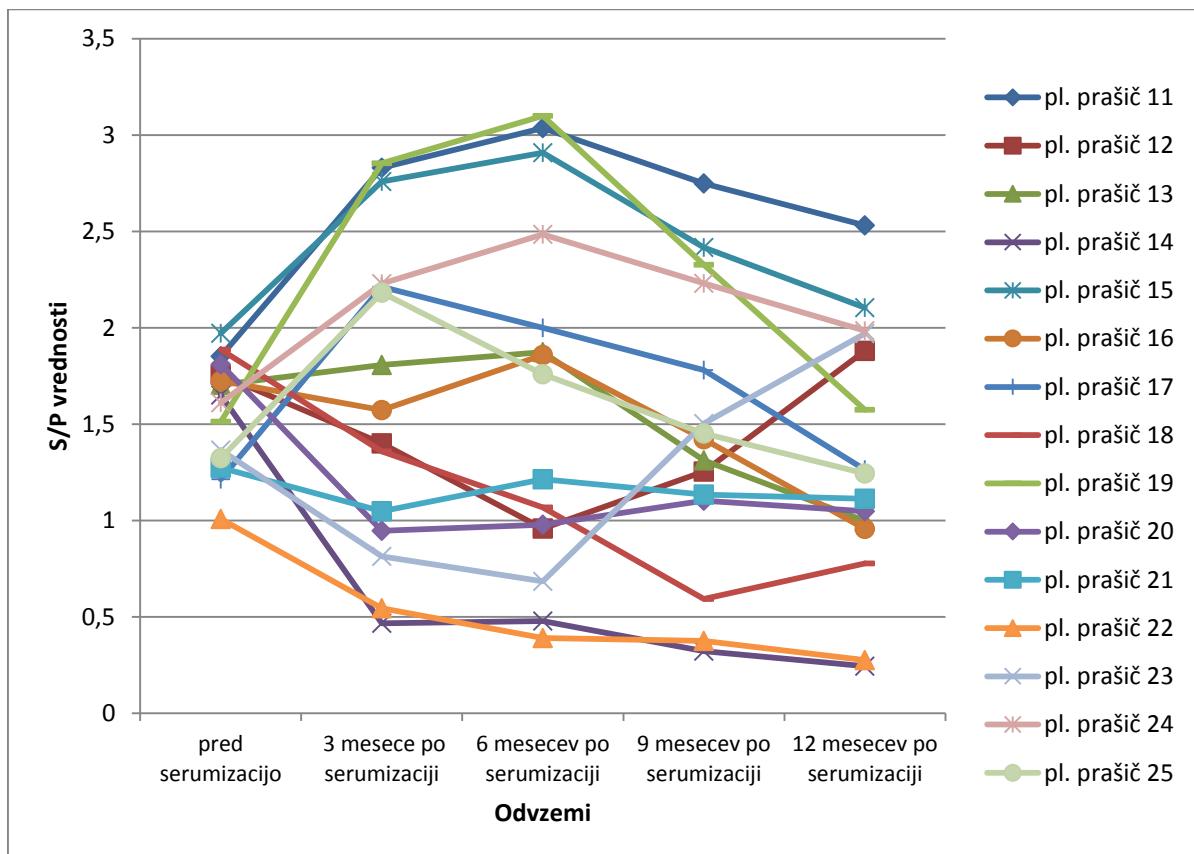
Graph 21: S/P values for individual breeding pig that reacted low positive in ELISA before serumization.



Pri primerjavi vrednosti S/P pri 6 plemenskih prašičih smo ugotovili, da je vrednost S/P pri treh narasla 3 mesece po serumizaciji. Pri treh plemenskih prašičih smo pri vseh petih vzorčenjih ugotovili vrednosti S/P okrog 0,5 (graf 21).

Graf 22: Prikaz vrednosti S/P pri posameznih plemenskih praščih, ki so pred serumizacijo reagirali pozitivno v ELISA

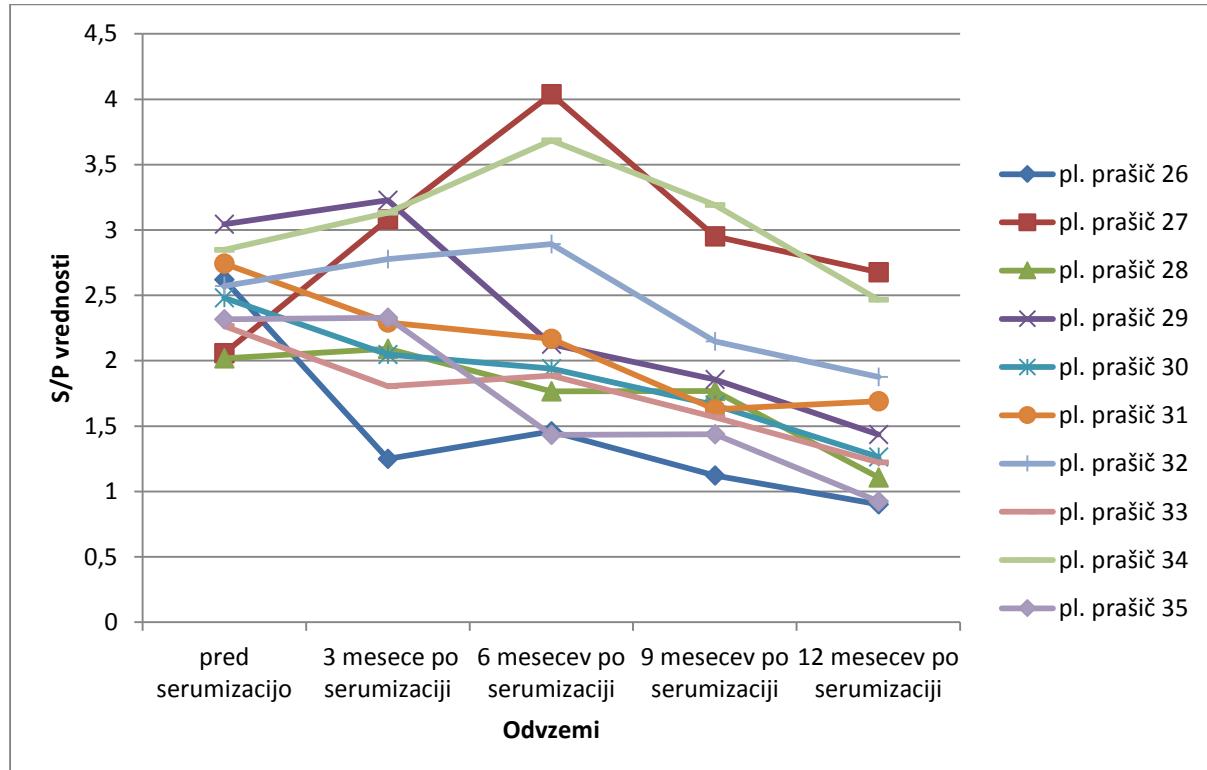
Graph 22: S/P values for individual breeding pig that reacted positive in ELISA before serumization.



Pri primerjavi vrednosti S/P pri 15 plemenskih praščih smo ugotovili, da je vrednost S/P pri 7 narasla 3 mesece po serumizaciji, pri 8 plemenskih praščih pa se je znižala. Pri dveh plemenskih praščih (pl. prašič 13 in 24) smo ob vzorčenju 9 mesecev in 12 mesecev po serumizaciji ugotovili naraščanje vrednosti S/P (graf 22).

Graf 23: Prikaz vrednosti S/P pri posameznih plemenskih prašičih, ki so pred serumizacijo reagirali visoko pozitivno v ELISA

Graph 23: S/P values for individual breeding pig that reacted high positive in ELISA before serumization.



Pri primerjavi vrednosti S/P pri 10 plemenskih prašičih smo ugotovili, da so vrednosti S/P 3 mesece po serumizaciji pri 4 plemenskih prašičih ostale podobne, pri dveh je vrednost narasla (pl. prašič 28 in 35), pri enem pa se je znižala (pl. prašič 27) (graf 23).

4.6.2 Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 6

4.6.2.1 Spreminjanje povprečnih vrednosti S/P v plemenski čredi v zaporednih odvzemih na farmi 6

Statistično značilne razlike med posameznimi odvzemi nismo ugotovili (tabela 24). Iz tabele 24 je razvidno, da so povprečne vrednosti S/P naraščale do 9 mesecev po serumizaciji, pri zadnjem odvzemu pa so se povprečne vrednosti S/P znižale na 1,486 (tabela 24).

Šest mesecev po serumizaciji smo ugotovili maksimalno vrednost S/P glede na vse odvzeme, ki je znašala 4,038 (graf 24).

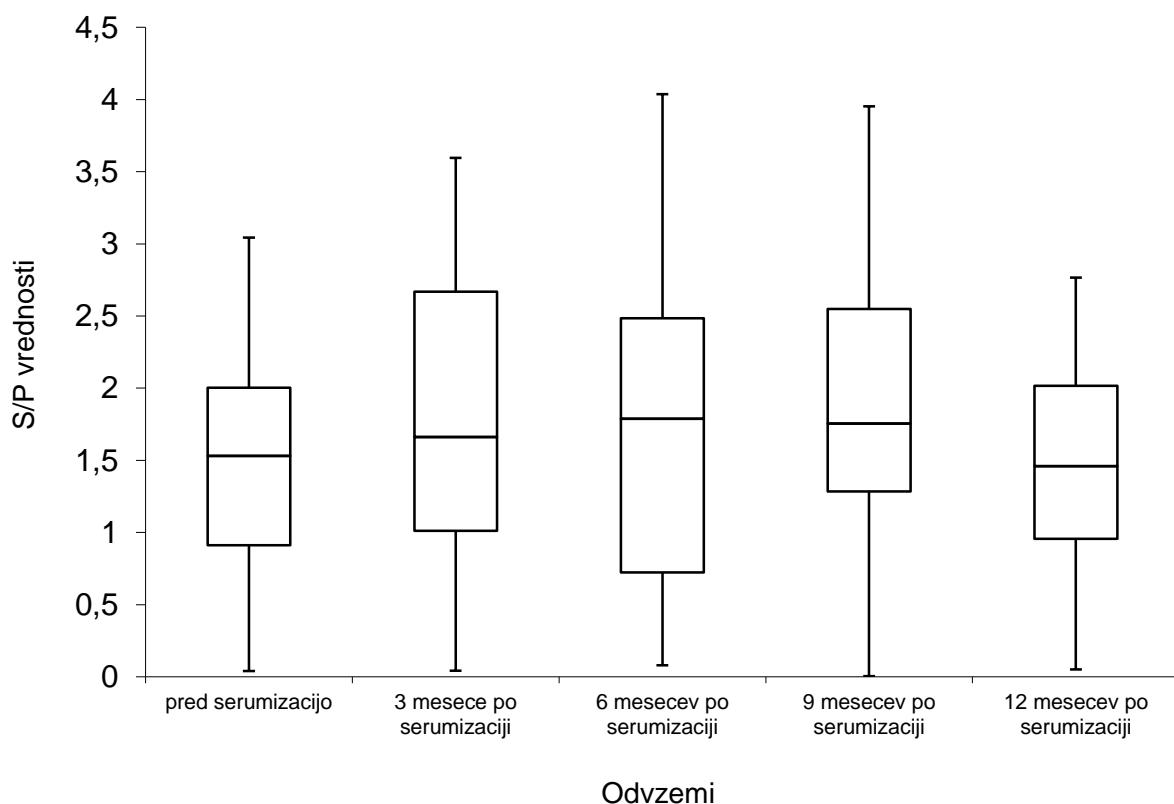
Tabela 24: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P pred serumizacijo) za farmo 6.

Table 24: Least square means for S/P value with standard errors and significance of differences between successive sampling (comparison with S/P value before serumization) for Farm 6.

Odvzem	povprečje S/P	Standardna napaka	P-vrednost
pred serumizacijo	1,499	± 0,32	
3 mesece po serumizaciji	1,779	± 0,118	0,323
6 mesecev po serumizaciji	1,759	± 0,128	0,423
9 mesecev po serumizaciji	1,803	± 0,142	0,331
12 mesecev po serumizaciji	1,486	± 0,135	1,0

Graf 24: Prikaz vrednosti S/P med posameznimi odvzemi pri plemenih prašičih na farmi 6.

Graph 24: S/P changing between each sampling in breeding pigs on Farm 6.



Stolpci prikazujejo mediano, minimalno in maksimalno vrednost, spodnjo in zgornjo četrtino rezultatov ter srednjih 50 % vrednosti v posamezni skupini.

4.6.3 Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 6

4.6.3.1 Dokaz nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 6

Za potrebe serumizacije smo odvzeli krvne vzorce 36 tekačem v starosti 6, 8, 10 in 12 tednov in jih pregledali z metodo RT-PCR. Nukleinsko kislino virusa PRRS smo dokazali pri vseh pregledanih tekačih (tabela 25). Iz individualnih serumskih vzorcev, v katerih smo dokazali nukleinsko kislino virusa PRRS, smo pripravili inokulum za serumizacijo. Tri mesece po serumizaciji smo z metodo RT-PCR preiskali serumske vzorce 62 plemenski prašičev. Pri nobenem nismo dokazali nukleinske kisline virusa PRRS. Šest mesecev po serumizaciji smo odvzeli krvne vzorce 52 plemenskim prašičem in 30 tekačem v starosti 6, 8, 12 ter pitancem v starosti 14 tednov. Nukleinske kisline virusa PRRS nismo dokazali pri plemenskih prašičih. Pri

tekačih starih 10 tednov pa smo potrdili nukleinsko kislino virusa PRRS. Devet mesecev po serumizaciji pri plemenskih prašičih nismo dokazali nukleinske kisline virusa PRRS, dokazali pa smo jo pri tekačih starih 10 in 12 tednov. Dvanajst mesecev po serumizaciji nismo dokazali nukleinske kisline virusa PRRS niti pri tekačih in pitancih niti pri plemenskih prašičih.

Tabela 25: Rezultati RT-PCR na farmi 6.

Table 25: Results of RT-PCR on Farm 6.

Testiranje	Skupno število	Število vzorcev						Rezultati					
		pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t	pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t
Pred serumizacijo	36	np	12	7	10	7	np	np	poz	poz	poz	poz	np
3 mesece po serumizaciji	62	62	np	np	np	np	np	neg	np	np	np	np	np
6 mesecev po serumizaciji	82	52	5	5	5	5	10	neg	neg	neg	poz	neg	neg
9 mesecev po serumizaciji	69	43	5	5	5	5	6	neg	neg	neg	poz	poz	neg
12 mesecev po serumizaciji	74	43	5	10	11	np	5	neg	neg	neg	neg	np	neg

Legenda: pl. p – plemenski prašiči, t – starost v tednih, neg – negativno, poz – pozitivno, np – ni pregledano

4.6.3.2 Rezultati določanja nukleotidnega zaporedja na farmi 6

Na farmi 6 smo v letih 2011 in 2013 določali nukleotidna zaporedja v 5 RT-PCR pozitivnih vzorcih, ugotovljenih pred serumizacijo ter 6 in 9 mesecev po izvedeni serumizaciji. Pri primerjavi 258 nukleotidov v odseku gena, ki kodira protein nukleokapside (ORF 7), smo ugotovili, da odstotek identičnosti med 5 vzorci znaša od 99,6 do 100. Pri primerjavi nukleotidnih zaporedij sevov s farme 6 (1/2011, 1/2012, 2/2012, 1/2013, 2/2013) in nukleotidnega zaporedja referenčnega vzorca Lelystad smo ugotovili od 93,0 do 93,4-odstotno identičnost nukleotidov (slika 20).

4.6.4 Biovarnostni ukrepi na farmi 6

4.6.4.1 Izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 6

Farma 6 je v naselju Spodnja Hajdina (slika 15). Najbližja farma, poznana kot pozitivna na PRRS, je oddaljena približno 300 m, v radiju 1,2 kilometra pa je bilo še 24 farm, izmed katerih je še ena farma poznano pozitivna na PRRS, statusa ostalih farm glede PRRS pa nismo poznali. V naselju je bilo 1.015 prašičev na 6 gospodarstvih. Po ugotovitvi PRRS na farmi se je rejec obvezal, da bo izvajal predpisane biovarnostne ukrepe (tabela 26). Ves čas naše študije rejec ni dodajal kupljenih prašičev na farmo, niti lastnih mladic v plemensko čredo. Za osemenjevanje je uporabljal seme iz osemenjevalnega središča prostega PRRS. Farma je imela ob pričetku kategorije prašičev v ločenih prostorih, vendar pa stene med kategorijami niso segale do stropa. Po našem priporočilu so namestili okna, ki so povsem ločila prostore. Zaprli so tudi vrata med prostori, ki so ostala zaprta ves čas študije. Dostop v prostore so uredili skozi druga vrata, ki so vodila od zunaj naravnost v prostor posamezne kategorije. Ob našem prihodu sta si delo delila dva družinska člana, ki pa sta oskrbovala vse kategorije. Po naših priporočilih sta nato imela zadolžitve vsak pri svoji kategoriji prašičev, redno sta tudi menjavala obleko in čistila obutev. Dostop v čakališče, v porodnišnico in v dva prostora, kjer so vhlevljeni tekači, je ostajal skupen (pokrit prostor), vendar pa je bila pred posameznimi vhodi nameščena dezinfekcijska bariera. Izvajali so sistem »all in/all out«. Bolni prašiči so bil ob našem prihodu nameščeni v porodnišnici, nato so jih prestavili v drug prostor, ki je bil ločen od prostorov drugih kategorij prašičev. Izvajali so dezinsekcijo in deratizacijo.

Tabela 26: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 6.

Table 26: Required and implemented biosecurity measures on Farm 6.

Biovarnostni ukrepi na farmi	Izvajanje biovarnostnih ukrepov na farmi				
	Pred serumizacijo	3 mesece po serumizaciji	6 mesecev po serumizaciji	9 mesecev po serumizaciji	12 mesecev po serumizaciji
Farma oddaljena več kot 300 m od najbližje farme	ne	ne	ne	ne	ne
Znan PRRS status najbližje farme	da	da	da	da	da
Dvojna zapora	ne	da	da	da	da
Uporaba preverjeno negativnega semena	da	da	da	da	da
Kategorije prašičev ločene po prostorih	ne	da	da	da	da
Preoblačenje in preobuvanje delavcev	ne	da	da	da	da
All in/all out sistem reje	ne	da	da	da	da
Razkuževalne bariere	da	da	da	da	da
Ločen prostor za bolne prašiče	ne	da	da	da	da
Deratizacija in dezinsekcija	da	da	da	da	da

4.6.4.2 Satelitski posnetek lokacije farme 6 v naselju in oddaljenost od drugih farm



Slika 15: Prikaz lokacije farme 6 in sosednih gospodarstev s prašiči.

Figure 15: Location of Farm 6 and neighbouring pig farms.

4.7 REZULTATI S FARME 7

4.7.1 Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 7

Na farmi 7 smo izvajali eliminacijo PRRS z vakcinacijo celotne plemenske črede. Ob prvem vzorčenju tik pred I. vakcinacijo smo protitelesa proti virusu PRRS dokazali pri vseh 20 plemenskih prašičih, od katerih sta 2 reagirala pozitivno in 18 visoko pozitivno (tabela 27). Dva meseca po prvi vakcinaciji smo pregledali vseh 19 plemenskih prašičev. Ugotovili smo, da je 1 plemenski prašič v ELISA reagiral negativno, 1 nizko pozitivno, 4 pozitivno in 13 visoko pozitivno. Tri mesece po I. vakcinaciji smo ponovno vakcinirali celotno plemensko čredo. V naslednjem mesecu je rejec izločil iz plemenske črede 4 svinje. Dva meseca po II. vakcinaciji smo pregledali vseh 15 plemenskih prašičev, od katerih je 1 v ELISA reagiral negativno, 1 nizko pozitivno, 4 pozitivno in 9 nizko pozitivno. Serološki profil se ni bistveno spremenil niti po drugi vakcinaciji. Pet mesecev po II. vakcinaciji smo pri pregledu celotne plemenske črede v ELISA ugotovili 7 visoko pozitivnih, 6 pozitivnih, 1 nizko pozitivnega, 1 plemenski prašič pa je reagiral negativno. Deset mesecev po II. vakcinaciji smo pregledali krvne vzorce 5 plemenskih prašičev ter serume 10 prašičev (5 tekačev in 5 pitancev). Pri plemenskih prašičih smo ugotovili 2 nizko pozitivna vzorca, 2 pozitivna in 1 visoko pozitivnega. V ELISA je 5 prašičev reagiralo negativno, 5 pa visoko pozitivno. V nadaljnjih mesecih je rejec izločil 5 plemenskih prašičev, tako jih je v plemenski čredi ostalo še 10. Štirinajst mesecev po II. vakcinaciji smo pri pregledu 10 plemenskih prašičev ugotovili, da je 1 vzorec reagiral nizko pozitivno in 9 visoko pozitivno.

Tabela 27: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 7.

Table 27: The ELISA results of detection of PRRS virus antibodies on Farm 7.

Vzorčenje	Skupno število testiranih prašičev		Število negativnih prašičev		Število nizko pozitivnih prašičev		Število pozitivnih prašičev		Število visoko pozitivnih prašičev	
	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči
Pred I. vakcinacijo	20	/	0	/	0	/	2	/	18	/
2 meseca po I. vakcinaciji	19	/	1	/	1	/	4	/	13	/
2 meseca po II. vakcinaciji	15	/	1	/	1	/	4	/	9	/
5 mesecev po II. vakcinaciji	15	/	1	/	1	/	6	/	7	/
10 mesecev po II. vakcinaciji	5	10	0	5	2	0	2	0	1	5
14 mesecev po II. vakcinaciji	10	/	0	/	1	/	0	/	9	/

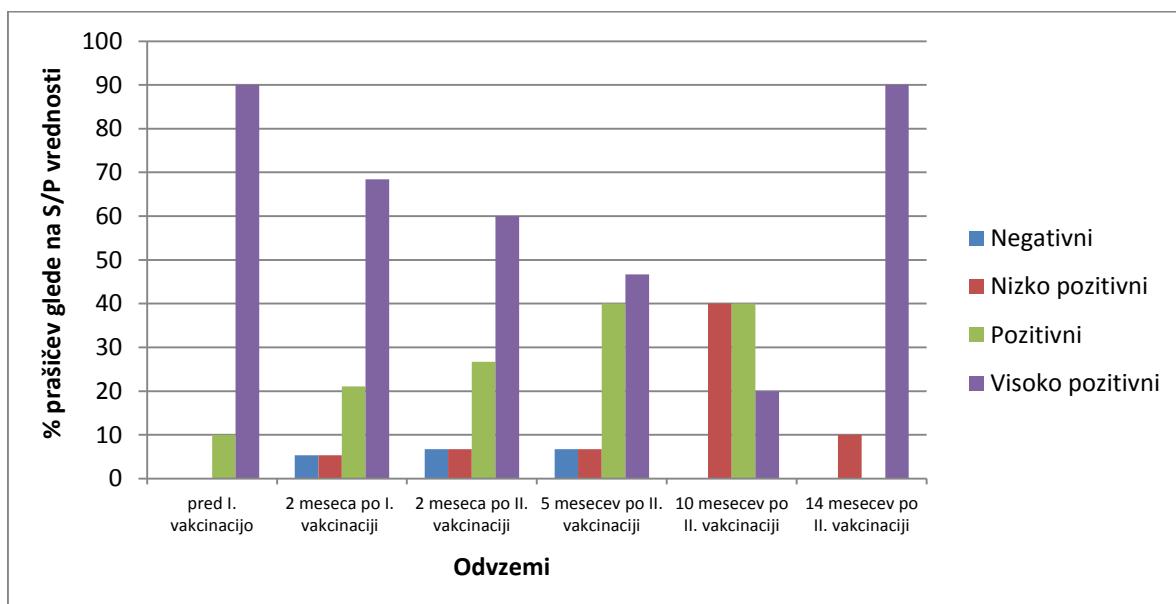
Legenda: v stolpcu »prašiči« so zajete kategorije od tekačev do pitancev.

Negativni (vrednosti S/P pod 0,4), nizko pozitivni prašiči (vrednosti S/P med 0,4 in 1), pozitivni prašiči

(vrednosti S/P med 1 in 2), visoko pozitivni prašiči (vrednosti S/P več kot 2).

Graf 25: Prikaz rezultatov ELISA za plemenske prašiče na farmi 7.

Graph 25: The ELISA results of the breeding pigs on Farm 7.



Pred izvedbo I. vakcinacije smo v plemenski čredi ugotovili 90 % visoko pozitivnih prašičev in 10 % pozitivnih na prisotnost protiteles (graf 25). Dva meseca po I. vakcinaciji se je odstotek visoko pozitivnih plemenskih prašičev znižal na 68,4, povišal pa se je odstotek pozitivnih na 21,1 ter nizko pozitivnih in negativnih na 5,3. Dva meseca po II. vakcinaciji se je znižal odstotek visoko pozitivnih na 60, zvišal pa odstotek pozitivnih na 26,7. Pet mesecev po II. vakcinaciji se je nadaljeval trend nižanja odstotka visoko pozitivnih plemenskih prašičev (46,7 %), odstotek pozitivni prašičev pa se je zvišal na 40. Odstotek nizko pozitivnih in negativnih plemenskih prašičev je ostajal približno na isti ravni, tako dva meseca po I. vakcinaciji, kot tudi 2 in 5 mesecev po II. vakcinaciji. Deset mesecev po II. vakcinaciji se je odstotek visoko pozitivnih plemenskih prašičev znižal na 20, zvišal pa se je odstotek pozitivnih in nizko pozitivnih na 40. Negativnih prašičev nismo več ugotovili. Viden je trend nižanja odstotka prašičev z visoko pozitivnimi vrednosti S/P vse do 10 mesecev po drugi vakcinaciji. Pri vzorčenju 14 mesecev po II. vakcinaciji smo ugotovili 90 % prašičev, ki so v ELISA reagirali visoko pozitivno, 10 % pa nizko pozitivno.

4.7.2 Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 7

4.7.2.1 Spreminjanje povprečnih vrednosti S/P v plemenski čredi v zaporednih odvzemih na farmi 7

Statistično značilno razliko smo ugotovili med drugim in prvim odvzemom (tabela 28). Povprečne vrednosti S/P padajo vse do 5 mesecev po II. vakcinaciji, nato pa začno ponovno naraščati 10 in 14 mesecev po II. vakcinaciji (tabela 28) Pred vakcinacijo smo ugotovili maksimalno S/P vrednost glede na ostale odvzeme in je znašala 4,671 (graf 26).

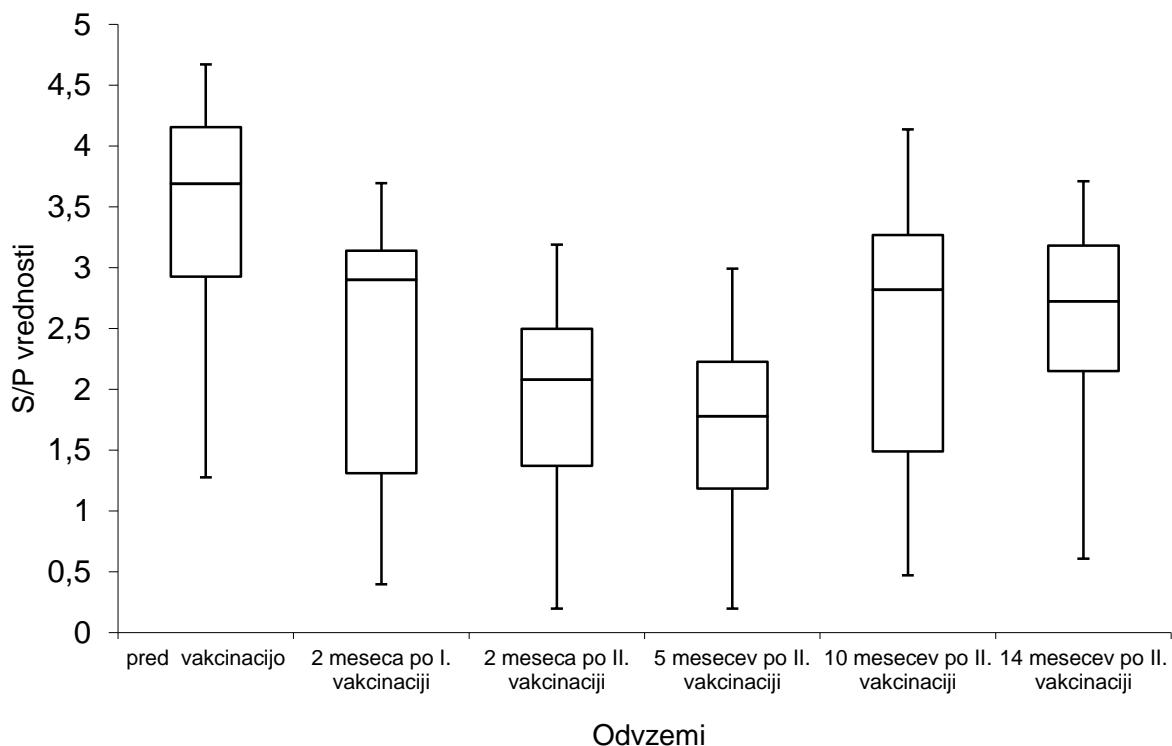
Tabela 28: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P po I. vakcinaciji) za farmo 7.

Table 28: Least square means for S/P value with standard errors and significance of differences between successive sampling (comparison with S/P value 2 months after I. vaccination) for Farm 7.

Odvzem	povprečje S/P	Standardna napaka	P-vrednost
pred vakcinacijo	3,476	± 0,213	0,0022
2 meseca po I. vakcinaciji	2,361	± 0,219	
2 meseca po II. vakcinaciji	1,930	± 0,246	0,5834
5 mesecev po II. vakcinaciji	1,783	± 0,246	0,2973
10 mesecev po II. vakcinaciji	2,482	± 0,287	0,9978
14 mesecev po II. vakcinaciji	2,575	± 0,301	0,9742

Graf 26: Prikaz vrednosti S/P med posameznimi odvzemi pri plemenskih prašičih na farmi 7.

Graph 26: S/P changing between each sampling in the breeding pigs on Farm 7.



Stolpci prikazujejo mediano, minimalno in maksimalno vrednost, spodnjo in zgornjo četrtino rezultatov ter srednjih 50 % vrednosti v posamezni skupini.

4.7.3 Rezultati dokazovanja nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 7

4.7.3.1 Dokaz nukleinske kisline virusa PRRS na farmi 7

Za dokaz virusa PRRS z metodo RT-PCR smo dva meseca po I. vakcinaciji odvzeli krvne vzorce vsem plemenskim prašičem. Deset mesecev po II. vakcinaciji smo odvzeli vzorce 5 plemenskim prašičem in 10 pitancem. Nukleinske kisline virusa PRRS nismo ugotovili pri nobeni kategoriji prašičev (tabela 29).

Tabela 29: Rezultati RT-PCR na farmi 7.

Table 29: Results of RT-PCR on Farm 7.

Testiranje	Skupno število	Število vzorcev						Rezultati					
		pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t	pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t
2 meseca po I. vakcinaciji	19	19	np	np	np	np	np	neg	np	np	np	np	np
10 mesecev po II. vakcinaciji	15	5	np	np	np	5	5	neg	np	np	np	neg	neg

Legenda: pl. p – plemenski prašiči, t – starost v tednih, neg. – negativno, np – ni pregledano

4.7.4 Biovarnostni ukrepi na farmi 7

4.7.4.1 Izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 7

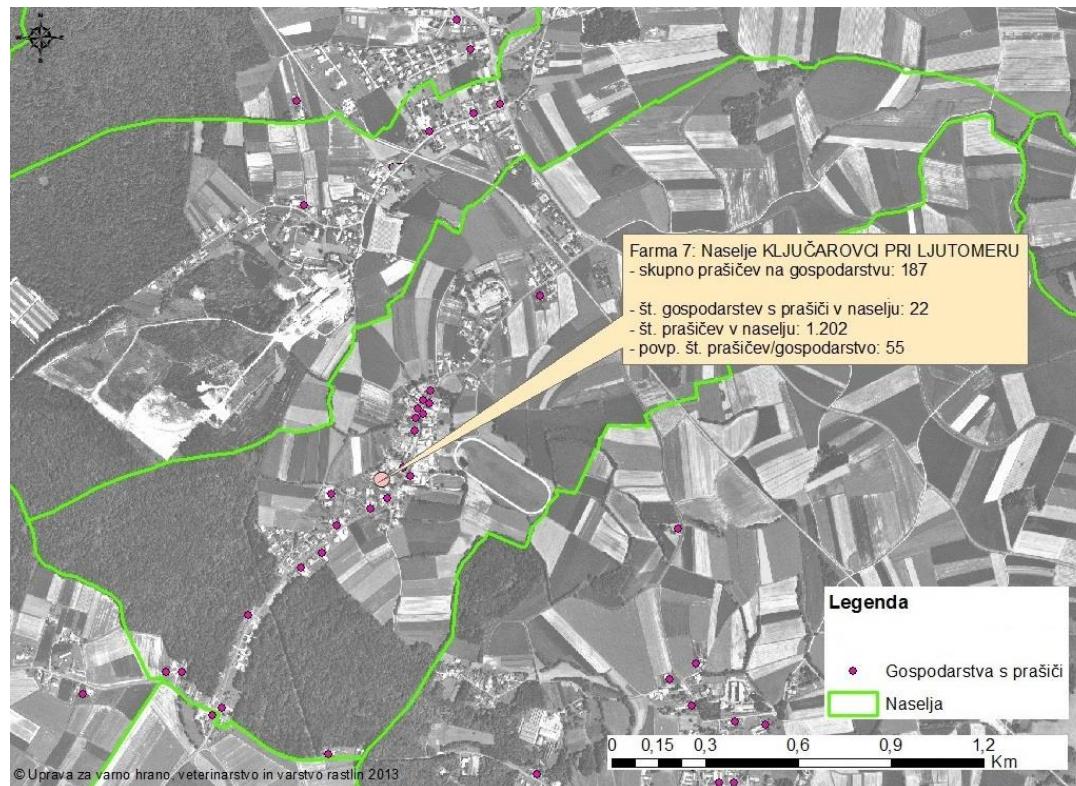
Farma 7 je v naselju Ključarovci pri Ljutomeru (slika 16). Najbližja druga farma je bila od nje oddaljena približno 150 m, poleg tega pa je bilo v radiju 1,2 kilometra še 33 farm. Za farme v okolici nismo poznali statusa glede PRRS. V naselju je bilo 1.202 prašičev na 22 gospodarstvih. Po ugotovitvi PRRS na farmi se je rejec obvezal, da bo izvajal predpisane biovarnostne ukrepe (tabela 30). Po prvi vakcinaciji je rejec izločil 3 plemenske svinje in jih nadomestil s 3 lastnimi mladicami, ki smo jih vakcinirali hkrati z ostalimi plemenskimi prašiči. Do konca študije je rejec izvajal dvojno zaporo. Dva meseca po I. vakcinaciji je še vedno semenil z nepreverjenim semenom, po našem opozorilu pa je osemenjeval svinje z negativnim semenom iz osemenjevalnega središča prostega PRRS. Farma ni imela ločenih prostorov za posamezne kategorije prašičev. Oblek in obutve niso menjavali med kategorijami. Na farmi niso izvajali sistema »all in/all out«. Že pred vakcinacijo so imeli dezinfekcijske bariere, le opozorili smo jih, naj raztopino menjajo dnevno. Pet mesecev po II. vakcinaciji so po večkratnih opozorilih premestili bolne prašiče v ločen prostor in jih v nadaljevanju imeli ločeno od ostalih kategorij. Izvajali so dezinsekcijo in deratizacijo.

Tabela 30: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 7.

Table 30: Required and implemented biosecurity measures on Farm 7.

Biovarnostni ukrepi na farmi	Izvajanje biovarnostnih ukrepov na farmi					
	Pred vakcinacijo	2 meseca po I. vakcinaciji	2 meseca po II. vakcinaciji	5 mesecov po II. vakcinaciji	10 mesecov po II. vakcinaciji	14 mesecov po II. vakcinaciji
Farma oddaljena več kot 300 m od najbližje farme	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Znan PRRS status najbližje farme	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Dvojna zapora	ne	ne	da	da	da	da
Uporaba preverjeno negativnega semena	ne	ne	da	da	da	da
Kategorije prašičev ločene po prostorih	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Preoblačenje in preobuvanje delavcev	ne	ne	ne	ne	ne	ne
All in/all out sistem reje	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Razkuževalne bariere	da	da	da	da	da	da
Ločen prostor za bolne prašiče	ne	ne	ne	da	da	da
Deratizacija in dezinsekcija	da	da	da	da	da	da

4.7.4.2 Satelitski posnetek lokacije farme 7 v naselju in oddaljenost od drugih farm



Slika 16: Prikaz lokacije farme 7 in sosednih gospodarstev s prašiči.

Figure 16: Location of Farm 7 and neighbouring pig farms.

4.8 REZULTATI S FARME 8

4.8.1 Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 8

Na farmi 8 smo izvajali eliminacijo PRRS z vakcinacijo. Tik pred vakcinacijo smo na farmi odvzeli vzorce 15 plemenskim prašičem in 5 pitancem. Protitelesa proti virusu PRRS smo ugotovili pri vseh plemenskih prašičih, 6 jih je v ELISA reagiralo pozitivno in 9 visoko pozitivno (tabela 31). Pri pregledu pitancev smo ugotovili, da je en vzorec reagiral negativno, 2 nizko pozitivno in 2 pozitivno. Vakcinacijo smo na farmi 8 izvedli enkrat. En mesec po vakcinaciji smo odvzeli kri vsem 15 plemenskim prašičem in dokazali 5 pozitivnih plemenskih prašičev in 10 visoko pozitivnih. Dva meseca po vakcinaciji smo pri pregledu 15 prašičev plemenske črede ugotovili, da sta 2 plemenska prašiča v ELISA reagirala nizko pozitivno, 2 pozitivno in 8 visoko pozitivno. Šest mesecev po vakcinaciji smo ponovno preiskali vseh 15 plemenskih prašičev in ugotovili, da sta v ELISA 2 vzorca reagirala negativno, 5 nizko pozitivno, 7 pozitivno in 1 visoko pozitivno. Deset mesecev po vakcinaciji smo preiskali 5 plemenskih prašičev in 20 pitancev. Ugotovili smo, da je v ELISA en plemenski prašič reagiral nizko pozitivno, 1 pozitivno in 3 visoko pozitivno. Pri pitancih pa je v ELISA 1 vzorec reagiral nizko pozitivno, 9 pozitivno in 10 visoko pozitivno. Petnajst mesecev po vakcinaciji smo preiskali vseh 15 prašičev plemenske črede in ugotovili 5 nizko pozitivnih vzorcev na protitelesa, 3 pozitivne in 7 visoko pozitivnih.

Tabela 31: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 8.

Table 31: The ELISA results of detection of PRRS virus antibodies on Farm 8.

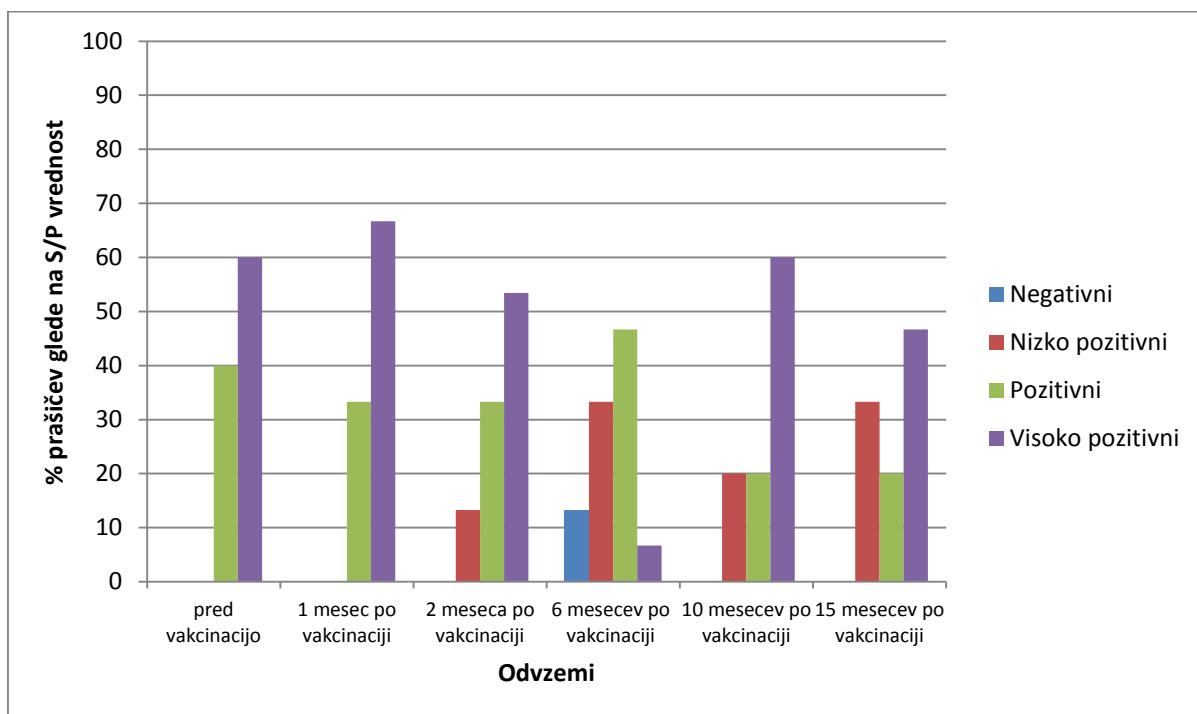
Vzorčenje	Skupno število testiranih prašičev		Število negativnih prašičev		Število nizko pozitivnih prašičev		Število pozitivnih prašičev		Število visoko pozitivnih prašičev	
	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči	plemenski prašiči	prašiči
Pred vakcinacijo	15	5	0	1	0	2	6	2	9	0
1 mesec po vakcinaciji	15	/	0	/	0	/	5	/	10	/
2 meseca po vakcinaciji	15	/	0	/	2	/	2	/	8	/
6 mesecev po vakcinaciji	15	/	2	/	5	/	7	/	1	/
10 mesecev po vakcinaciji	5	20	0	0	1	1	1	9	3	10
15 mesecev po vakcinaciji	15	/	0	/	5	/	3	/	7	/

Legenda: v stolpcu »prašiči« so zajete kategorije od tekačev do pitancev.

Negativni (vrednosti S/P pod 0,4), nizko pozitivni prašiči (vrednosti S/P med 0,4 in 1), pozitivni prašiči (vrednosti S/P med 1 in 2), visoko pozitivni prašiči (vrednosti S/P več kot 2).

Graf 27: Prikaz rezultatov ELISA za plemenske prašiče na farmi 8.

Graph 27: The ELISA results of the breeding pigs on Farm 8.



Pred izvedbo vakcinacije smo ugotovili 60 % visoko pozitivnih plemenskih prašičev in 40 % pozitivnih (graf 27). En mesec po vakcinaciji se je odstotek visoko pozitivnih zvišal na 66,7 %, znižal pa se je odstotek pozitivnih na 33,3. Dva meseca po vakcinaciji se je ponovno znižal odstotek visoko pozitivnih na 53,4, odstotek pozitivnih je ostal nespremenjen, povišal pa se je odstotek nizko pozitivnih na 13,3. Šest mesecev po vakcinaciji se je znatno znižal odstotek visoko pozitivnih na 6,7, zvišal pa odstotek pozitivnih na 46,7 in nizko pozitivnih na 33,3, prvič pa smo ugotovili tudi 13,3 % negativnih plemenskih prašičev. Vse do deset mesecev po vakcinaciji je viden trend padanja odstotka visoko pozitivnih prašičev. Deset mesecev po vakcinaciji smo ugotovili 60 % visoko pozitivnih, 20 % pozitivnih in 20 % nizko pozitivnih plemenskih prašičev. Petnajst mesecev po vakcinaciji smo ugotovili 46,7 % visoko pozitivnih, 20 % pozitivnih in 33,3 % nizko pozitivnih plemenskih prašičev.

4.8.2 Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 8

4.8.2.1 Spreminjanje povprečnih vrednosti S/P v plemenski čredi v zaporednih odvzemih na farmi 8

Statistično značilno razliko smo ugotovili med prvim in četrtem odvzemom ter med prvim in šestim odvzemom (tabela 32). Povprečne vrednosti S/P so se zniževale do 6 mesecev po vakcinaciji. Deset mesecev po vakcinaciji smo ugotovili znatno povišanje povprečnih S/P vrednosti (tabela 32).

Maksimalno S/P vrednost smo ugotovili 10 mesecev po vakcinaciji in je znašala 3,661 (graf 28).

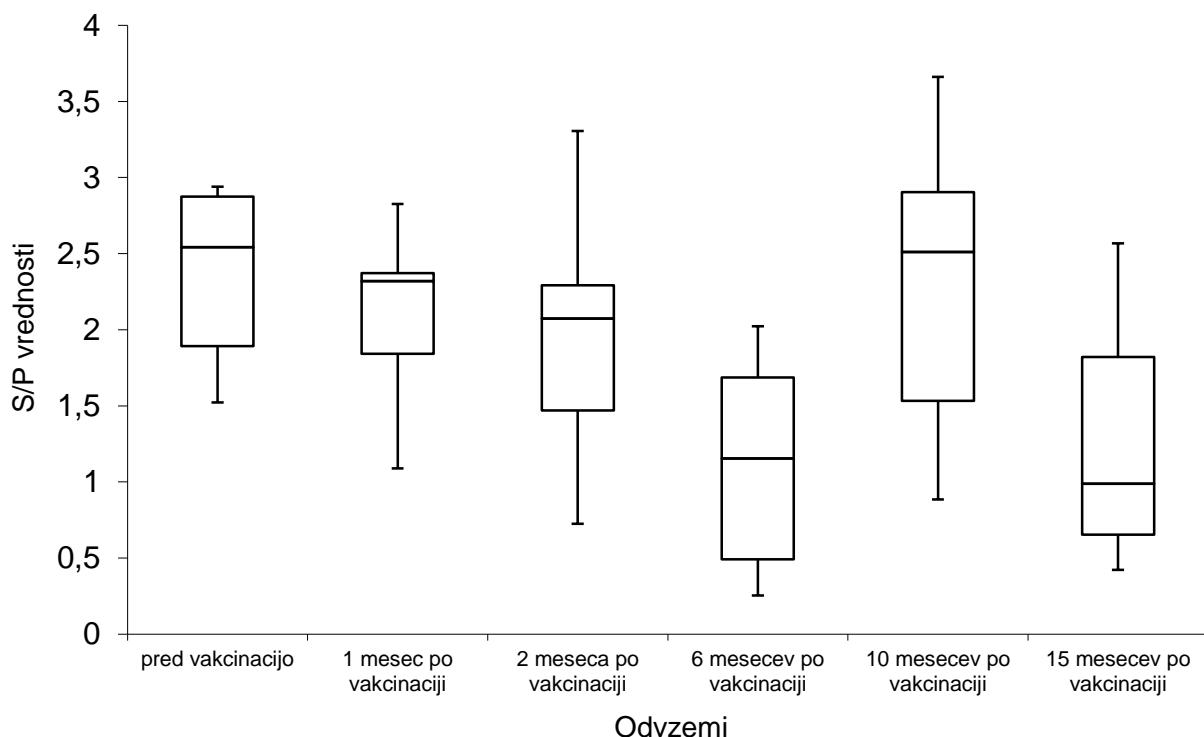
Tabela 32: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P pred vakcinacijo) za farmo 8.

Table 32: Least square means for S/P value with standard errors and significance of differences between successive sampling (comparison with S/P value before vaccination) for Farm 8.

Odvzem	povprečje S/P	Standardna napaka	P-vrednost
Pred vakcinacijo	2,354	± 0,179	
1 mesec po vakcinaciji	2,121	± 0,185	0,9835
2 meseca po vakcinaciji	1,949	± 0,185	0,9216
6 mesecev po vakcinaciji	1,099	± 0,185	0,001
10 mesecev po vakcinaciji	2,302	± 0,293	0,9640
15 mesecev po vakcinaciji	1,280	± 0,227	0,0210

Graf 28: Prikaz vrednosti S/P med posameznimi odvzemi pri plemenskih prašičih na farmi 8.

Graph 28: S/P changing between each sampling in breeding pigs on Farm 8.



Stolpci prikazujejo mediano, minimalno in maksimalno vrednost, spodnjo in zgornjo četrtino rezultatov ter srednjih 50 % vrednosti v posamezni skupini.

4.8.3 Rezultati dokazovanja nukleinske kislino virusa PRRS na farmi 8

4.8.3.1 Dokaz nukleinske kislino virusa PRRS na farmi 8

Deset mesecev po vakcinaciji smo z metodo RT-PCR pregledali 6 in 8-tedenske tekače ter 12 in 14-tedenske pitance. Nukleinsko kislino virusa PRRS smo dokazali v vseh pregledanih vzorcih (tabela 33).

Tabela 33: Rezultati RT-PCR na farmi 8.

Table 33: Results of RT-PCR on Farm 8.

Testiranje	Skupno število	Število vzorcev						Rezultati					
		pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t	pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t
10 mesecev po vakcinaciji	20	np	5	5	np	5	5	np	poz	poz	np	poz	poz

Legenda: pl. p – plemenski prašiči, t – starost v tednih, poz – pozitivno, np – ni pregledano

4.8.3.2 Rezultati določanja nukleotidnega zaporedja na farmi 8

Na farmi 8 smo v letu 2009 ugotovili pozitiven rezultat z metodo RT-PCR pri tekačih in pitancih. Iz enega produkta RT-PCR smo določili nukleotidno zaporedje. Virusni sev s farme 8 z oznako 1/2009 je imel 89,5 % identičnih nukleotidov z vakcinalnim sevom (Lelystad) v primerjani regiji ORF 7 (slika 20).

4.8.4 Biovarnostni ukrepi na farmi 8

4.8.4.1 Izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 8

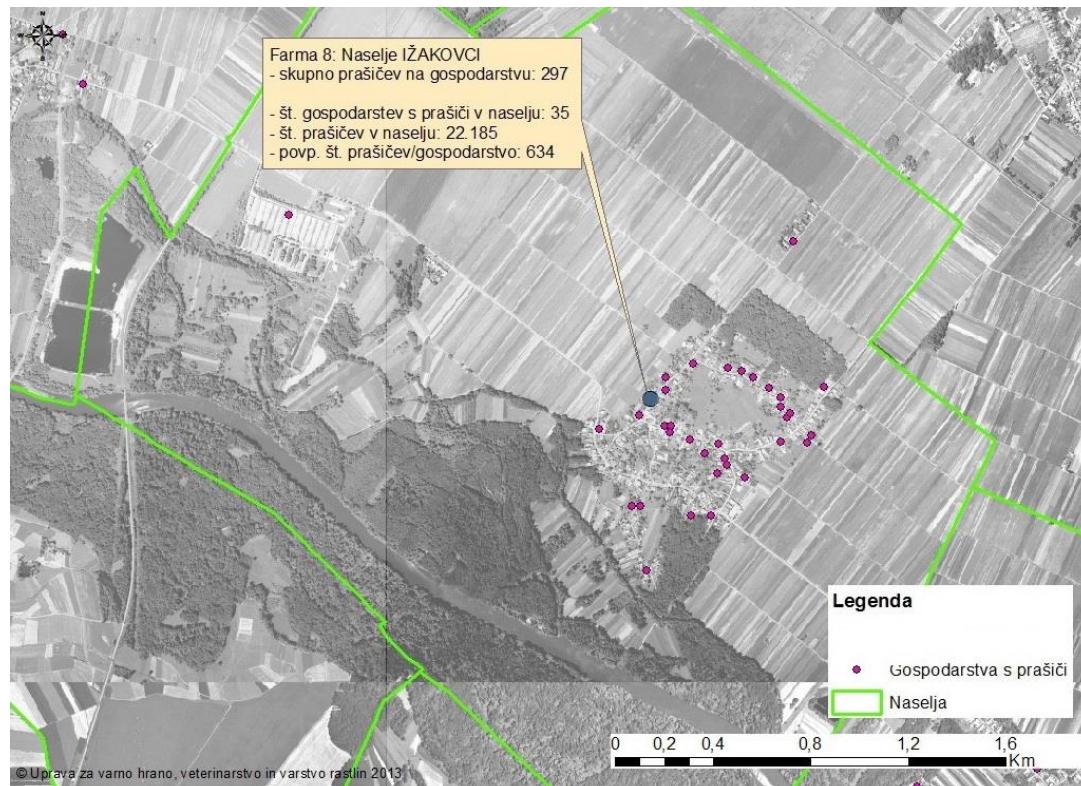
Farma 8 je v naselju Ižakovci (slika 17). Najbližja farma je oddaljena približno 100 m, v radiju 1600 m pa je bilo še 34 farm za katere nismo poznali statusa glede PRRS. V naselju je bilo skupno 22.185 prašičev v 35 gospodarstvih. Po ugotovitvi PRRS na farmi se je rejec obvezal, da bo izvajal predpisane biovarnostne ukrepe (tabela 34). Od začetka izvajanja ukrepov se je rejec 6 mesecev držal zapore reje, nato pa smo 10 mesecev po vakcinaciji ugotovili, da je zamenjal 2 plemenski svinji z novima mladicama, brez predhodnega dogovora. Ves čas študije je osemenjeval svinje z negativnim semenom iz osemenjevalnega središča prostega PRRS. Ob pričetku študije na farmi niso imeli kategorij ločenih po prostorih, nato pa so kategorije prašičev redili ločeno od 6 mesecev po vakcinaciji naprej. Na farmi niso izvajali sistema »all in/all out«. Že pred začetkom študije so imeli dezinfekcijske bariere. Bolne prašiče so imeli v ločenem prostoru. Izvajali so dezinsekcijo in deratizacijo.

Tabela 34: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 8.

Table 34: Required and implemented biosecurity measures on Farm 8.

Biovarnostni ukrepi na farmi	Izvajanje biovarnostnih ukrepov na farmi					
	Pred vakcinacijo	1 mesece po vakcinaciji	2 meseca po vakcinaciji	6 mesecov po vakcinaciji	10 mesecov po vakcinaciji	15 mesecov po vakcinaciji
Farma oddaljena več kot 300 m od najbližje farme	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Znan PRRS status najbližje farme	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Dvojna zapora	ne	da	da	da	ne	da
Uporaba preverjeno negativnega semena	da	da	da	da	da	da
Kategorije prašičev ločene po prostorih	ne	ne	ne	da	da	da
Preoblačenje in preobuvanje delavcev	ne	ne	ne	ne	ne	ne
All in/all out sistem reje	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Razkuževalne bariere	da	da	da	da	da	da
Ločen prostor za bolne prašiče	da	da	da	da	da	da
Deratizacija in dezinsekcija	da	da	da	da	da	da

4.8.4.2 Satelitski posnetek lokacije farme 8 v naselju in oddaljenost od drugih farm



Slika 17: Prikaz lokacije farme 8 in sosednih gospodarstev s prašiči.

Figure 17: Location of Farm 8 and neighbouring pig farms.

4.9 REZULTATI S FARME 9

4.9.1 Rezultati seroloških preiskav pri prašičih na farmi 9

Na farmi 9 smo izvajali eliminacijo PRRS z vakcinacijo. Za ugotovitev PRRS na farmi smo najprej odvzeli kri 10 plemenskim prašičem in 10 pitancem. V ELISA je 6 plemenskih prašičev reagiralo negativno, 2 nizko pozitivno in 2 pozitivno (tabela 35). Pri pitancih protiteles nismo ugotovili pri 4 vzorcih, 4 vzorci so reagirali nizko pozitivno in 2 pozitivno. Na farmi 9 smo izvedli vakcinacijo enkrat. Dva meseca po vakcinaciji smo krvne vzorce odvzeli vsem 30 plemenskim prašičem. V ELISA je reagiralo 15 vzorcev pozitivno, 13 nizko pozitivno, pri 2 vzorcih pa nismo dokazali protiteles proti virusu PRRS. V naslednjih treh mesecih je rejec izločil 5 plemenskih svinj, tako je plemenska čreda štela še 25 prašičev. Pet mesecev po vakcinaciji smo pri pregledu celotne plemenske črede in 15 pitancev ugotovili 11 negativnih plemenskih prašičev, 15 nizko pozitivnih, 8 pozitivnih in 1 visoko pozitivnega. Pri pitancih pa smo ugotovili 5 nizko pozitivnih vzorcev in 10 pozitivnih. Osem mesecev po vakcinaciji smo pregledali vseh 25 plemenskih prašičev, od katerih sta 2 reagirala negativno, 8 nizko pozitivno, 4 pozitivno in 11 visoko pozitivno. Osem mesecev po vakcinaciji smo pregledali tudi 5 pitancev in ugotovili, da je vseh 5 vzorcev reagiralo visoko pozitivno v ELISA. Dvanajst mesecev po vakcinaciji smo pregledali 10 plemenskih prašičev in ugotovili, da sta 2 vzorca v ELISA reagirala nizko pozitivno, 4 pozitivno in 4 visoko pozitivno.

Tabela 35: Rezultati ELISA za dokaz protiteles proti virusu PRRS na farmi 9.

Table 35: The ELISA results of detection of PRRS virus antibodies on Farm 9.

Vzorčenje	Skupno število testiranih prašičev		Število negativnih prašičev		Število nizko pozitivnih prašičev		Število pozitivnih prašičev		Število visoko pozitivnih prašičev	
	plemenski prašiči	prašiči	pleemenski prašiči	prašiči	pleemenski prašiči	prašiči	pleemenski prašiči	prašiči	pleemenski prašiči	prašiči
Pred vakcinacijo	10	10	6	4	2	4	2	2	0	0
2 meseca po vakcinaciji	30	/	2	/	13	/	15	/	0	/
5 mesecev po vakcinaciji	25	15	11	0	15	5	8	10	1	0
8 mesecev po vakcinaciji	25	5	2	0	8	0	4	0	11	5
12 mesecev po vakcinaciji	10	/	0	/	2	/	4	/	4	/

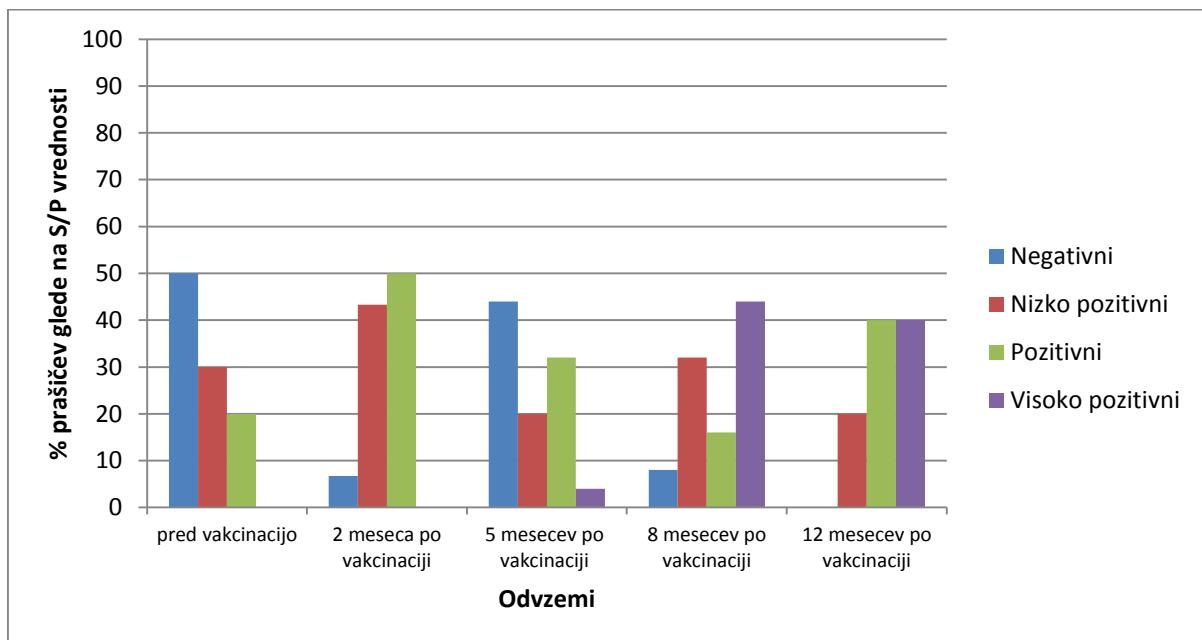
Legenda: v stolpcu »prašiči« so zajete kategorije od tekačev do pitancev.

Negativni (vrednosti S/P pod 0,4), nizko pozitivni prašiči (vrednosti S/P med 0,4 in 1), pozitivni prašiči

(vrednosti S/P med 1 in 2), visoko pozitivni prašiči (vrednosti S/P več kot 2).

Graf 29: Prikaz rezultatov ELISA za plemenske prašiče na farmi 9.

Graph 29: The ELISA results of the breeding pigs on Farm 9.



Pred vakcinacijo smo v plemenski čredi ugotovili 50 % plemenskih prašičev, ki so v ELISA reagirali negativno, 30 % nizko pozitivno in 20 % pozitivno (graf 29). Dva meseca po vakcinaciji se je odstotek negativnih znižal na 6,7, povišal pa se je odstotek nizko pozitivnih na 43,3 in pozitivnih na 50. Pet mesecev po vakcinaciji se je zvišal odstotek negativnih na 44, znižal pa se je odstotek nizko pozitivnih na 20 in pozitivnih na 32 %, ugotovili smo tudi 4 % visoko pozitivnih plemenskih prašičev. Osem mesecev po vakcinaciji se je zvišal odstotek prašičev z visoko pozitivnimi vrednostmi S/P na 44. Pri vzorčenju 12 mesecev po vakcinaciji smo ugotovili 40 % visoko pozitivnih in 40 % pozitivnih plemenskih prašičev ter 20 % nizko pozitivnih.

4.9.2 Rezultati statistične obdelave podatkov s farme 9

4.9.2.1 Spreminjanje povprečnih vrednosti S/P v plemenski čredi v zaporednih odvzemih na farmi 9

Statistično značilno razliko smo ugotovili med prvim in četrtim odvzemom ter med prvim in petim odvzemom (tabela 36). Povprečne vrednosti S/P so padale do 5 mesecev po vakcinaciji, nato pa smo 8 mesecev po vakcinaciji ugotovili povišanje (tabela 36).

Osem mesecev po vakcinaciji smo izmed izračunanih vrednosti S/P vseh vzorčenj ugotovili najvišjo vrednost S/P, ki je znašala 4,037 (graf 30).

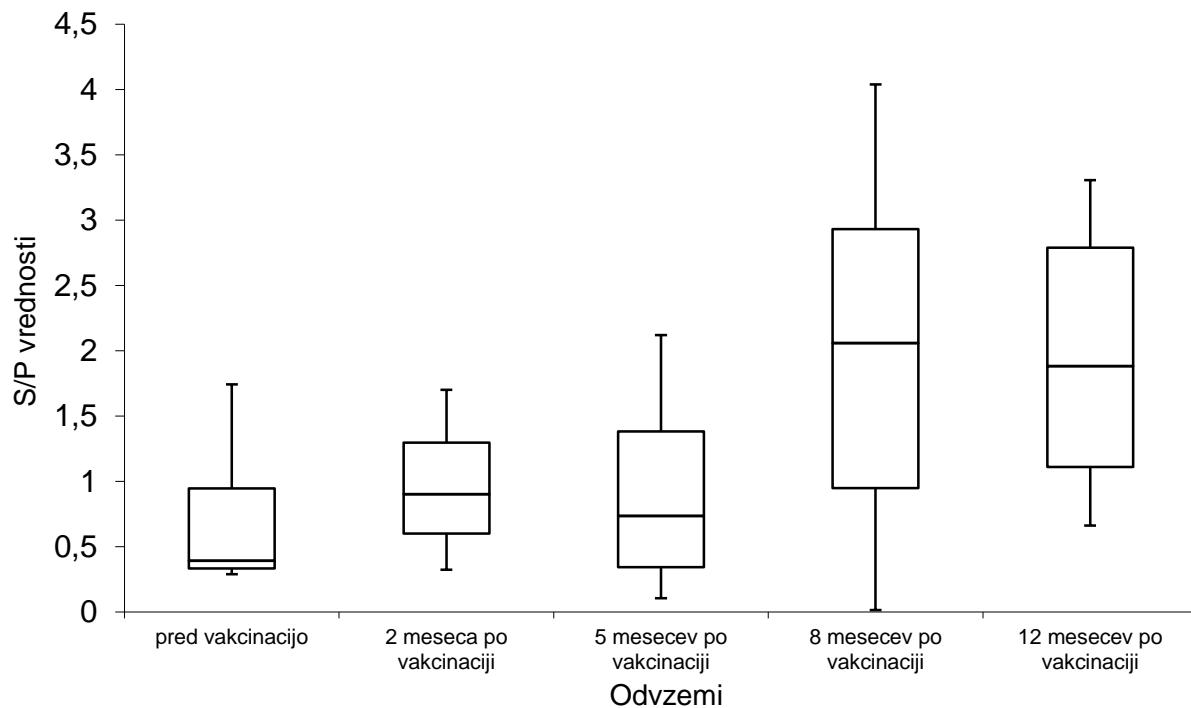
Tabela 36: Povprečne vrednosti S/P s standardnimi napakami ter statistično značilno razliko med odvzemi (primerjava glede na vrednosti S/P pred vakcinacijo) za farmo 9.

Table 36: Least square means for S/P value with standard errors and significance of differences between successive sampling (comparison with S/P value before vaccination) for Farm 9.

Odvezem	povprečje S/P	Standardna napaka	P-vrednost
Pred vakcinacijo	0,716	± 0,150	
2 meseca po vakcinaciji	0,952	± 0,150	0,8320
5 mesecev po vakcinaciji	0,885	± 0,150	0,9810
8 mesecev po vakcinaciji	2,047	± 0,150	< 0,0001
12 mesecev po vakcinaciji	1,950	± 0,260	0,0037

Graf 30: Prikaz vrednosti S/P med posameznimi odvzemi pri plemenskih prašičih na farmi 9.

Graph 30: S/P changing between each sampling in breeding pigs on Farm 9.



Stolpci prikazujejo mediano, minimalno in maksimalno vrednost, spodnjo in zgornjo četrtino rezultatov ter srednjih 50 % vrednosti v posamezni skupini.

4.9.3 Rezultati dokazovanja nukleinske kislino virusa PRRS na farmi 9

4.9.3.1 Dokaz nukleinske kislino virusa PRRS na farmi 9

Pet mesecev po vakcinaciji smo z metodo RT-PCR pregledali 25 plemenskih prašičev ter 5 tekačev in 10 pitancev (tabela 37). Nukleinsko kislino virusa PRRS smo dokazali pri 15 prašičih v plemenski čredi. Pri istem vzorčenju smo nukleinsko kislino dokazali pri 6-tedenskih tekačih. Nukleinske kisline nismo dokazali v vzorcih odvzetih pri 12 in 14-tedenskih pitancih.

Tabela 37: Rezultati RT-PCR na farmi 9.

Table 37: Results of RT-PCR on Farm 9.

Testiranje	Skupno število	Število vzorcev						Rezultati					
		pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t	pl. p	6 t	8 t	10 t	12 t	14 t
5 mesecev po vakcinaciji	40	25	5	np	np	5	5	poz	poz	np	np	neg	neg

Legenda: pl. p – plemenski prašiči, t – starost v tednih, neg – negativno, poz – pozitivno, np – ni pregledano

4.9.3.2 Rezultati določanja nukleotidnega zaporedja na farmi 9

Na farmi 9 smo v letih 2011 in 2012 ugotovili nukleotidno zaporedje iz 2 pozitivnih vzorcev v katerih smo z metodo RT-PCR dokazali nukleinsko kislino virusa PRRS. Pri primerjavi 258 nukleotidov v odseku gena, ki kodira protein nukleokapside (ORF 7), smo ugotovili, da odstotek identičnih nukleotidov v dveh vzorcih (1/2011, 1/2012) znaša 98,1. Pri primerjavi neukleotidnih zaporedij sevov s farme 9 (1/2011, 1/2012) in nukleotidnega zaporedja vakcinalnega seva virusa (sev Lelystad) smo ugotovili od 88 do 89,1 % identičnih nukleotidov (slika 20).

4.9.4 Biovarnostni ukrepi na farmi 9

4.9.4.1 Izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 9

Farma 9 je v naselju Grabe pri Ljutomeru (slika 18). Najbližja farma je oddaljena približno 125 m, v radiju 1 kilometer pa je bilo še 13 prašičjih farm, pri katerih statusa glede PRRS nismo poznali. V naselju je bilo 929 prašičev v 11 gospodarstvih. Po ugotovitvi PRRS na farmi se je

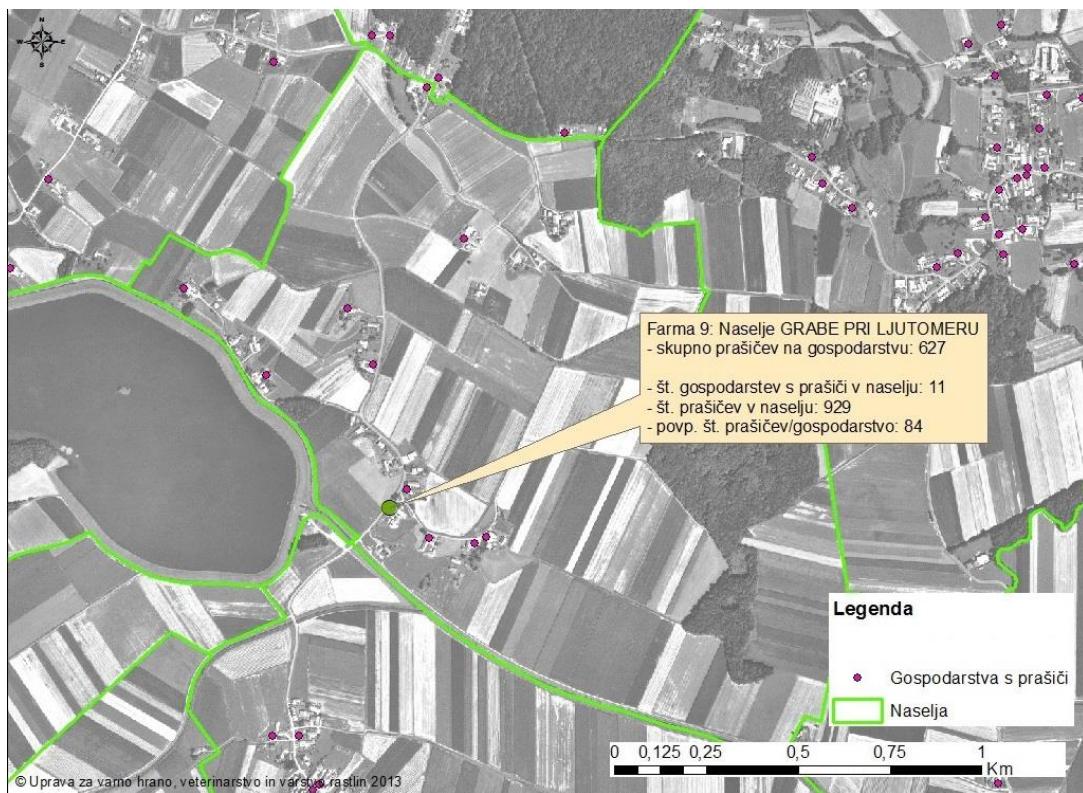
rejec obvezal, da bo izvajal predpisane biovarnostne ukrepe (tabela 38). Rejec se 5 mesecev po vakcinaciji ni držal zapore reje in je dodajal nove mladice v plemensko čredo ter s tem prekršil enega izmed dogovorjenih biovarnostnih ukrepov. Za razplod je uporabljal svoja merjasca. Farma je imela kategorije prašičev ločene po prostorih. Vsak delavec je imel svojo obleko in obutev. Na farmi niso izvajali sistema »all in/all out«. Že pred začetkom študije so imeli nameščene dezinfekcijske bariere. Bolnih prašičev najprej niso ločevali od zdravih, šele po našem ponovnem opozorilu 5 mesecev po vakcinaciji so bolne prašiče premestili v bolnišnični boks, ki je bil v ločenem prostoru. Na farmi smo opazili pomanjkljivo izvajanje dezinsekcije, vendar se je stanje 8 mesecev po vakcinaciji izboljšalo. Ves čas študije so izvajali deratizacijo.

Tabela 38: Predpisani in izvedeni biovarnostni ukrepi na farmi 9.

Table 38: Required and implemented biosecurity measures on Farm 9.

Biovarnostni ukrepi na farmi	Izvajanje biovarnostnih ukrepov na farmi				
	Pred vakcinacijo	2 meseca po vakcinaciji	5 mesecov po vakcinaciji	8 mesecov po vakcinaciji	12 mesecov po vakcinaciji
Farma oddaljena več kot 300 m od najbližje farme	ne	ne	ne	ne	ne
Znan PRRS status najbližje farme	ne	ne	ne	ne	ne
Dvojna zapora	ne	ne	ne	da	da
Uporaba preverjeno negativnega semena	ne	ne	ne	ne	ne
Kategorije prašičev ločene po prostorih	da	da	da	da	da
Preoblačenje in preobuvanje delavcev	ne	da	da	da	da
All in/all out sistem reje	ne	ne	ne	ne	ne
Razkuževalne bariere	da	da	da	da	da
Ločen prostor za bolne prašiče	ne	ne	da	da	da
Deratizacija in dezinsekcija	ne	ne	ne	da	da

4.9.4.2 Satelitski posnetek lokacije farme 9 v naselju in oddaljenost od drugih farm



Slika 18: Prikaz lokacije farme 9 in sosednih gospodarstev s prašiči.

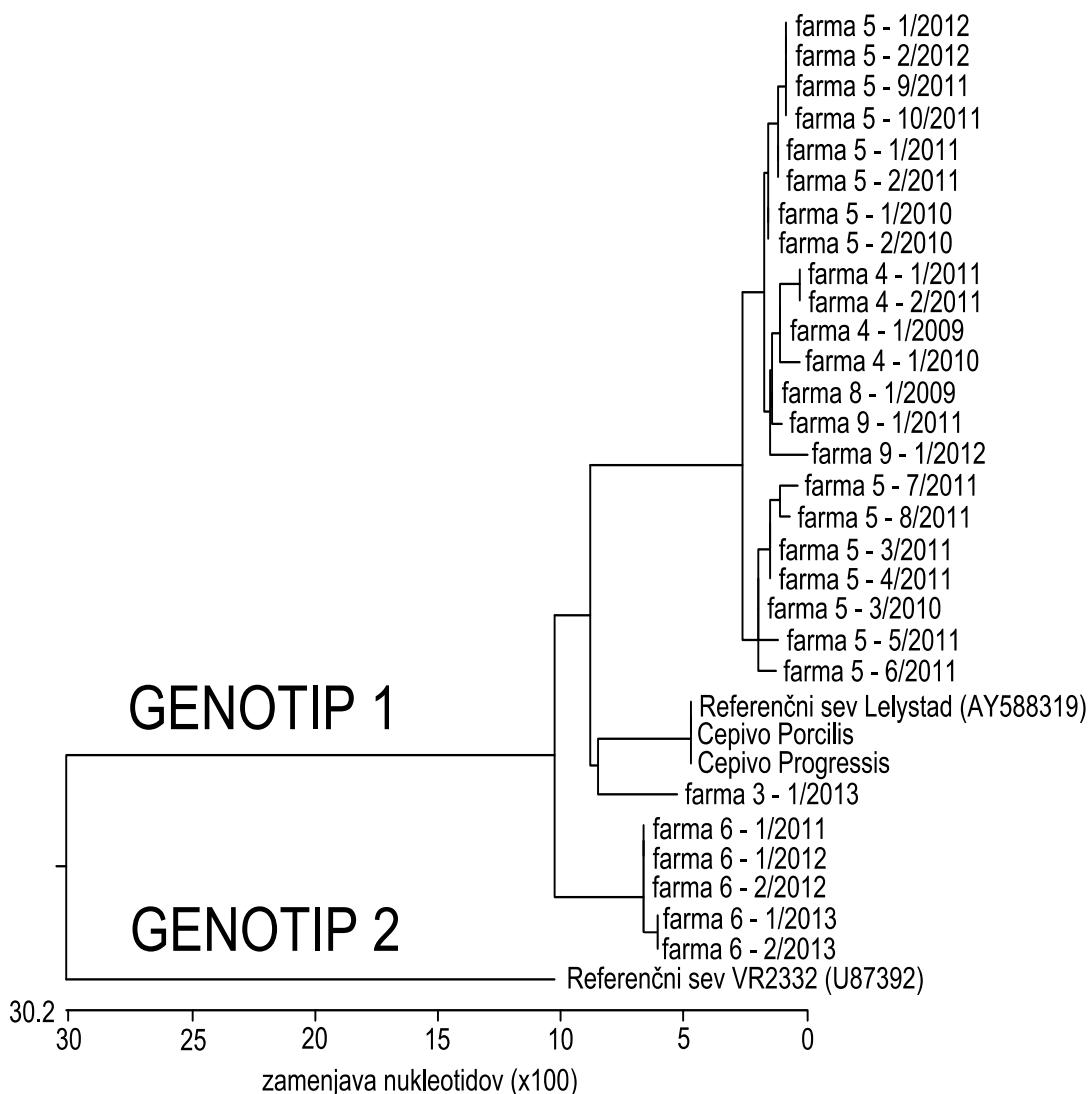
Figure 18: Location of Farm 9 and neighbouring pig farms.

4.10 REZULTATI METOD ZA DOKAZ VIRUSA

4.10.1 Molekularne metode

4.10.1.1 Filogenetska razvrstitev virusov PRRS, ugotovljenih na šestih farmah

Za filogenetsko primerjavo smo uporabili 28 nukleotidnih zaporedij, ki smo jih določili iz produktov RT-PCR na šestih različnih farmah (farma 3, 4, 5, 6, 8, 9). Vse ugotovljene seve smo uvrstili v genotip 1. Na podlagi primerjave nukleotidnega zaporedja (258 nt, ORF 7, pozicija v genomu; 14673-14927 glede na referenčni sev Lelystad, GenBank acc. no AY588319) lahko seve razvrstimo v tri genetske skupine (slika 19). Najbližjo genetsko sorodnost z referenčnim sevom Lelystad smo ugotovili pri sevih s farme 3. Seva se ujemata v 93,4 % nukleotidov. Pet sevov, ki smo jih ugotovili na farmi 6 med leti 2011 in 2013, smo na filogenetskem drevesu razvrstili v isto genetsko skupino, pri njih pa smo ugotovili od 99,6 do 100 % identičnih nukleotidov. Z referenčnim sevom Lelystad pa imajo sevi s farme 6 od 93 % do 93,4 % identičnih nukleotidov. Seve s farm 4, 5, 8 in 9 smo uvrstili v tretjo genetsko skupino, pri njih pa smo ugotovili od 95 do 99,6 % identičnih nukleotidov. Z referenčnim sevom Lelystad imajo sevi s farm 4, 5, 8 in 9 od 88 % do 89,9 % identičnih nukleotidov (slika 20). Iz primerjave geografske lokacije farm 3, 4, 5, 6, 8 in 9 in razvrstitev sevov v genetske skupine na filogenetskem drevesu je mogoče razbrati povezavo med ugotovljenim sevom na posamezni farmi in geografsko lokacijo farme. Farma 3 je na Dolenjskem in je od farme 6 oddaljeno več kot 100 kilometrov. Farma 6 je locirana v okolici Ptuja, farme 4, 5, 8 in 9 so blizu druga drugi, vse znotraj kroga s polmerom 20 kilometrov, v Pomurju (slika 7). Iz razporeditve na filogenetskem drevesu je razvidno, da se zelo podobni sevi pojavljajo na vseh štirih farmah, ki so blizu skupaj (slika 7). Razlikujejo pa se od sevov, ki smo jih ugotovili na farmah 3 in 6, ki sta precej oddaljeni.



Slika 19: Prikaz razvrstitve ugotovljenih sevov PRRS s šestih farm (farme 3, 4, 5, 6, 8, 9) na filogenetskem drevesu.

Figure 19: The phylogenetic tree obtained with sequences from six farms (farm 3, 4, 5, 6, 8, 9).

Primerjava je narejena na podlagi 258 nukleotidov posameznih sevov skupaj z referenčnim sevom genotipa 1 (PRRS sev Lelystad, AY588319), cepivom Porcilis in Progresiss ter genotipom 2 (PRRS sev VR2332, U87392).

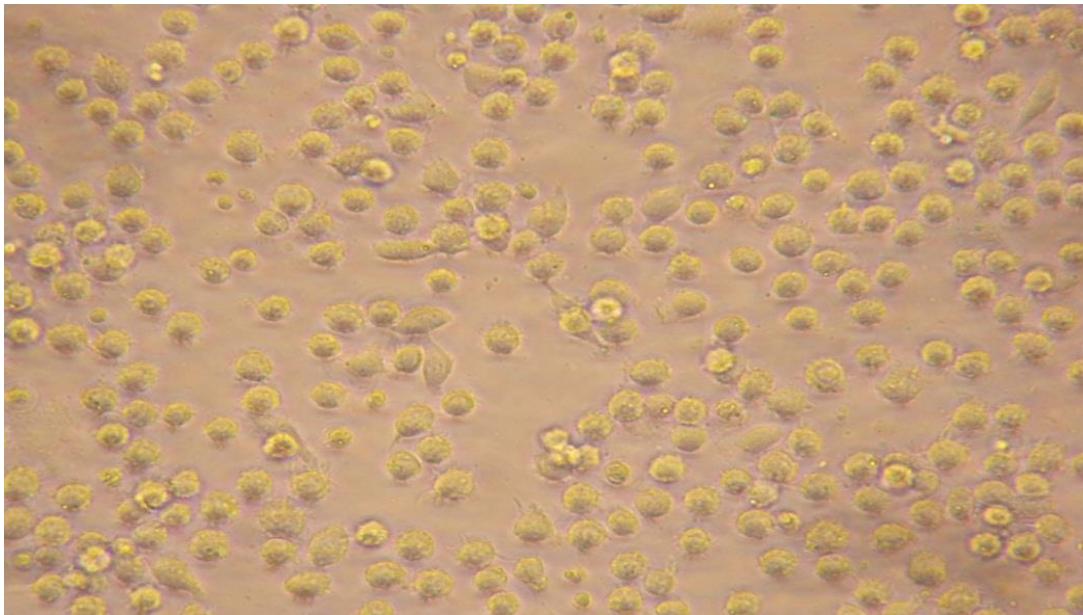
		Odstotek identičnosti nukleotidov																						1
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	1		
1	100.0	100.0	93.4	89.1	89.9	88.4	89.5	89.5	89.1	89.5	89.1	89.5	89.9	88.8	88.4	93.0	93.4	89.5	89.1	88.0	66.3	1		
2	0.0	100.0	93.4	89.1	89.9	88.4	89.5	89.5	89.1	89.5	89.1	89.5	89.9	88.8	88.4	93.0	93.4	89.5	89.1	88.0	64.3	2		
3	0.0	0.0	93.4	89.1	89.9	88.4	89.5	89.5	89.1	89.5	89.1	89.5	89.9	88.8	88.4	93.0	93.4	89.5	89.1	88.0	64.3	3		
4	7.1	7.1	7.1	89.5	89.5	88.8	89.9	89.9	89.9	89.5	89.5	89.9	89.9	89.1	88.8	91.1	91.5	89.9	89.5	89.1	66.3	4		
5	12.1	12.1	12.1	11.6	99.2	99.2	99.2	98.8	98.4	97.7	97.3	96.9	96.9	96.1	96.5	88.4	88.0	99.6	99.2	98.1	64.7	5		
6	11.1	11.1	11.1	11.6	0.8	98.4	98.4	98.1	97.7	96.9	96.5	96.1	96.1	95.7	87.6	87.2	98.8	98.4	97.3	64.7	6			
7	13.1	13.1	13.1	12.6	0.8	1.6	98.4	98.1	97.7	97.7	97.3	96.9	96.9	96.1	96.5	87.6	87.2	98.8	98.4	97.3	63.2	7		
8	11.6	11.6	11.6	11.1	0.8	1.6	1.6	99.6	99.2	98.4	98.1	97.7	97.7	96.9	97.3	88.8	88.4	99.6	99.2	98.1	64.3	8		
9	11.6	11.6	11.6	11.6	11.2	1.2	2.0	2.0	0.4	99.6	98.1	97.7	97.3	97.3	96.5	96.9	88.8	88.4	99.2	98.8	97.7	63.2	9	
10	12.1	12.1	12.1	11.1	1.6	2.4	2.4	0.8	0.4	97.7	97.3	96.9	96.9	96.1	96.5	88.4	88.0	98.8	98.4	97.3	63.6	10		
11	11.6	11.6	11.6	11.1	2.4	3.2	2.4	1.6	2.0	2.4	99.6	99.2	99.2	98.4	98.8	88.8	88.4	98.1	97.7	96.5	63.6	11		
12	12.1	12.1	12.1	11.6	2.8	3.6	2.8	2.0	2.4	2.8	0.4	98.8	98.8	98.8	99.2	88.4	88.0	97.7	97.3	96.1	63.2	12		
13	11.6	11.6	11.6	11.1	3.2	4.0	3.2	2.4	2.8	3.2	0.8	1.2	98.4	97.7	98.1	88.0	88.4	97.3	96.9	95.7	64.0	13		
14	11.1	11.1	11.1	11.1	3.2	4.0	3.2	2.4	2.8	3.2	0.8	1.2	1.6	97.7	98.1	89.1	88.8	97.3	96.9	95.7	63.6	14		
15	12.6	12.6	12.6	12.1	4.0	4.0	4.0	3.2	3.6	4.0	1.6	1.2	2.4	2.4	98.8	87.2	86.8	96.5	96.1	95.0	63.2	15		
16	13.1	13.1	13.1	12.6	3.6	4.5	3.6	2.8	3.2	3.6	1.2	0.8	2.0	2.0	1.2	87.6	87.2	96.9	96.5	95.3	62.8	16		
17	7.5	7.5	7.5	9.8	13.0	14.0	14.0	12.5	12.6	13.0	12.5	13.0	13.5	12.0	14.5	14.0	99.6	88.8	88.4	88.4	67.8	17		
18	7.0	7.0	7.0	9.3	13.5	14.5	14.5	13.0	13.1	13.5	13.0	13.5	13.0	12.5	15.0	14.5	0.4	98.4	88.0	88.0	67.8	18		
19	11.6	11.6	11.6	11.1	0.4	1.2	1.2	0.4	0.8	1.2	2.0	2.4	2.8	2.8	3.6	3.2	12.5	13.0	99.6	98.4	64.3	19		
20	12.1	12.1	12.1	11.6	0.8	1.6	1.6	0.8	1.2	1.6	2.4	2.8	3.2	3.2	4.0	3.6	13.0	13.5	0.4	98.1	64.3	20		
21	13.6	13.6	13.6	12.1	2.0	2.8	2.8	2.0	2.4	2.8	3.6	4.0	4.5	4.4	5.3	4.9	13.0	13.5	1.6	2.0	64.7	21		
22	47.4	47.4	47.4	44.3	48.1	48.1	49.7	48.9	49.6	48.9	49.7	48.1	48.8	49.7	51.5	43.6	43.6	48.9	48.9	48.1	64.7	22		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		

Slika 20: Prikaz odstotka identičnih nukleotidov med sevi PRRS, ki smo jih ugotovili na šestih različnih farmah.

Figure 20: Percentage identity in nucleotide between the samples from six different farms.

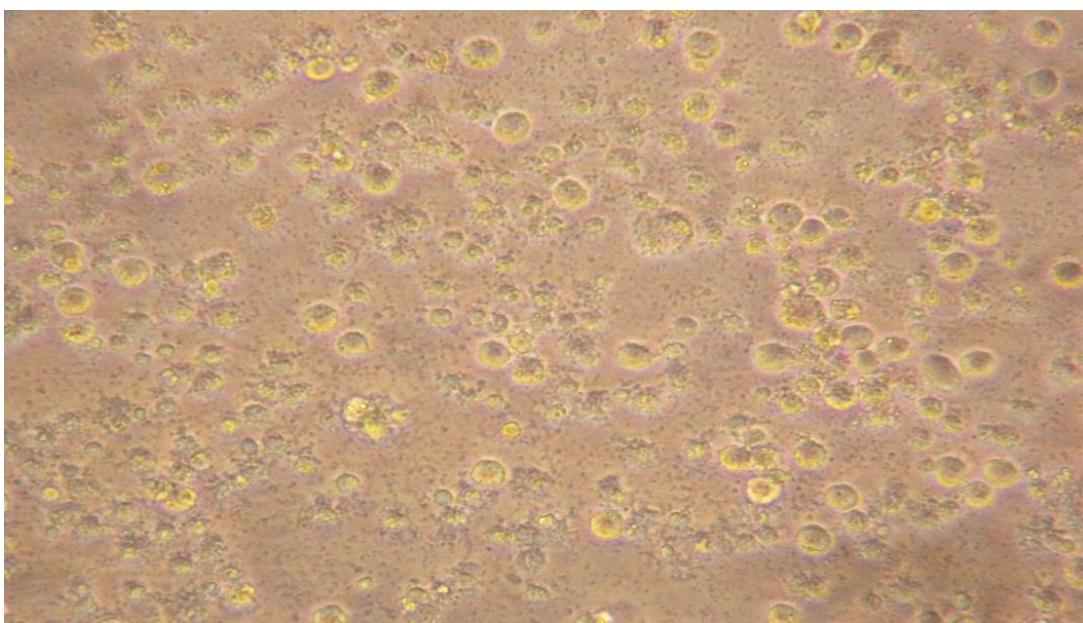
4.10.2 Izolacija virusa na PAM iz serumov

Izolacijo virusa PRRS smo izvajali na PAM. Najprej smo s poskušanjem določili ustreznost gostoto PAM na mikroplošči tako, da so PAM celice pokrivale celotno površino (slika 21). Iz ene ampule smo lahko pripravili največ dve mikroplošči, na kateri smo po enourni inkubaciji nanesli preiskovane vzorce in vključili pozitivne in negativne kontrole. Vzorce in kontrole smo dnevno odčitali pod svetlobnim mikroskopom in beležili morebiten pojav citopatskega efekta (CPE). Z opisano metodo smo uspešno izolirali virus PRRS iz 15 preiskovanih vzorcev s treh različnih farm. Virus PRRS smo v okviru te študije prvič izolirali v Sloveniji. V večini primerov smo pojav CPE ugotovili v I. pasaži (slika 22). Po izolaciji virusa PRRS smo virus namnožili in izvedli titracijo dveh izoliranih virusov PRRS. Titer virusa smo določali na PAM z 10-kratnimi razredčitvami namnoženega seva. Ugotovljen titer virusa je znašal $10^{5.625}$ TCID₅₀ in $10^{5.125}$ TICD₅₀.



Slika 21: Pljučni alveolarni makrofagi po 48 urah inkubacije (negativna kontrola).

Figure 21: Pulmonary alveolar macrophages after 48 hours of incubation (negative control).



Slika 22: Pljučni alveolarni makrofagi po 48 urah inkubacije. Viden je CPE po inokulaciji s pozitivnim vzorcem (pozitiven rezultat izolacije virusa PRRS).

Figure 22: Pulmonary alveolar macrophages after 48 hours incubation. After inoculation of positive samples, the CPE is visible (positive result of isolation of PRRS).

5 RAZPRAVA

Okužbe z virusom PRRS pomembno vplivajo na ekonomiko prašičereje po vsem svetu (Neumann in sod., 2005). V letu 2011 so v ZDA izgube zaradi PRRS presegale 664 milijonov \$ (populacija prašičev je 65,900,000) (Morrison, 2012). Ocenjene letne izgube zaradi okužbe z virusi PRRS so v Sloveniji v letu 2010 znašale 2.045.107 EUR. Izračun temelji na formuli, ki jo je izdelal Bob Morrison (Morrison, 2011a) in v kateri smo upoštevali, da je v Sloveniji 30.000 plemenskih svinj, da je prevalenca PRRS 48 % ter da je cena krme 0,25 EUR/kg. Izračunali smo tudi, da znašajo letne izgube na okuženi farmi s 50 plemenskimi prašiči 20.363 EUR. Od tega je 55,30 EUR izgub pri vsaki breji svinji, 4,60 EUR je izgub na odstavljenca ter 7 EUR izgub na prašiča v obdobju predpitanja in pitanja. Pri omenjenih izračunih gre zgolj za oceno škode, ki pa ne temelji na dejanskih meritvah zabeleženih škod v okuženih rejah ali dejanskih razlikah med rejami, ki so v akutni ali endemični fazì bolezni (Štukelj, 2012).

Po okužbi se rejci srečujejo z izgubami, zato začnejo iskati pomoč zoper PRRS, saj se bolezen brez ukrepanja ne ozdravi sama od sebe. Možna ukrepa v okuženi rejih sta kontrola ali pa eliminacija bolezni. Burns (2006) je kot ekonomsko najboljšo rešitev predlagal odstranitev povzročitelja iz reje. Metode, po katerih lahko posegamo, so depopulacija/repopulacija, testiranje in izločitev pozitivnih živali, imunizacija (naravna prekužitev, vakcinacija, serumizacija) in kot dopolnilni metodi delna depopulacija in zgodnja odstavitev (Dee in Molitor, 1998; Torremorell in Christianson, 2002; Torremorell in sod., 2003; Zimmerman in sod., 2006; Cho in Dee, 2006; Corzo in sod., 2010; Štukelj in Valenčak, 2012; Zimmerman in sod., 2012).

Eliminacijo PRRS laže dosežemo na farmah, kjer so posamezne proizvodne faze na različnih lokacijah (Torremorell in Christianson, 2002). Farme, ki smo jih vključili v študijo, so imele vse proizvodne faze na isti lokaciji, zaradi česar smo že na začetku študije predvidevali, da bomo eliminacijo teže dosegli. Po podatkih iz literature je eliminacija PRRS uspela tam, kjer so preprečili vnos virusa PRRS v rejo, kroženje virusa med posameznimi kategorijami in znotraj posameznih kategorij. Kroženje virusa v rejih preprečimo z notranjimi biovarnostnimi ukrepi, vnos virusa v rejo pa preprečimo z zunanjimi biovarnostnimi ukrepi (Torremorell in Christianson, 2002; Dee in sod., 2003; Pitkin in sod., 2011). Za uspešno eliminacijo PRRS sta torej pomembni tako notranja kot zunanja biovarnost. Lastniki rej, ki smo jih vključili v študijo, so se obvezali, da bodo izvajali predpisane zunanje in notranje biovarnostne ukrepe (dvojna

zpora reje, uporaba preverjeno negativnega semena, ločene kategorije prašičev po prostorih, preoblačenje in preobuvanje, sistem reje »all in/all out«, uporaba razkuževalnih barier, ločen prostor za bolne prašiče, deratizacija in dezinsekcija). Dvojna zapora reje je nujen ukrep, ki ga moramo izvesti na okuženi farmi, če želimo doseči eliminacijo PRRS (Torremorell in sod., 2003). Z uvedbo dvojne zapore na farmi začasno prenehamo z vnosom novih prašičev na farmo in ne dodajamo lastnih mladic v plemensko čredo najmanj šest mesecev.

Z našo raziskavo smo žeeli ugotoviti, katera metoda imunizacije je primerna za eliminacijo PRRS na naših farmah. Poudariti je treba, da je bila Slovenija vse do vstopa v EU leta 2004 prosta PRRS, karantene za uvožene živali so bile obvezne, poleg tega pa so naši prašičerejci trgovali predvsem znotraj meja Slovenije, kjer je bilo zdravstveno stanje prašičev precej ugodno (Valenčak, 2004). Rejci so po vstopu v EU z odobravanjem sprejeli ukinitve obveznih karanten in pričeli kupovati prašiče brez predhodnih laboratorijskih preiskav na PRRS (in tudi na večino drugih bolezni). Zaradi te spremembe se je PRRS vnesel v državo z nakupom prašičev iz tujine (Štukelj in Valenčak, 2008; 2010). Po vnosu nove virusne bolezni v državo se večina rejcev še ni zavedala, kako pomembni sta zunanja in notranja biovarnost, s katerima bi preprečili širjenje virusa na neokužene farme. Bolezen se je razširila v številne reje, v katerih smo ugotavljal genetsko med seboj zelo sorodne viruse PRRS (Toplak in sod., 2010). V severovzhodnem delu Slovenije, kjer je največ prašičev, so se okužile številne farme in v letih 2009 do 2011 smo ugotavljal različne seve virusa PRRS (Toplak in sod., 2010; Toplak in sod., 2012).

Pozitivne reje, ki smo jih vključili v našo študijo, smo izbrali na podlagi pripravljenosti rejcev za sodelovanje in uvedbo specifičnih ukrepov na farmi, ki bi pripeljali do eliminacije PRRS. Osem izbranih rej je na območju intenzivne prašičereje v severovzhodnem delu Slovenije, ena reja pa je locirana na Dolenjskem. Velikost reje je bila pomembno merilo pri odločitvi za metodo eliminacije PRRS.

5.1 ELIMINACIJA PRRS Z NARAVNO PREKUŽITVIJO

Eliminacijo PRRS z naravno prekužitvijo smo izvajali na treh manjših farmah, ki so imele 7, 12 in 15 plemenskih svinj. Najprej smo na vseh treh farmah uvedli dvojno zaporo reje. Dvojna zapora namreč zagotovi ustrezne razmere za naravno prekužitev celotne plemenske črede s sevom PRRS, ki je na farmi. Po nekaj mesecih lahko pričakujemo, da bomo pri večini plemenskih prašičev dokazali specifična protitelesa proti virusu PRRS, kar prepreči nadaljnjo

kroženje virusa (Torremorell in Christianson, 2002; Dee, 2003). Prva faza naravne prekužitve traja 1 do 2 meseca. V tem času se vsi prašiči okužijo z virusom PRRS, po 3 do 4 mesecih po akutni okužbi pa si prašiči opomorejo. Po 4 do 6 mesecih postane plemenska čreda stabilna, kar pomeni, da imajo plemenski prašiči v krvi specifična protitelesa, nimajo pa virusa (Torremorell in Christianson, 2002; Dee, 2009).

Na farmi 1 smo pred ukrepanjem ugotovili 41,3 % na PRRS negativnih plemenskih prašičev in 58,7 % pozitivnih. Iz podobnega izhodiščnega stanja smo začeli eliminacijo PRRS tudi na farmi 2, kjer smo pred ukrepanjem dokazali 40 % negativnih in 60 % nizko pozitivnih plemenskih prašičev. Zaradi visokega odstotka plemenskih prašičev negativnih na PRRS smo v začetku študije domnevali, da virus ne kroži več v plemenski čredi. Na obeh farmah smo odvzeli vzorce tudi pitancem, pri katerih nismo dokazali protiteles, kar potrjuje, da virus v času naše študije ni več krožil na farmi 1 in 2. Iz rezultatov zaporednega vzorčenja na farmi 1 in 2 lahko sklepamo, da se je naravna prekužitev farme začela že pred začetkom študije, kar je zaustavilo kroženje virusa. Že na začetku študije smo ugotovili visok odstotek glede na protitelesa negativnih prašičev. Na farmi 1 32 mesecev in na farmi 2 22 mesecev po začetku ukrepanja pri nobenem od preiskanih prašičev nismo več ugotovili protiteles. Nekateri avtorji poročajo, da so protitelesa proti virusu PRRS dokazljiva še 10 mesecev (Nielsen in Bøtner, 1997; Drew, 2000; Zimmerman in sod., 2012, Mateu in Diaz, 2008), v našem primeru pa smo ugotovili, da so se protitelesa ohranjala pri posameznih prašičih še vsaj 17 mesecev.

Na farmi 1 smo pri isti plemenski svinji 4 mesece in 7 mesecev po začetku ukrepanja v ELISA dokazali visoko vrednost S/P, česar nismo pričakovali, ker se je hkrati večalo število negativnih plemenskih prašičev. Podobno se je zgodilo na farmi 2, ko smo po začetku ukrepanja ugotovili eno plemensko svinjo z visoko vrednostjo S/P, pri kasnejših vzorčenjih pa prašičev z visokimi vrednostmi S/P nismo več ugotovili. Pojav dveh visoko pozitivnih rezultatov bi lahko bila posledica specifičnosti ELISA, ki ni standartna. Farmi sta dobili status, da sta prosti PRRS.

Izhodiščno stanje farme 3 je bilo drugačno kot na farmah 1 in 2, saj smo pri vseh plemenskih prašičih dokazali prisotnost specifičnih protiteles že na začetku študije. Po uvedbi dvojne zapore na tej farmi se je 3 mesece po začetku ukrepanja odstotek visoko pozitivnih razpolovil (iz 80 % na 41,2 %), dokazali pa smo že 11,8 % negativnih plemenskih prašičev. Rezultati so v skladu z ugotovitvami nekaterih avtorjev, ki poročajo, da se po 3 mesecih začne zmanjševati delež visoko pozitivnih plemenskih prašičev (Torremorell in Christianson, 2002; Dee, 2009).

Rejec je po treh mesecih prenehal z dvojno zaporo reje in je v plemensko čredo premestil lastno mladico in plemensko svinjo iz reje z nepoznanim statusom, kar se je očitno pokazalo tudi v povečanem odstotku visoko pozitivnih prašičev 6 mesecev po pričetku ukrepanja. Zaradi najmanj 6-mesečne zapore reje je treba pred zaporo namestiti v plemensko čredo dovolj veliko število mladic, ki so hkrati z ostalo plemensko čredo izpostavljene farmskemu tipu virusa in tako se lahko izognemo dodajanju prašičev v plemensko čredo v času zapore (Torremorell in sod., 2003; Morrison, 2011b).

Iz rezultatov ELISA na vzorcih plemenske črede 6 mesecev po začetku ukrepanja smo ugotovili, da je v plemenski čredi ponovno zakrožil virus PRRS v obdobju med 3. in 6. mesecem, z metodo RT-PCR pa v odvetih vzorcih 6 mesecev po ukrepanju nismo dokazali virusne nukleinske kisline pri nobenem plemenskem prašiču. Viremija pri plemenskih prašičih traja od 4 do 21 DPO (Christopher-Hennings in sod., 2001; Kittawornrat in sod., 2010) in zato je seveda razumljivo, da nismo dokazali virusne nukleinske kisline. Vendar pa smo dokazali virusno nukleinsko kislino pri 8-tedenskih tekačih 9 mesecev po ukrepanju na farmi 3. Ugotovili smo tudi dve tretjini pitancev pozitivnih na protitelesa proti virusu PRRS, kar tudi potrjuje ugotovljeno prisotnost virusa na farmi.

Za uspešno eliminacijo PRRS so pomembni tako zunanji kot notranji biovarnostni ukrepi (Otake in sod., 2010; Pitkin in sod., 2011). Kljub temu, da na farmi 1 in 2 pred začetkom naše raziskave niso izvajali vseh biovarnostnih ukrepov, jim je uspelo zaustaviti kroženje virusa na farmi. V primerjavi s farmo 3 so imeli kategorije prašičev ločene po prostorih, redno so se preoblačili in preobuvali, imeli pa so tudi ločen prostor za bolne prašiče (farma 1). Na farmi 1 in 2 so od začetka študije izvajali predpisane biovarnostne ukrepe, na farmi 3 pa so po treh mesecih opustili večino predpisanih ukrepov. Pred pričetkom študije je lastnik farme 1 vozil svinje na oploditev k okoliškim merjascem, katerih status glede PRRS ni bil znan. Po našem opozorilu, da je to lahko vir okužbe, lastnik ni več vozil svojih svinj na oploditev, ampak je semenil sam, s semenom iz osemenjevalnega središča, prostega PRRS. V prostoru porodnišnice je bil ob začetku študije bolnišnični boks, ki ga je po naših navodilih odstranil, bolne prašiče pa je usmrtil. Rejec je 17 mesecev po začetku ukrepanja vnesel v rejo preko karantene nadomestno negativno mladico. Pred pričetkom naše raziskave ni dopolnjeval črede na takšen način, kasneje pa je omenjeno premeščanje nadomestnih mladic postalo običajno. Na farmi 1 smo uspešno eliminirali virus PRRS in preprečili ponovni vnos virusa PRRS kljub dejству, da je bilo v radiju

1 kilometer 37 prašičjih farm z neznanim statusom glede PRRS, kar je pomenilo stalno nevarnost okužbe s sosednjih farm.

Lastnik farme 2 pred našim prihodom ni izvajal vseh biovarnostnih ukrepov. Dosledno jih je začel uvajati šele ob pričetku študije. Kategorije pitancev na farmi skoraj ni, saj jih prodajo že kot odojke. Tako je manj tekačev in manj prašičev v fazi predpitanja in pitanja. Po mnenju nekaterih avtorjev je to najobčutljivejša populacija prašičev in glavni vir virusa na farmi. Po padcu kolostralne zaščite lahko pride v okuženi rej v tej populaciji do razmnoževanja virusa in širjenja na druge kategorije prašičev (Dee in sod., 1997; Dee in sod., 2003). Od začetka študije in po ukinitvi dvojne zapore so pričeli vnašati na farmo le negativne mladice preko karantene. Po našem priporočilu uporabljajo negativno seme iz osemenjevalnega središča prostega PRRS. Iz rezultatov testiranja lahko sklepamo, da smo na farmi 2 z uvedbo biovarnostnih ukrepov preprečili ponoven vnos virusa PRRS iz najbližje farme, ki je oddaljena le nekaj metrov, prav tako pa iz farm v neposredni okolici. Po podatkih iz literature naj bi bile farme, primerne za naravno prekužitev takšne, ki imajo ločene proizvodne faze in so dovolj oddaljene od drugih farm. Tudi na takšnih farmah je uspešnost te metode 90-odstotna (Zimmerman in sod., 2012).

Na podlagi rezultatov dokazovanja protiteles in nukleinske kisline virusa PRRS v obdobju 9 mesecev po uvedbi ukrepov ugotavljam, da na farmi 3 nismo eliminirali virusa PRRS. Pitkin in sodelavci (2011) navajajo, da je neupoštevanje zunanjih in notranjih biovarnostnih ukrepov glavni razlog za ohranjanje virusa na farmi oz. ponovnega vnosa virusa PRRS na farmo. Pri oceni upoštevanja biovarnostnih ukrepov na farmi 3 smo ugotovili nekatere bistvene pomanjkljivosti, zaradi katerih se je virus ohranjal na farmi. Rejec namreč ni izvajal dvojne zapore reje, kategorij prašičev ni imel ločenih po prostorih, ločen prostor za bolne živali pa je uredil šele 6 mesecev po začetku ukrepanja. Ker je reja na samem, aerogeni prenos virusa iz sosednje farme ni verjeten, saj v okolici nekaj deset kilometrov ni drugih prašičjih farm. Po virih iz literature se virus PRRS najpogosteje vnese z okuženimi prašiči (Dee, 2003; Zimmerman in sod., 2012), kar je imelo za posledico na primer okužbo farme 3. Prav tako je po vsej verjetnosti neupoštevanje dvojne zapore reje in nekaterih drugih biovarnostnih ukrepov povzročilo, da nam ni uspelo eliminirati virusa PRRS. Ker rejec ni spoštoval dogovora glede ukrepov, smo raziskavo na farmi 3 prekinili 9 mesecev po začetku študije, saj tako nismo pričakovali izboljšanja stanja v rej. Naše ugotovitve so skladne z ugotovitvami drugih avtorjev, da eliminacija PRRS ni možna,

če se ne upoštevajo biovarnostne zahteve in zapora reje (Dee, 2003; Otake in sod., 2010; Pitkin in sod., 2011).

Na podlagi izvajanja eliminacije PRRS z naravno prekužitvijo iz treh pozitivnih rej lahko potrdimo, da je naravna prekužitev učinkovita metoda za eliminacijo PRRS, če rejec izvaja predpisane biovarnostne ukrepe.

5.2 ELIMINACIJA PRRS S SERUMIZACIJO

Serumizacijo smo izvedli na treh farmah, ki so imele 61, 74 in 132 plemenskih prašičev. S postopkom serumizacije smo cepili i/m celotno plemensko čredo isti dan z inokulumom, ki je vseboval hlevski sev virusa PRRS. Inokulum smo pripravili tako, da smo najprej odvzeli kri tekačev, pri katerih smo pričakovali največ virusa. Po laboratorijskem testiranju vzorcev smo pripravili inokulum iz serumov, v katerih smo dokazali virus PRRS. Na vseh treh farmah smo serumizacijo izvajali le v plemenski čredi. Po izvedeni serumizaciji smo pričakovali tvorbo specifičnih protiteles proti virusu PRRS in zaščito proti homolognemu sevu virusa PRRS (Lager in sod., 1999; Diaz in sod., 2012a; Štukelj in Valenčak, 2012). Po približno treh mesecih smo preverjali uspešnost serumizacije z ugotavljanjem protiteles v ELISA (Dee, 2009; Štukelj in Valenčak, 2012).

Na farmi 4 smo pred izvedbo serumizacije dokazali protitelesa pri 98,6 % plemenskih prašičev. Dva meseca po serumizaciji smo ugotovili podoben odstotek pozitivnih prašičev v ELISA. Po izkušnjah iz študije bi bilo bolj smiselno najprej ugotoviti serološki profil v plemenski čredi in šele nato opraviti serumizacijo. Primerjava S/P vrednosti pri posameznih prašičih je pokazala, da smo s serumizacijo dosegli pričakovani učinek predvsem pri prašičih, ki so pred serumizacijo v ELISA reagirali nizko pozitivno in pozitivno (graf 9, graf 10). Šest mescev po serumizaciji se je zmanjšal odstotek visoko pozitivnih plemenskih prašičev, kar smo pričakovali, ker količina protiteles upade, če virus ne kroži več. Šest mesecev po izvedeni serumizaciji v plemenski čredi nismo dokazali na virus PRRS pozitivnih prašičev, kar je v skladu z rezultati ELISA. Šest mesecev je obdobje, ki je potrebno za vzpostavitev stabilne plemenske črede (Torremorell in Christianson, 2002; Dee, 2003; Corzo in sod., 2010).

Enajst mesecev po serumizaciji nismo dokazali nukleinske kisline virusa PRRS pri tekačih in pitancih, to je pri prašičih, starih 8 in 14 tednov, virus pa smo dokazali 13 mesecev po

serumizaciji pri 6 in 10-tedenskih tekačih. Pri ponovnem pregledu načina vzorčenja, ki smo ga izvajali na farmi 4, smo ugotovili, da bi bilo potrebno 6 mesecev po serumizaciji preiskati tudi kategorijo tekačev in pitancev. Enajst mesecev po serumizaciji pa bi bilo treba odvzeti vzorce tekačem in pitancem, starih 6, 8, 10, 12 in 14 tednov. Po vsej verjetnosti se je virus PRRS na farmi 4 ves čas ohranjal pri tekačih in pitancih.

S primerjavo nukleotidnega zaporedja širih virusov PRRS, dokazanih v letih 2009, 2010 in 2011 na farmi 4, smo pri njih ugotovili od 98,4 do 100 odstotkov identičnih nukleotidov, kar potrjuje domnevo, da je v času študije na farmi 4 ves čas krožil isti sev virusa.

Rejec se je v začetku študije obvezal, da bo izvajal predpisane biovarnostne ukrepe na farmi 4, vendar smo že 2 meseca po serumizaciji opazili, da večine dogovorjenih ukrepov ni izvajal. Zato smo tega rejca ponovno opozorili, da so ukrepi bistveni, če želimo virus eliminirati. Šest mesecev po serumizaciji ni izvajal dvojne zapore, posameznih kategorij prašičev ni imel v ločenih prostorih, delavci se niso preoblačili in preobovali in na farmi niso izvajali sistema reje »all in/all out«. Naše ugotovitve so skladne z ugotovitvami drugih avtorjev, da brez biovarnostnih ukrepov in zapore reje eliminacija ni možna (Torremorell in Christianson, 2002; Otake in sod., 2010; Pitkin in sod., 2011). Eliminacija PRRS na farmi 4, kljub serumizaciji ni uspela, ker rejec ni izvedel potrebnih biovarnostnih ukrepov.

Farma 5 je imela od vseh rej v študiji največje število plemenskih prašičev. Na farmi smo pred izvedbo serumizacije ugotovili 92,7 odstotkov pozitivnih prašičev, od tega jih je po naši razdelitvi v ELISA reagiralo 26,2 % visoko pozitivno, 46,8 % pozitivno in 17,7 % nizko pozitivno. Rejec je ob začetku študije začel izvajati dvojno zaporu. Pred serumizacijo smo ugotovili 6,7 % plemenskih prašičev brez protiteles proti virusu PRRS. S I. serumizacijo smo dosegli povišanje odstotka visoko pozitivnih plemenskih prašičev, prav tako pa se je zmanjšal odstotek negativnih prašičev. Pred izvedbo II. serumizacije smo v reji ugotovili virus genetsko podoben tistemu, ki smo ga uporabili za I. serumizacijo. Vendar smo obenem domnevali, da je šlo za vnos novega virusa od zunaj. Zaradi 6 negativnih plemenskih prašičev in ugotovitve novega virusa smo v reji izvedli II. serumizacijo. Obe serumizaciji sta imeli v reji pozitiven učinek, saj smo pri večini negativnih prašičev, nizko pozitivnih in pozitivnih plemenskih prašičev ugotovili povišanje vrednost S/P po izvedeni serumizaciji (graf 14, 15, 16).

Ker smo po I. serumizaciji v reji dokazali novo genetsko različico virusa PRRS, smo rejca natančneje izprašali o izvajanju biovarnostnih ukrepov na farmi. Ugotovili smo, da je rejec že 3 mesece po I. serumizaciji pripeljal v plemensko čredo nadomestne mladice, kar se je kasneje ponovilo še nekajkrat. Tako je izvajal dvojno zaporo reje samo tri mesece, iz spremljanja identitete živali preko identifikacijskih številk prašičev smo rejcu dokazali kršitev dvojne zapore. Čeprav je imela farma 5 kategorije prašičev ločene po prostorih, se delavci, ki so oskrbovali prašiče, niso preoblačili in preobuvali prav tako se rejec ni odločil za izvajanje sistema »all in/all out«. Na farmi prav tako niso imeli bolnih prašičev v ločenem prostoru. Žal nam rejca ni uspelo prepričati o pomenu posameznih biovarnostnih ukrepov, in zato v reji nismo dosegli zastavljenega cilja eliminacije PRRS s farme.

Na osnovi podatkov laboratorijskih preiskav v času študije lahko domnevamo, da smo začasno zaustavili kroženje virusa v plemenski čredi, vendar testiranja, ki smo jih opravili z metodo RT-PCR na vzorcih tekačev in pitancev, kažejo, da se je virus ves čas zadrževal na farmi. Dodatno potrditev, da nismo zaustavili kroženja virusa v reji, smo dobili z rezultati ELISA 13 in 17 mesecev po II. serumizaciji, ko smo ugotovili, da je več kot polovica pregledanih tekačev bodisi pozitivna bodisi visoko pozitivna. Po vsej verjetnosti se je virus občasno vnesel v plemensko čredo, čeprav tega s testiranjem vzorcev z metodo RT-PCR nismo dokazali. Našo domnevo potrjujejo tudi ugotovitve zvišanja vrednosti S/P pri posameznih prašičih 6 in 10 mesecev po serumizaciji (graf 15, 16, 17). Pri naslednjem odvzemu 3 mesece po serumizaciji smo namreč pričakovali dvig S/P vrednosti, po 6 mesecih pa upadanje vrednosti S/P (Dee, 2003; Torremorell in Christianson, 2002; Corzo in sod., 2010).

Primerjava 15 pozitivnih vzorcev, odvzetih med leti 2010 in 2012, katerim smo določili nukleotidno zaporedje, je pokazala prisotnost dveh genetskih skupin virusa na farmi 5. Iz primerjave odstotkov identičnosti nukleotidnih zaporedij v regiji ORF 7 lahko sklepamo, da gre za zelo podobna seva virusa PRRS, vendar se je na filogenetskem drevesu jasno pokazalo, da virusa izhajata iz dveh različnih virov. Da bi dobili zanesljive podatke o številu sevov v reji, je treba na posameznih farmah preiskati večje število pozitivnih vzorcev. To potrjujejo tudi naši rezultati, saj smo z določitvijo in primerjavo nukleotidnih zaporedij v 15 pozitivnih vzorcih dokazali, da sta na farmi populaciji dveh različnih virusov, čeprav ob posameznih vzorčenjih nismo ugotavljali obeh. Iz primerjave nukleotidnih zaporedij smo ugotovili tudi zamenjavo posameznih nukleotidov, ki v določenem obdobju nastajajo znotraj iste farme in imajo za

posledico prenos nove genetske informacije v naslednjo virusno generacijo. To potrjuje tudi razvrstitev posameznih pozitivnih vzorcev na filogenetskem drevesu, kjer je razvidno, da so najstarejši vzorci razporejeni najbliže razcepišču drevesa, najmlajši pa so od razcepišča najbolj oddaljeni (slika 19).

Kljub dvakratni serumizaciji nismo eliminirali virusa PRRS, ker na farmi 5 niso izvedli niti minimalnih biovarnostnih ukrepov, ki naj bi zaustavili kroženje virusa.

Na farmi 6 smo pred serumizacijo ugotovili 24 % visoko pozitivnih plemenskih prašičev, 48 % pozitivnih, 20 % nizko pozitivnih ter 8 % negativnih. Pred izvedbo serumizacije je bilo v plemenski čredi 50 prašičev, vendar je rejec potem dodal še 12 mladic zaradi kasnejše zapore reje. Takšen način dodajanja z namenom, da bi preprečili ekonomsko izgubo zaradi manjšega števila pujskov, ki je posledica naravnega remonta plemenskih svinj, omenajo tudi drugi avtorji (Morrison, 2012). Z začetkom študije je rejec takoj uvedel predpisane biovarnostne ukrepe in v času spremeljanja reje nismo ugotavliali bistvenih odstopanj od njih. V farmi smo izvedli serumizacijo pri vseh 62 plemenskih prašičih, vključno z 12 mladicami. Učinkovitost serumizacije smo potrdili z vzorčenjem tri mesece kasneje, ko smo ugotovili povišanje odstotka visoko pozitivnih prašičev (graf 19). Pri primerjavi vrednosti S/P posameznih prašičev smo ugotovili podoben odziv po serumizaciji, kot smo ga opisali pri farmi 5. Prav tako smo na farmi 5 ugotavliali posamezne živali, pri katerih se je vrednost S/P nepričakovano zvišala 6 in 9 mesecev po serumizaciji (graf 20, 21, 22), kar lahko pomeni, da so se nekateri prašiči v plemenski čredi po padcu zaščitnega titra protiteles ponovno okužili. Šest mesecev po serumizaciji smo v plemenski čredi ugotovili upadanje odstotka visoko pozitivnih in pozitivnih prašičev, kar je v skladu s pričakovanji, če v reji ne kroži virus. Devet mesecev po izvedbi serumizacije se je zvišal odstotek pozitivnih z 30,8 na 44,2, česar nismo pričakovali. Pri natančnejši analizi individualnih vzorcev smo ugotovili povišanje vrednosti S/P pri treh plemenskih prašičih, kar je posledica okužbe z virusom PRRS v obdobju med 6. in 9. mesecem po serumizaciji. Kljub temu ne pri 6. niti pri 9. mesecih po serumizaciji v plemenski čredi nismo dokazali virusa PRRS. V istem obdobju pa smo ga dokazali pri 10 in 12 tednov starih prašičih. Zaradi ohranjanja virusa PRRS v kategoriji tekačev in pitancev smo rejcu predlagali delno depopulacijo, za katero pa se ni odločil. Delna depopulacija se je namreč pokazala kot uspešen dodatni ukrep pri eliminaciji PRRS ob predpostavki, da rejec izvaja biovarnostne ukrepe (Dee in sod., 1993; Torremorrel in Christinanson, 2002; Zimmerman in sod., 2012). Čeprav je rejec

izvajal sistem reje »all in/all out« ter redno čistil in razkuževal prostore, smo pri tekačih in pitancih ugotavliali virus PRRS, razen pri vzorčenju 12 mesecev po serumizaciji.

Primerjava rezultatov ELISA v vzorcih tekačev in pitancev v starosti 6 do 14 tednov, ki smo jih odvzeli 9 in 12 mesecev po serumizaciji, kaže na to, da virus v tej kategoriji ne kroži več (tabela 23). To potrjujejo tudi rezultati vrednosti S/P 12 mesecev po serumizaciji, saj smo edine 4 pozitivne pitance ugotovili v starostni skupini 14 tednov (najstarejši vzorčeni pitanci), visoko pozitivnih prašičev pa nismo ugotovili. Za reje 6 obstaja velika verjetnost, da potrdimo eliminacijo PRRS ob vzorčenju 15 mesecev po serumizaciji. Za kontrolo uspešnosti eliminacije PRRS je potrebno odvzeti vzorce vsem prašičem v plemenski čredi, tekačem in pitancem v starosti 6, 8, 10, 12, in 14 tednov pa tudi pitancem pred zakolom.

Natančno izvajanje biovarnostnih ukrepov na farmi 6 se je pokazalo tudi z uspešno eliminacijo PRRS iz okužene farme. Rejec je na farmi uvedel nekaj bistvenih sprememb, ki so pomembne za zaustavitev kroženja virusa na farmi. Z dvojno zaporo je namreč preprečil nenadzorovan dodajanje pozitivnih prašičev v plemensko čredo, prav tako pa je za obdobje najmanj 12 mesecev preprečil vnos novega seva virusa PRRS na farmo. Čeprav je najbližja okužena farma v neposredni bližini (300 m) in je v naselju še 24 prašičjih farm, novega seva virusa PRRS v spremajanem obdobju na farmi 6 nismo ugotovili. V tem primeru bo težko ohraniti farmo negativno daljše obdobje, saj obstaja nevarnost vnosa virusa PRRS iz okoliških farm. V nekaterih državah se v podobnih primerih odločajo za namestitev filterov hepa v vse prezračevalne sisteme, da bi preprečili aerogeni prenos (Otake in sod., 2010; Zimmerman in sod., 2012).

V Sloveniji smo v pozitivnih rejah ugotavliali viruse PRRS genotipa 1, ki so uvrščeni v 14 različnih genetskih skupin virusa PRRS. Večina ugotovljenih sevov se razlikuje od referenčnega seva Lelystad (Toplak in sod., 2010; Toplak in sod., 2012a). Registrirane vakcine v Sloveniji vsebujejo sev Lelystad. Glede na veliko genetsko raznolikost sevov, ki smo jih ugotovili na vseh treh farmah, je odločitev za serumizacijo obetala dobro možnost, da bi dosegli homologno zaščito (Lager in sod., 1999; Murtaugh in Gezow, 2011; Diaz in sod., 2012a).

Inokulumov, ki smo jih uporabili za serumizacijo, nismo titrirali, saj smo na podlagi podatkov iz literature sklepali, da bo količina virusa zadostna za razvoj imunosti, če infektivna doza znaša od 7 do 247 živih virusnih delcev na prašiča (Pugh in sod., 2006). Nekateri avtorji navajajo, da

lahko intramuskularna inokulacija živega virusa privede do akutnih izbruhov PRRS in posledično do abortusov ter številnih poginov sesnih pujskov in tekačev (Bruner, 2007; Opriessnig in sod., 2007). Na farmah, kjer smo izvedli serumizacijo, takšnih primerov nismo opazili. Vsekakor pa se je treba zavedati, da skupaj z inokulumom lahko prenašamo tudi druge patogene mikrobe, ki so na farmi (Opriessnig in sod., 2007; Corzo in sod., 2010).

5.3 ELIMINACIJA PRRS Z VAKCINACIJO

Pri zasnovi naloge smo postavili hipotezo, da je eliminacija PRRS z vakcinacijo mogoča le v tistih rejah, v katerih kroži sev virusa PRRS, ki je soroden z vakcinalnim virusom. Kot izhodišče za potrditev te hipoteze smo nameravali v raziskavo vključiti tudi pozitivne farme, v katerih kroži virus, soroden virusu PRRS Lelystad. Pri iskanju primernih farm smo naleteli na težavo, da je takšnih farm zelo malo. Po podatkih, ki so jih objavili Toplak in sodelavci (2012b) v študiji o dokazovanju različnih genetskih skupin z molekularnimi metodami v letih 2009 - 2011, je v Sloveniji okrog 5 % pozitivnih rej, v katerih je vakcinalnemu sevu soroden virus. V Sloveniji smo od leta 2009 do 2013 ugotovili in tipizirali viruse PRRS v skupno 111 pozitivnih rejah, le v 7 rejah pa so ugotovili virusu Lelystad soroden sev (arhiv Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarske fakultete). Zato ni bilo mogoče naše hipoteze niti potrditi niti ovreči. Ker pa številni rejci v Sloveniji uporabljajo vakcinacijo, da bi zmanjšali ekonomske škode po okužbi, smo izbrali tri reje, katerih lastniki so se odločili za vakcinacijo in se tudi obvezali, da bodo uvedli predpisane biovarnostne ukrepe in nam dovolili vzorčenje v času študije. V treh izbranih rejah, v katerih smo izvedli vakcinacijo, smo žeeli pridobiti dodatne podatke o dejanskem dogajanju v reji in pridobiti praktične izkušnje, ki bi nam pomagale pri odločitvah ali naj se izvede vakcinacija v pozitivni reji ali ne. Prav tako smo žeeli oceniti, ali vakcinacija prispeva k eliminaciji PRRS s pozitivne farme, če rejec izvaja potrebne biovarnostne ukrepe.

Vakcinacijo smo izvedli na treh farmah, ki so imele 15, 20 in 30 plemenskih prašičev. Na vseh treh farmah smo vakcinirali le prašiče v plemenski čredi. Z vakcinacijo naj bi namreč spodbudili dobro zaščito pred okužbo z virusom PRRS, ki naj bi se s kolostralnimi protitelesi prenesla tudi na pujiske. Nekateri avtorji sicer navajajo, da žive, oslabljene vakcine proti PRRS (ne glede na genotip) spodbujajo razmeroma slab humorálni in celični imunski odziv (Corzo in sod., 2010). To so potrdili tudi Martelli in sodelavci (2009) v študiji, v kateri so z živo oslabljeno

vakcino cepili 20 prašičev. Pri vseh cepljenih živalih so ugotovili protitelesa proti virusu PRRS, vrednosti S/P pa so 28 dni po vakcinaciji znašale od 0,5 do 1.

Na farmi 7 smo tik pred vakcinacijo odvzeli kri celotni plemenski čredi in ugotovili 90 % visoko pozitivnih plemenskih prašičev in 10 % pozitivnih. Spričo omenjenega stanja na farmi seveda ni bilo pričakovati, da bi lahko naša vakcinacija sprožila pri živalih v poskusu upoštevanja vreden dodatni protitelesni imunski odziv. To potrjujejo tudi rezultati ELISA na farmi 7 dva meseca po I. vakcinaciji in dva meseca po II. vakcinaciji. Ob rezultatih dokazovanja specifičnih protiteles se pojavlja dvom, ali je vakcinacija v rejah, kjer poprej ne preverimo imunskega statusa prašičev, ki jih želimo vakcinirati, sploh smiselna. Pri vzorčenjih 2, 5 in 10 mesecev po II. vakcinaciji smo ugotavliali postopno zniževanje odstotka visoko pozitivnih prašičev v plemenski čredi, kar je kazalo na to, da v plemenski čredi virus PRRS ne kroži več. Pri vzorčenju 14 mesecev po drugi vakcinaciji se je odstotek visoko pozitivnih prašičev zvišal na 90, kar je dokaz, da je v obdobju med 10. in 14. mesecem po II. vakcinaciji virus PRRS ponovno zakrožil v plemenski čredi. Štirinajst mesecev po vakcinaciji smo ugotovili podoben serološki profil kot pred I. vakcinacijo. Pred vakcinacijo v rejih 7 nismo vzorčili pri kategorijah tekačev in pitancev v starosti od 6 do 14 tednov, ker po izkušnjah z drugih farm virus v pozitivni rejih lahko potrdimo z metodo RT-PCR. Vzorčenja v teh kategorijah nismo opravili tudi pri naslednjih odvzemih, zato lahko le domnevamo, da se je virus na farmi 7 ves čas ohranjal in se po padcu imunosti v plemenski čredi ponovno vnesel vanjo. Pomanjkljivost vzorčenja, ki smo ga opravili 10 mesecev po II. vakcinaciji, pa je v tem, da smo jemali vzorce samo pri 12- in 14-tedenskih pitancih, ne pa tudi pri 6-, 8-, in 10-tedenskih tekačih. Prav tako nam manjka podatek o tipu virusa, ki je krožil v rejih 14 mesecev po II. vakcinaciji, ker nismo odvzeli vzorcev pri tekačih in pitancih. Kljub temu, da na farmi 7 nismo ugotavliali tipa virusa PRRS, lahko iz geografske lokacije farme 7 in ostalih farm v študiji sklepamo, da je bil v rejih virus, soroden tistim, ki smo jih ugotavliali na farmah 1, 2, 4, 5, 8 in 9. Iz rezultatov študije lahko z veliko gotovostjo domnevamo, da vakcinalni virus ni bil genetsko soroden (homologen) s farmskim sevom virusa. Vakcinacija se v primeru okužbe reje s heterolognim sevom šteje le kot »pomoč pri zmanjševanju« izrazitosti bolezenskih znamenj (Dee, 2003) in zmanjševanju škod zaradi okužbe v pozitivni rejih. V naši študiji nismo spremljali niti kliničnih znamenj niti proizvodnih rezultatov, da bi lahko potrdili izboljšanje enega ali drugega parametra.

Ob pričetku študije se je rejec obvezal, da bo uvedel biovarnostne ukrepe, da bi lahko eliminirali virus iz reje. Že pri naslednjem obisku smo ugotovili, da rejec glede biovarnosti ni ukrenil ničesar. Še 2 meseca po II. vakcinaciji ni uvedel dvojne zapore reje in je še vedno semenil z nepreverjenim semenom. Po našem opozorilu je uporabljal izključno negativno seme iz osemenjevalnega središča prostega PRRS, vendar ni izvedel nekaterih ključnih biovarnostnih ukrepov. Ni namreč ločil kategorij po prostorih, ni uvedel preoblačenja in preobuvanja in ni izvajal sistema all in all out, boks za bolne živali je uredil šele 5 mesecev po drugi vakcinaciji. Pomanjkljivo izvajanje ukrepov je po vsej verjetnosti razlog, da virusa nismo eliminirali in da je ta ponovno zakrožil v reji 14 mescev po II. vakcinaciji. Poleg tega je bila farma v bližini drugih prašičjih farm. Najbližja je oddaljena le 150 m, v radiju 1,2 kilometra pa je bilo še 33 prašičjih farm, kar bi lahko bil potencialni vir okužbe (Otake in sod., 2010).

Podobno kot na farmi 7 smo pred vakcinacijo tudi na farmi 8 ugotovili 60 % visoko pozitivnih plemenskih prašičev ter 40 % pozitivnih. Vakcinacijo smo izvedli le enkrat z živo oslabljeno vakcino. Mesec dni po vakcinaciji bi po podatkih iz literature pričakovali porast vrednosti S/P (Martelli in sod., 2009), vendar je bil zaradi visokega odstotka pozitivnih plemenskih prašičev že pred vakcinacijo ta porast zanemarljiv, kar je primerljivo z rezultati po vakcinaciji na farmi 7. Z rezultati dokazovanja protiteles pri plemenskih prašičih 2 in 6 mesecev po vakcinaciji lahko spremljamo trend zniževanja števila visoko pozitivnih prašičev, kar je pozitiven znak, da virus ne kroži v plemenski čredi. Vendar smo 10 mesecev po vakcinaciji ugotovili 60 % visoko pozitivnih plemenskih prašičev, kar dokazuje, da je virus ponovno v plemenski čredi. Prisotnost virusa pri tekačih in pitancih smo z metodo RT-PCR dokazali 10 mesecev po vakcinaciji, prav tako smo pri večini pitancev ugotovili visoke vrednosti S/P. Po vsej verjetnosti se je virus iz kategorije pitancev prenesel v plemensko čredo podobno, kot na nekaterih drugih farmah iz naše študije. Tako kot na farmi 7 je pomanjkljivo vzorčenje imelo za posledico, da nismo mogli natančno pojasniti trenutnega poteka bolezni na farmi. Šest mesecev po vakcinaciji smo dokazali virusno nukleinsko kislino pri 6-, 8-, 12- in 14-tedenskih prašičih. Rezultati določanja nukleotidnega zaporedja so pokazali 89,5-odstotno identičnost nukleotidov med farmskim sevom virusa PRRS in vakcinalnim sevom Lelystad. Iz literature povzemamo trditev, da je zaščita s homolognim sevom najboljša (Lager in sod., 1999; Murtaug in Genzow, 2011), do neke mere pa obstaja tudi navzkrižna zaščita med heterolognimi sevi virusa (Murtaugh in sod., 2010; Murtaugh in Gezow, 2011; Murtaugh, 2012). Delna navzkrižna zaščita po vakcinaciji je

lahko tudi razlog za kratkotrajno (navadno do 3 mesece trajajoče) izboljšanje, ki ga opisujejo po vakcinaciji na farmi (Corzo in sod., 2010).

Rejec je vse od začetka študije do 6 mesecev po vakcinaciji izvajal dvojno zapore reje, nato pa je zamenjal 2 plemenski svinji z nadomestnima mladicama iz lastne reje. Ves čas naše raziskave je semenil s preverjeno negativnim semenom iz osemenjevalnega središča prostega PRRS. Sprva na farmi niso imeli kategorij ločenih med seboj, nato pa so 6 mescev po vakcinaciji uredili prostore tako, da so kategorije ločili s pregradnimi stenami. Kljub temu ugotavljamo, da rejec ni pravočasno izvedel vseh predpisanih biovarnostnih ukrepov, kar je prispevalo k temu, da cilja eliminacije PRRS na farmi 8 nismo dosegli.

Na farmi 9 lahko iz rezultatov preiskav pozitivnih prašičev na protitelesa pred vakcinacijo razberemo, da smo naše delo začenjali iz drugačnega izhodišča, kot na farmah 7 in 8. Res pa je, da smo pred izvedbo vakcinacije vzorčili le pri tretjini plemenske črede. Ugotovili smo 20 % pozitivnih, 30 % nizko pozitivnih in 50 % negativnih plemenskih prašičev. Vakcinacijo smo z živo oslabelo vakcino izvedli enkrat. Dva meseca po vakcinaciji lahko iz povišanega odstotka pozitivnih prašičev sklepamo o uspešnosti vakcinacije. Čeprav rezultati dokazovanja protiteles v plemenski čredi 5 mesecev po vakcinaciji nakazujejo, da se stanje izboljšuje glede na rezultate 2 meseca po vakcinaciji, pa je ugotovitev virusa v plemenski čredi dokaz, da je vsaj med nekaterimi plemenskimi prašiči v tem času krožil virus. Bistveno se je namreč dvignilo število visoko pozitivnih prašičev 8 mesecev po vakcinaciji. Primer ugotovitve virusa PRRS v plemenski čredi potrjuje naše domneve v zvezi z nekaterimi drugimi farmami, da virus na okuženi farmi vsake toliko časa zakroži v plemenski čredi. Negativni rezultat z metodo RT-PCR nam pove, da virusa PRRS v času odvzema vzorcev ni bilo v vzorcu oziroma pri pregledanem plemenskem prašiču. Iz tega lahko sklepamo, da je pregled plemenske črede z metodo RT-PCR pomemben, vendar je za ugotavljanje prisotnosti virusa tehtnejši pregled tekačev in pitancev v starosti od 6 do 14 tednov.

Nekateri avtorji navajajo, da zaporedne vakcinacije plemenske črede vsak mesec znatno zvišajo odstotek pozitivnih prašičev na protitelesa po vakcinaciji (Dee in Philips, 1998; Cano in sod., 2007a). Iz rezultatov naše študije na večini farm ugotavljamo padanje vrednosti S/P tri mesece po vakcinaciji ali serumizaciji. Iz rezultatov lahko sklepamo, da se kroženje virusa ponovi, če ne izvajamo biovarnostnih ukrepov in se virus zadržuje v kategorijah tekačev in pitancev. V tem primeru ima stalna vakcinacija plemenske črede svoj smisel, saj tako preprečujemo

kroženje virusa v plemenski čredi. Seveda pa z vakcinacijo ne dosežemo eliminacije PRRS z okužene farme, kar dokazujejo tudi izkušnje številnih farm v Sloveniji, kjer izvajajo vakcinacijo že več let.

Dva seva virusa PRRS, ki smo ju ugotovili na farmi 9 v letu 2011 in 2012, sta skoraj identična, kar potrjuje, da se je isti sev virusa PRRS ves čas študije ohranjal na tej farmi. Primerjava 258 nukleotidov regije ORF 7 z referenčnim sevom Lelystad je pokazala ujemanje v samo v 88,0 do 89,1 %. To potrjuje, da farmski sev ni zelo soroden z virusom PRRS, ki je v vakcini, kar še dodatno pojasnjuje, zakaj ima vakcinacija omejen pomen pri eliminaciji PRRS iz okužene reje (Bassaganya-Rier in sod., 2004; Martelli in sod., 2007; Martelli in sod., 2009; Murtaugh in Genzow, 2011).

Rejec je večino predpisanih biovarnostnih ukrepov izvajal v omejenem obsegu in s časovno zakasnitvijo. Zaporu reje je uvedel šele, ko smo v plemenski čredi dokazali kroženje virusa 5 mesecev po vakcinaciji. V prihodnje rejec nima veliko možnosti, da bi dosegel eliminacijo PRRS, če ne bo izvedel na farmi nekaterih bistvenih sprememb (uporaba preverjeno negativnega semena, »all in/all out«, ločen prostor za bolne prašiče, izvajanje dvojne zapore).

5.4 SPLOŠNE UGOTOVITVE

Podatki o eliminaciji in eradikaciji PRRS iz okuženih rej so dostopni predvsem z območja Severne Amerike. Iz evropskega prostora pa je znanstvenih objav, ki bi obravnavale to tematiko, zelo malo. Zaradi tega smo se pri načrtovanju naše študije zgledovali predvsem po vzorih iz ZDA in Kanade. Celoten koncept eliminacije temelji na uvedbi biovarnostnih ukrepov in zaustavitvi kroženja virusa v plemenski čredi (Dee in sod., 2003; Corzo in sod., 2010; Zimmerman in sod., 2012). Po tem načelu smo v začetku študije obravnavali posamezne reje, v katerih smo želeli doseči eliminacijo PRRS. Po prvih rezultatih neuspelih eliminacij PRRS iz posameznih rej smo natančneje proučili razlike med načinom vzreje v severni Ameriki in pri nas. Bistvena razlika je v tem, da so tam različne proizvodne faze na ločenih lokacijah. To fizično preprečuje prenos virusa PRRS med kategorijami prašičev. Če se na takšni farmi doseže, da virus v plemenski čredi ne kroži več, to omogoči vzrejo negativnih tekačev in pitancev. Seveda je to mogoče doseči, če na farmi izvajajo sistem vzreje »all in/all out«. Za kontrolo uspešnosti je najpomembnejše vzorčenje v plemenski čredi. V naši študiji nismo imeli niti ene farme, ki bi ustrezala kategoriji farme z ločenimi proizvodnimi fazami, nikjer niso redili prašičev različnih kategorij v ločenih prostorih, prav tako jim na večini farm ni uspelo

vzpostaviti sistema »all in/all out«. Zaradi teh bistvenih razlik, ugotavljamo v naši raziskavi, je treba v naših razmerah testirati vse kategorije prašičev, da bi sproti spremljali uspešnost ukrepov za eliminacijo.

Zaporedna vzorčenja v celotni plemenski čredi zahtevajo veliko dela in so draga, kljub temu smo z našo raziskavo žeeli ugotoviti, kaj se je dogajalo v celotni plemenski čredi med posameznimi odvzemi vzorcev. To smo lahko opravili tudi zaradi sorazmerno majhnega števila plemenskih prašičev v rejah, ki smo jih zajeli v študijo. Seveda pa bi bilo v prihodnje smiselno pri zaporednih vzorčenjih uporabiti statistično dovolj velik vzorec, iz katerega bi z določeno verjetnostjo sklepali, kakšno je stanje v rejih (Cannon in Roe, 1982). Z zaporednim vzorčenjem v plemenski čredi spremljamo serološki profil celotne plemenske črede, prav tako lahko s primerjavo vrednosti S/P pri posameznih prašičih sklepamo, da je v plemenski čredi virus, ali da ga ni. V smislu eliminacije PRRS S farme, ki ima vse kategorije na isti lokaciji, pa so podatki serološkega profila plemenske črede pomanjkljivi, saj spremljamo le dogajanje v delu populacije s farme. Z vzorčenjem pri tekačih in mlajših pitancih v starosti od 6 do 14 tednov dobimo podatke o prisotnosti virusa na farmi. V teh kategorijah se po padcu kolostralnih protiteles virus PRRS zelo hitro širi, zaradi načina reje (kategorije prašičev niso ločene po prostorih, ni sistema reje »all in/all out«, ni preoblačenja in preobuvanja, ni ločenega prostora za bolne živali) pa se virus ohranja daljše obdobje, tudi neomejeno dolgo. V pozitivnih rejah, v katerih smo jemali vzorce 6-, 8-, 10-, 12- in 14-tedenskim tekačem in pitancem, smo v večini primerov dokazali nukleinsko kislino virusa PRRS v eni ali v več skupinah. V nekaterih primerih pa smo vzorčili zgolj v posameznih skupinah (npr. 5 pitancev starih 12 tednov in 5 pitancev starih 14 tednov) in virusne nukleinske kisline nismo dokazali, medtem ko so rezultati dokazovanja protiteles pri istih kategorijah kazali na prisotnost virusa PRRS. Iz naše študije se vidi, da je vsakokratno vzorčenje in pregled z metodo RT-PCR in z ELISA v vseh kategorij (6, 8, 10, 12 in 14 tednov starosti) koristno, če želimo ugotoviti na farmi prisotnost virusa. Naslednja pomembna skupina, ki bi jo v prihodnje pri vsakem vzorčenju na farmi vključili samo v serološke preiskave, je kategorija pitancev pred klanjem. Pomen te kategorije pri eliminaciji PRRS je v tem, da so bili prašiči na farmi najmanj 6 mescev. Ta kategorija namreč odseva stanje okužbe, ki se je v tem času odvijala v kategorijah tekačev in mlajših pitancev. V času, ko virus PRRS kroži na farmi, lahko v kategoriji pitancev pred klanjem ugotovimo protitelesa. Ko pa dosežemo eliminacijo PRRS iz reje, tudi protiteles v krvi pitancev pred klanjem ne dokažemo več. V naši raziskavi nismo uporabili takojimenovanih "sentinel

prašičev", s katerimi bi lahko pomembno zmanjšali stroške vzorčenja in testiranja. Z vključitvijo "sentinel prašičev" v plemensko čredo ali/in v kategorijo mlajših pitancev bi namreč ugotavliali virus PRRS na farmi. Če v zaporednih vzorčenjih pri "sentinel prašičih" ne bi ugotovili specifičnih protiteles, bi to dokazovalo, da se je kroženje virusa zaustavilo. V naši študiji smo na vseh farmah odvzeli le vzorce krvi, nismo pa jemali drugih vrst vzorcev. V zadnjih letih se uveljavljajo novi, neinvazivni načini vzorčenja. Rezultati preiskav vzorcev, zbranih na omenjen način, so primerljivi z rezultati preiskav vzorcev krvi. V prašičereji je vse bolj pomembno jemanje sline prašičev, ker je ta način vzorčenja manj stresen. Vzorčenje sline je primerno pri vseh kategorijah prašičev, primerno je predvsem za odvzem skupinskih vzorcev. Postopek je sorazmerno preprost, hiter in ga lahko brez težav izvajamo pogosto na isti farmi. Vzorci sline so primerni tako za dokaz protiteles z ELISA kakor tudi za metodo RT-PCR (Prickett in sod., 2008; Kittawornrat in sod., 2010; Ramirez in sod., 2012). Pri preiskavi sline je potrebna dodatna validacija testov, da zagotovimo rezultate, primerljive z rezultati preiskav krvnih vzorcev (Pricket in sod., 2010; Kittawornrat in sod., 2010; Chittick on sod., 2011; Ramirez in sod., 2012).

Za dokazovanje specifičnih protiteles v vzorcih smo uporabili komercialni komplet ELISA, s katerim lahko preko S/P vrednosti sklepamo o višini titra protiteles pri prašiču. Uporabljena ELISA omogoča pregled velikega števila vzorcev, je preprost za izvedbo in hiter, je visoko specifičen in občutljiv. ELISA, ki smo jo uporabili, je v primerjavi z drugimi komercialnimi testi ELISA najboljši v validacijah (Diaz in sod., 2012b). Prav tako pa so rezultati tega testa primerljivi s potrditvenimi testi (npr. IPMA). Test omogoča dokazovanje specifičnih protiteles proti virusom PRRS genotipa 1 in 2. Pri osnovi ocene vrednosti S/P smo prašiče v poskusu razdelili v štiri skupine in sicer negativni prašiči (S/P pod 0,4), nizko pozitivni prašiči (S/P med 0,4 in 1), pozitivni prašiči (S/P med 1 in 2) in visoko pozitivni prašiči (S/P več kot 2). Ta razdelitev se je pokazala za zelo uporabno pri primerjavi rezultatov ELISA med posameznimi odvzemi, saj smo pozitivne rezultate v tem testu prikazali v treh skupinah. Tako smo lahko določili manjše spremembe v reji in natančneje spremljali uspešnost poteka eliminacije PRRS. S spremeljanjem višine vrednosti S/P pri posameznih živalih smo lahko ocenili uspešnost serumizacije, prav tako pa smo iz povišanja vrednosti S/P sklepalni na občasno kroženje virusa v plemenski čredi. Uporabljena ELISA se je izkazal za pravilno izbiro, saj smo v študiji dobili vse potrebne podatke, ki smo jih potrebovali za oceno stanja na posamezni farmi.

Z uporabljeni metodo RT-PCR smo dokazovali nukleinsko kislino virusa PRRS v serumskih vzorcih. Uporabili smo komercialni komplet za izolacijo nukleinskih kislin in pomnoževanje izvedli v eni stopnji (angl. One-step RT-PCR). Metoda je dovolj občutljiva, da omogoča združevanje serumskih vzorcev (pregled poolov). Pri preiskavah plemenskih prašičev smo združevali 5 vzorcev v en pool in tako zmanjšali stroške. V primeru pozitivnega rezultata smo vzorce testirali individualno. Uporabljeni metoda ima sicer tudi nekatere pomanjkljivosti, na primer obstaja možnost navzkrižnih kontaminacij, potrebeni so posebni prostori za izvedbo in usposobljeni izvajalci, vendar se je v naši študiji pokazala kot primerna izbira za to vrsto vzorcev. Z določanjem nukleotidnega zaporedja iz pozitivnih vzorcev z metodo RT-PCR smo dobili vpogled v genetsko informacijo posameznih virusov, ki smo jih ugotovili na posameznih farmah. Pri zaporednih ugotovitvah virusa na farmi smo tako lahko dokazali prisotnost novega virusa in hkratno kroženje dveh zelo sorodnih virusov na farmi 5. Določanje nukleotidnega zaporedja v vseh fazah eliminacije je pomembno orodje, s katerim lahko dokazujemo vnos novega virusa na farmo ali ohranjanje domače različice virusa na njej. Seveda je za natančnejše analize razvoja virusa, prenosov znotraj farme in med farmami potrebno uporabiti daljše odseke virusnega genoma ali več različnih odsekov, kar pa ni bil namen naše študije. Za potrebe spremljanja genetske variante virusa PRRS na posamezni farmi se je metoda določanja nukleotidnega zaporedja izkazala kot zelo uporabna, pomaga pa tudi razumevati dogajanja na farmi. S to metodo smo na 6 farmah, ki smo jih vključili v študijo, ugotovili različne seve virusa PRRS, prav tako pa smo ugotovili neposredno povezavo med lokacijo farm in identičnostjo nukleotidov na različnih farmah. Ugotovljeni sevi se genetsko razlikujejo od vakcinalnega seva, kar zmanjšuje učinkovitost uporabljenih vakcin na področju Slovenije. Naši rezultati potrjujejo predhodne ugotovitve v študiji genetske heterogenosti virusov PRRS na območju Slovenije (Toplak in sod., 2010).

V večini rej smo opažali pomanjkljive biovarnostne ukrepe, ponekod pa pred začetkom naše raziskave teh sploh ni bilo. Kljub temu, da smo delali na različnih farmah, smo na vseh na začetku uveljavili isti nabor biovarnostnih ukrepov in jih obenem določili kot minimum, ki naj bi skupaj z drugimi ukrepi vodil do eliminacije PRRS. V nadaljevanju študije smo se srečavali z različnimi izvedbami potrebnih sprememb. Skoraj na vseh farmah smo v času študije ugotavliali, da so pomanjkljivo uvajali in izvajali predpisane ukrepe. Ključna zahteva za eliminacijo PRRS je v prvi vrsti vzpostavitev notranje biovarnosti. Med najpomembnejše ukrepe v zvezi s tem spada tudi reja posameznih kategorij prašičev v ločenih prostorih, kar

fizično preprečuje hitro širjenje virusa med kategorijami in omogoča izvedbo sistema »all in/all out«. Ko sta izpolnjena ta dva pogoja, je smiselno preoblačenje in preobuvanje delavcev, ko oskrbujejo različne kategorije prašičev. Pomemben ukrep, ki prispeva k temu, da se zaustavi kroženje virusa, je tudi ločena reja bolnih prašičev, se pravi, da je treba bolne prestaviti v ločen prostor. Pri popravilu hlevov oziroma pri gradnji novih hlevov je treba misliti na te minimalne zahteve, saj se tako lahko na farmah kmalu po okužbi izboljša stanje in uvede še druge ukrepe. Večina farm, na katerih smo opravili raziskavo, ni zadostila tem osnovnim pogojem. Hlevi so bili stari, popravljeni, tudi nepravilno načrtovani, kar je seveda oteževalo uvedbo nekaterih prej omenjenih ukrepov. Šele ko na farmi izpolnjujejo osnovne zahteve, je smiselno uvesti ukrep dvojne zapore reje. V večini rej, ki smo jih vključili v študijo, nismo imeli izpolnjenih osnovnih pogojev biovarnosti in smo kljub temu takoj začeli z izvajanjem dvojne zapore reje. To je sicer v naslednjih mesecih pripeljalo do zaustavitve kroženja virusa na farmah, ki so izvajale tudi večino predpisanih ukrepov, vendar smo v obdobju od 6 do 12 mesecev po uvedbi ukrepov skoraj povsod ugotovili ponoven vnos virusa v plemensko čredo, kar nas je oddaljilo od cilja eliminacije PRRS. Med predpisanimi biovarnostnimi ukrepi so prav tako pomembne še nekatere druge dejavnosti, kot so npr. čiščenje, razkuževanje, dezinfekcija, itn. Vendar smo na večini farm imeli večje probleme s tem, da bi rejci na svoji farmi spremenili utečen vzorec in vzpostavili osnovne ukrepe, ki bi po našem mnenju pomembno prispevali k eliminaciji PRRS. Ne smemo zanemariti tudi zunanjih biovarnostnih ukrepov, ki so prav tako pomembni, saj preprečujejo vnos novega virusa PRRS na farmo. S poznavanjem izvajanja zunanjih biovarnostnih ukrepov lahko ugotovimo, kako se je virus najverjetneje vnesel na farmo. Ta podatek pa je nujen, če hočemo v prihodnje preprečiti ponoven vnos in okužbo reje. Z eliminacijo virusa namreč dosežemo zaustavitev kroženja virusa in zato postane po določenem obdobju celotna populacija prašičev povsem dovetna za okužbo z virusom PRRS.

Rejce smo ob pričetku študije seznanili s tem kako nujno je izvajati biovarnostne ukrepe, če želimo doseči eliminacijo bolezni iz farme. Prav tako smo rejcem vseh 9 farm razdelili formularje, v katere naj bi zapisovali proizvodne rezultate. Ob obiskih rej smo nadzorovali izvajanje biovarnostnih ukrepov in opozarjali na napake. Ugotovili smo, da se kljub opozorilom večina rejcev ni držala predpisanih biovarnostnih zahtev in da na nobeni farmi niso izpolnjevali formularjev za zapisovanje proizvodnih rezultatov. Biovarnostnih ukrepov so se držali le na farmah, kjer so rejci ugotovili, da farma, prosta PRRS, pomeni boljši ekonomski učinek. Z vodenjem evidenc proizvodnih rezultatov bi rejce laže prepričali o pomembnosti izvajanja

biovarnostnih ukrepov, saj bi konkretni podatki govorili temu v prid. Prav tako smo ugotovili, da rejci ne želijo javno posredovati proizvodnih podatkov kot tudi ne statusa reje. Javne evidence zdravstvenih statusov bi omogočile rejcem, da kupujejo prašiče iz rej prostih PRRS. Večino rejcev pred nakupom prašičev tudi ne zanima njihov zdravstveni status in prašiče takoj prestavijo na svojo farmo. V študiji smo na nekaterih farmah dosegli, da rejci pred nakupom zahtevajo potrdilo o zdravstveni ustreznosti prašičev in kupujejo samo takšne, ki so prosti PRRS in nekaterih drugih bolezni. Nato nakupljene prašiče premestijo v karanteno, ki traja vsaj 6 tednov, ter jih pred vhlevitvijo ponovno testirajo na prisotnost protiteles proti PRRS. Samo takšen način dopolnjevanja črde omogoča ohranjanje farme proste PRRS. V primeru, da je farma pozitivna na PRRS, s tem načinom preprečimo vnos novega seva virusa na farmo. Javne evidence so tudi ključne za ohranjanje farme proste PRRS po uspešni eliminaciji PRRS. V primeru, da smo uspeli eliminirati PRRS na farmi, ne vemo pa kakšen je status okoliških farm, lahko ob pomanjkljivem izvajanju biovarnostnih ukrepov vnesemo virus nazaj na farmo (Otake in sod., 2011Morrison, 2012; Zimmerman in sod., 2012).

V Sloveniji imamo 3.888 gospodarstev z 1 do 20 plemenskih prašičev, temu sledi 231 gospodarstev z 21 do 50 plemenskih prašičev, nato je 46 gospodarstev z 51 do 100 plemenskih prašičev, 8 gospodarstev s 101 do 200 plemenskih prašičev, 2 gospodarstvi s 501 do 1000 plemenskih prašičev in 3 gospodarstva, ki imajo več kot 1001 plemenskega prašiča (baza VOLOS, Ministrstvo za kmetijstvo in okolje, UVHVVR, podatki iz dne 1.1.2012). Večina prašičjih farm je na vzhodu Slovenije, kjer je bilo tudi 8 farm, ki so bile vključene v študijo. Posebnosti naših prašičjih farm so, da imajo po večini vse proizvodne faze na enem mestu, da je večina manjših farm v strnjениh naseljih, da so druga od druge oddaljene pogosto le nekaj metrov in da njihov status glede PRRS in drugih bolezni ni znan. Vse našteto torej kaže, da je regionalno usmerjeno zatiranje in preprečevanje PRRS edina ustrezna pot. Naše ugotovitve potrjujejo tudi podatki iz literature (Morrison, 2011b), ki govore tudi o tem, da je sanacija zgolj posameznih farm zelo težavna, saj se zdrave živali v takšnem okolju lahko zelo hitro ponovno okužijo (Morrison, 2011b; Morrison, 2012; Zimmerman in sod., 2012). Morrison (2012) navaja, da eliminacija ni smiselna, če so na ožjem območju še druge farme, ki se ne pridružijo programu, saj bi se farme, ki izvajajo programe eliminacije okužile. V takšnih primerih je pametno bolezen samo kontrolirati, saj v endemični fazni ne povzroča večje škode in se z boleznično da živeti (Kristensen, 2012).

Morrison (2011) je izdelal okvir za regionalni pristop k eliminaciji bolezni, ki naj bi temeljil na motiviranosti lastnikov farm za večji dobiček pri reji prašičev. Osnova regionalnega pristopa so javno dostopni podatki glede statusa posamezne reje ter izobraževanje rejcev in veterinarjev. V daljšem obdobju to pomaga izboljšati infrastrukturo, s tem pa tudi eliminacijo PRRS in drugih infekcijskih bolezni. To seveda koristi živalim in veča dobiček. Programe so pripravili večinoma na prostovoljni podlagi, zato se jih nikoli ne udeležijo vsi rejci. Vendar stodstotni uspeh ni odvisen od stodstotne udeležbe (Duinhof in Dam, 2012).

V ZDA se je občutno povečalo število regionalnih programov in sicer od enega na dvajset regij v dveh letih. Uspešnost programa se je zvečala z namenitvijo filtrov na prezračevalne naprave v zelo gosto naseljenih regijah. Dobri rezultati, kot nasledek učinkovitih ukrepov za eliminacijo PRRS, bi lahko vodili k novim regionalno vodenim programom za eliminacijo tudi drugih patogenih mikrobov (Morrison, 2011b; Duinhof in Dam, 2012; Elstroem, 2012).

Na podlagi podatkov iz raziskave o pojavnosti PRRS v Sloveniji (Toplak in sod., 2010) smo v letu 2011 pripravili regionalni program za izkoreninjenje PRRS, ki pa ni bil sprejet. Prva faza programa naj bi bila podelitev statusa PRRS posameznim rejam, ki bi bila javna. V program bi zajeli le farme, ki imajo plemenske prašiče. Za podelitev statusa (negativna reja: status A, pozitivna reja: status B) bi zadostovala serološka preiskava vzorcev krvi 5 plemenskih svinj ter 5 pitancev. Če protiteles proti virusu PRRS ne bi dokazali, bi bilo treba za dokončno potrditev negativnega statusa serološko preiskati vse plemenske prašiče (ali 5-odstotna prevalenca bolezni ob 95-odstotni verjetnosti). Odvzem za dokončno potrditev statusa bi opravili takoj po monitoringu, rejcem pa bi predpisali, naj dosledno upoštevajo biovarnostne ukrepe. Po tem pregledu bi dobila reja status A (reja prosta PRRS) za obdobje 6 mesecev. Farme s statusom A bi morale ta status vzdrževati, in sicer s serološkim pregledom 5 plemenskih svinj in 5 pitancev ter vseh merjascev vsakih 6 mesecev. Poleg tega pa bi morale farme z negativnim statusom kupovati prašiče samo iz rej z enakim statusom in to preko karantene, ki naj bi trajala vsaj 6 tednov. Novi prašiči pa bi morali biti brez protiteles proti PRRS.

Zadnje spremeljanje pojavnosti PRRS v Sloveniji je bilo v letu 2010, ko smo v okviru letne Odredbe pregledali vse merjasce na prisotnost protiteles proti virusu PRRS. Rezultati so bili primerljivi s podatki iz omenjene študije o pojavnosti PRRS v Sloveniji. Ugotovljena prevalenca protiteles v obeh študijah je znašala približno 48 %. Trenutnega stanja glede PRRS v Sloveniji ne poznamo, saj nad boleznijo ni nikakršnega nadzora. Iz krvnih vzorcev ali kadavrov poginjenih prašičev, ki jih

občasno dobimo v preiskavo, smo ugotovili, da se pojavljajo vedno novi sevi virusa PRRS, kar priča o stalnem širjenju virusa v Sloveniji. Iz rezultatov naše raziskave lahko sklenemo, da bi bil v Sloveniji program za eliminacijo in eradikacijo bolezni nujno regionalno usmerjen, kar vključuje določene dejavnosti, ki jih navajajo tudi nekateri avtorji (Morrison, 2011b; Elvstroem, 2012; Mieli, 2012; Duinhof in Dam, 2012) in sicer: izobraževanje rejcev in veterinarjev o poteku bolezni, o načinu prenosa in o zunanjih in notranjih biovarnostnih ukrepih, pa tudi javno dostopne evidence o zdravstvenem stanju na farmah.

V okviru regionalnega programa pa je seveda treba vsako farmo obdelati posebej. Eliminacija bolezni se mora začeti z ugotovitvijo prevalence protiteles v plemenski čredi ter pri pitancih pred klanjem. Prav tako je koristno individualno označevanje plemenskih prašičev, kar nam pomaga spremljati učinkovitost metode eliminacije in nadzorovati izvajanje dvojne zapore reje. Na podlagi rezultatov se je treba odločiti za najprimernejšo metodo. Iz ugotovitev naše študije, bi bila za večino naših farm najprimernejša metoda eliminacije z naravno prekužitvijo z upoštevanjem dvojne zapore reje in vseh zunanjih in notranjih biovarnostnih ukrepov, saj ima večina naših farm majhno število plemenskih svinj. Za nekatere farme, ki imajo več kot 100 plemenskih prašičev, bi priporočili serumizacijo, saj na ta način hitreje dosežemo prekužitev celotne plemenske črede kot pa z naravno prekužitvijo. Ker se sevi virusa PRRS, ki krožijo v Sloveniji, v nekaterih nukleotidih razlikujejo od vakcinalnega seva Lelystad v 3,9 % do 10,1 % (Toplak in sod., 2012) oziroma iz rezultatov naše študije v 6,6 % do 12,0 %, vakcinacija v smislu eliminacije bolezni na naših farmah ne bi dala želenega učinka. Po določitvi metode eliminacije PRRS je nujen večkraten zaporeden odvzem vzorcev krvi vseh kategorij in vodenje evidenc proizvodnih rezultatov.

V okviru študije nam je uspela prva izolacija virusa PRRS v Sloveniji na pljučnih alveolarnih makrofagih. Izolacija virusa je neposreden dokaz infektivnega virusa v vzorcu. Za izolacijo virusa lahko uporabimo bodisi vzorce tkiv, kjer se virus dalj časa ohranja, bodisi krvni serum (Wills in sod., 2003). Sevi virusa PRRS, ki spadajo v genotip 1, se razmnožujejo na PAM (Benfield in sod., 1992). Vsi sevi virusa, dokazani v naši študiji, so spadali v genotip 1. Tako smo za razmnoževanje potrebovali PAM, odvzete prašičem, prostih specifičnih bolezni. Ker v Sloveniji ne vzrejamo takšnih prašičev, smo makrofage dobili z Danske. Izolirali smo 15 virusov iz vzorcev seruma iz 3 rej. Izolirane viruse smo razmnožili v stekleničkah za celično kulturo. Titrirali smo tudi dva izolata in določili titra, ki sta bila $10^{5,625}$ TCID₅₀ in $10^{5,125}$ TCID₅₀. Izolacija nam bo v bodoče omogočila gojenje virusa PRRS, kar nam odpira številne dodatne možnosti v diagnostiki PRRS.

6 SKLEPI

- Izvajanje biovarnostnih ukrepov, opisanih v tej nalogi, je prvi pogoj za uspeh eliminacije PRRS na okuženi farmi.
- Pred izvajanjem ukrepov je treba ugotoviti izhodiščno stanje črede (serološki profil črede, dokaz virusa in določitev genotipa virusa PRRS) in se na podlagi rezultatov, velikosti in tehnologije reje odločiti za najprimernejši način eliminacije PRRS.
- Za vrednotenje uspešnosti eliminacije PRRS je treba na farmi odvzeti vzorce krvi (serum) vsake 3 mesece. Vzorčenje mora zajemati plemenske prašiče, kategorijo tekačev v starosti 6, 8, 10 tednov ter kategorijo pitancev v starosti 12 in 14 tednov in pitance v starosti 6 mesecev (tik pred zakolom).
- V študiji ugotavljamo pomanjkljivo ali nezadostno izvajanje biovarnostnih ukrepov (dvojna zapora reje za vsaj 200 dni oziroma do preklica, uporaba preverjeno negativnega semena, ločene kategorije po prostorih, preoblačenje in preobuvanje delavcev, sistem reje »all in/all out«, razkuževalne bariere, ločen prostor za bolne prašiče, deratizacija in dezinsekcija) na šestih farmah, kjer eliminacije PRRS ni uspela.
- Eliminacijo PRRS z naravno prekužitvijo smo dosegli na farmi 1 in 2, kjer sta rejca izvajala dogovorjene biovarnostne ukrepe. Na farmi 3 eliminacije nismo dosegli, ker rejec takšnih ukrepov ni izvajal.
- Eliminacije PRRS s serumizacijo na farmi 4 in 5 nismo dosegli, saj rejca nista izvajala dogovorjenih biovarnostnih ukrepov. Na farmi 6 so izvajali vse dogovorjene biovarnostne ukrepe in pri zadnjem vzorčenju nismo več dokazali virusne nukleinske kisline, ne pri plemenskih prašičih, ne pri tekačih in ne pri pitancih. Pri starejših pitancih pa smo še vedno dokazovali protitelesa proti virusu PRRS v nizkih titrih. Pričakujemo lahko, da jih pri starejših pitancih pri naslednjem odvzemenu ne bomo več ugotovili, kar bo dokaz, da smo uspeli PRRS eliminirati.
- Sekvencirani sevi virusa PRRS na farmi 8 in 9 imajo v regiji ORF 7 (primerjava zaporedja 258 nukleotidov) samo od 88,0 do 89,5-odstotno genetsko sorodnost z vakinalnim sevom virusa. Na farmah niso izvajali vseh predpisanih biovarnostnih ukrepov. Z vakcinacijo v treh rejah nismo dosegli eliminacije PRRS.
- Z izvajanjem biovarnostnih ukrepov in natančnim spremeljanjem okužbe v rej bi lahko že z naravno prekužitvijo dosegli eliminacijo PRRS.

- Postopkov eliminacije PRRS, ki so opisani pretežno v ameriški literaturi, zaradi razlik v tehnologijah reje prašičev in osveščenosti rejcev ni mogoče v celoti prenesti v slovensko okolje.
- Na farmo je treba vnašati le negativne prašiče tako na protitelesa kot na virus PRRS, zato je nujno pred nakupom zahtevati potrdilo, da je reja, ki prodaja prašiče, brez PRRS. Premestitev v rejo mora potekati vedno po izvedeni 6-tedenski karanteni.
- Rejce bi bilo treba izobraževati o osnovnih značilnostih bolezni, o načinu prenosa povzročitelja in ukrepanju zoper PRRS ter o nujnosti izvajanja zunanjih in notranjih biovarnostnih ukrepov.
- V delu so opisani rezultati prve eliminacije PRRS v Sloveniji.

7 POVZETEK

Prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom povzroča velike ekonomske izgube in je endemična bolezen v večini držav sveta, kjer se ukvarjajo z rejo prašičev. V Sloveniji smo v letu 2010 ugotovili 44,8-odstotno prevalenco protiteles proti virusu PRRS in pojavljanje velikega števila različnih podtipov virusa PRRS. Zaradi velikih škod, ki jih povzroča PRRS, je treba izvajati različne ukrepe. Eliminacijo PRRS lahko dosežemo z naravno prekužitvijo, s serumizacijo ali z vakcinacijo skupaj z uvedbo biovarnostnih ukrepov na farmi.

Namen naše raziskave je bil oceniti učinkovitost treh poglavitnih metod za eliminacijo PRRS ob vzporednih biovarnostnih ukrepih na devetih prašičjih farmah.

V študijo smo vključili devet pozitivnih farm (oznake farm od 1 do 9) in skupno pregledali 1864 vzorcev z ELISA in 1106 z metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR). Na farmah 1, 2 in 3 smo izvedli naravno prekužitev, na farmah 4, 5 in 6 smo izvedli serumizacijo, na farmah 7, 8 in 9 pa vakcinacijo. Za vse farme smo predpisali biovarnostne ukrepe (dvojna zapora reje vsaj za 200 dni oziroma do preklica, po prostorih ločene kategorije, sistem reje »all in/all out«, preoblačenje in preobuvanje delavcev, uporaba preverjeno negativnega semena, razkuževalne bariere, ločen prostor za bolne prašiče, deratizacija in dezinsekcija). Približno vsake 3 mesece smo farme obiskali in jih spremljali od 9 do 32 mesecev. Preiskali smo vzorce krvi prašičev plemenske črede, tekačev in pitancev z ELISA za dokaz specifičnih protiteles proti virusu PRRS. Z RT-PCR pa smo dokazovali nukleinsko kislino virusa PRRS. Pozitivnim vzorcem smo določili nukleotidna zaporedja in ugotavljni sorodnost med posameznimi virusi PRRS iste farme, med virusi PRRS s posamezne farme in referenčnim sevom Lelystad ter sorodnost sevov PRRS med različnimi farmami. V spremljanem obdobju smo beležili izvajanje predpisanih biovarnostnih ukrepov.

Na farmi 1 in 2 smo dosegli eliminacijo PRRS, saj sta rejca izvajala vse predpisane biovarnostne ukrepe. Na farmi 3 so po treh mesecih opustili večino predpisanih ukrepov in PRRS nismo eliminirali.

Za serumizacijo smo uporabili inokulum, pripravljen iz serumov tekačev, pozitivnih na virus PRRS iste farme, kjer smo kasneje izvedli serumizacijo celotne plemenske črede isti dan. Na farmi 4 in 5 nismo dosegli eliminacije PRRS, na farmi 6 pa smo dokazali odsotnost virusne

nukleinske kisline pri vseh kategorijah prašičev dvanajst mesecev po serumizaciji. Na farmi 6 so izvajali vse predpisane biovarnostne ukrepe. Dvojne zapore reje niso izvajali niti na farmi 4 niti na farmi 5 in na obeh farmah niso izvajali sistema reje »all in/all out«. Na farmi 4 kategorije prašičev niso bile ločene po prostorih.

Na farmi 7 in 8 smo izvedli vakcinacijo pri 100-odstotni prevalenci protiteles, medtem ko je bila na farmi 9 prevalenca 50-odstotna. Eliminacije z vakcinacijo nismo dosegli na nobeni farmi. Rezultati določanja nukleotidnega zaporedja so pokazali le 88,0 do 89,5-odstotno identičnost nukleotidov med farmskimi sevi virusa PRRS in vakcinalnim sevom. Na farmah 7, 8 in 9 niso izvajali vseh predpisanih biovarnostnih ukrepov.

Glavne pomanjkljivosti naših devetih farm so, da posamezne kategorije prašičev niso ločene po prostorih, zaradi česar je onemogočeno izvajanje sistema reje »all in/all out« in bolni prašiči niso v ločenem prostoru in se zato virus brez težav prenaša med različnimi kategorijami prašičev na isti farmi. Nedosledno je tudi preoblačenje in preobuvanje delavcev. Na večini farm niso izvajali dvojne zapore, kar je nujen biovarnostni ukrep pri eliminaciji PRRS s pozitivne farme.

Iz rezultatov naše študije lahko sklepamo, da je ob upoštevanju predpisanih biovarnostnih ukrepov naravna prekužitev učinkovita metoda za eliminacijo PRRS. Rezultati serumizacije pa kažejo po rezultatih serologije in RT-PCR učinkovitost metode, kadar se upoštevajo predpisani biovarnostni ukrepi. Vakcinacija se ni izkazala za učinkovito metodo eliminacije PRRS.

Eliminacija PRRS je ob upoštevanju biovarnostnih ukrepov možna kljub bližini drugih pozitivnih farm prašičev in kljub tehnologiji, kjer so vse proizvodne faze na isti lokaciji. Kljub temu pa bi za Slovenijo priporočili regionalen program za eliminacijo PRRS zaradi goste naseljenosti prašičev na določenih območjih.

Za vsako farmo je nujen posamezen pristop k eliminaciji PRRS. Eliminacija se mora začeti z ugotovitvijo prevalence protiteles v plemenski čredi ter pitancev pred klanjem. Iz ugotovitev naše raziskave sledi, da bi bila za večino slovenskih farm najprimernejša metoda eliminacije z naravno prekužitvijo z upoštevanjem zunanjih in notranjih biovarnostnih ukrepov, saj ima večina naših farm majhno število plemenskih svinj. Za spremljanje učinkovitosti eliminacije PRRS je potreben serološki pregled (na tri mesece) plemenske črede, tekačev in pitancev. Z

metodo RT-PCR na pozitivni farmi v kategoriji tekačev in pitancev v starosti 6, 8, 10, 12 in 14 tednov ugotovimo v večini primerov prisotnost virusa PRRS. Določanje nukleotidnega zaporedja je pomembno za ugotavljanje sorodnosti med farmskim sevom virusa ter vakcinalnim sevom, prav tako pa je določanje nukleotidnega zaporedja pomembno v vseh fazah eliminacije, saj tako lahko dokazujemo vnos novega virusa na farmo.

V okviru študije smo uspešno izvedli prvo izolacijo virusa PRRS na primarni celični kulturi pljučnih alveolarnih makrofagov v Sloveniji.

8 SUMMARY

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is an endemic disease present in pig-rearing countries worldwide; PRRS is also economically significant disease. The serological prevalence of PRRS in Slovenia was 44.8% in 2010, and several subtypes of PRRS virus were detected. The implementation of different measures is necessary after PRRS introduction to farms because economic losses are high. Elimination of PRRS can be achieved in three ways: natural exposure, serumization and vaccination in combination with implementation of biosecurity measures on the farm.

In this study, we tried to evaluate three specific ways of eliminating PRRS with regard to biosecurity measures on nine farms

Nine PRRS positive farms were included (Farm 1 to Farm 9). Altogether, 1864 sera were tested with ELISA and 1106 by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). On Farms 1, 2 and 3, natural exposure was used; on Farms 4, 5 and 6, serumization was used; on Farms 7, 8 and 9, vaccinations were used. On all farms, biosecurity measures (double-herd closure for at least 200 days or more if necessary, pig categories in separate rooms, all in/all out system, changing of clothes and shoes before entering for all workers, disinfection barriers, separate rooms for sick pigs, deratization and disinfection) were required. Farms were visited and monitored to determine whether biosecurity measures were implemented every three months, in periods of 9 to 32 months. Blood samples from breeding herds, weaners and fatteners were tested with ELISA for specific antibodies against the PRRS virus and by RT-PCR for the detection of the PRRS virus nucleic acid. Positive samples with RT-PCR were directly sequenced and determined the genetic similarity between PRRS viruses from the same farm, between different farms and their relation to reference Lelystad strain.

The elimination of PRRS was successful on Farms 1 and 2, following the implementation of all required biosecurity measures. On Farm 3, after three months, biosecurity measures were ignored and the elimination of PRRS failed.

For serumization, the sera of RT-PCR positive weaners from the same farm was used, and inoculum was applied to all breeding pigs on the same day. In Farms 4 and 5, elimination of PRRS was not achieved. On Farm 6, the absence of PRRS virus nucleic acid in all pig categories

was proved twelve months after serumization; all required biosecurity measures had been implemented on this farm. In contrast, on Farms 4 and 5, double-herd closure and an all in/all out system was not implemented. On Farm 4, pig categories were not in separate rooms.

On Farms 7 and 8, seroprevalence was 100%, and on Farm 9 seroprevalence was 50% before vaccination. Elimination of PRRS with vaccination did not succeed on all three farms. The detected PRRS viruses shared an 88.0% to 89.5% nucleotide identity with the Lelystad virus (vaccinal strain). On Farms 7, 8 and 9, biosecurity measures were not implemented.

The main disadvantage of the nine studied farms is that pig categories are not in separate rooms, which leads to ignoring of the all in/all out system. Sick pigs usually were not in separate rooms. Double-herd closure was not used on these farms before the study, but it is a necessary measure in the elimination procedure of PRRS.

The conclusions of our study are that natural exposure and serumization with the required biosecurity measures protocol are effective in the elimination of PRRS in Slovenian conditions of pig breeding. Vaccination was not successful for the elimination of PRRS.

Elimination of PRRS is possible even in situations in which neighbouring farms are PRRS-positive and on one-site farms. Pig production in Slovenia is concentrated in few regions, so a regional program for elimination of PRRS is advisable. Elimination programs of PRRS should be individual. Start with a definition of the prevalence of PRRS in the breeding herd and fatteners before slaughter. From our study, for most our farms (farms with less than 100 breeding pigs) natural exposure with required biosecurity measures is the best choice for elimination of PRRS. For farms with more than 100 breeding pigs, serumization is the appropriate way of eliminating PRRS. The success of elimination should be monitored by serological testing (every three months) of breeding herds, weaners and fatteners. With RT-PCR, virus nucleic acid can be detected in weaners and fatteners at the ages of 6, 8, 10, 12 and 14 weeks. Sequencing can be used to show nucleotide identity between vaccinal and farm strains, and the introduction of new strains to the farms.

In this study, we also isolated the PRRS virus on the primary cell culture of pulmonary alveolar macrophages first time in Slovenia.

9 ZAHVALE

Mentorju doc. dr. Zdravku Valenčaku se zahvaljujem za strokovne nasvete, pomirjujoče in spodbudne besede in korekten akademski odnos.

Hvala somentorju viš. zn. sod. dr. Ivanu Toplaku.

Zahvaljujem se vsem članom komisije doc. dr. Bredi Jakovac Strajn, prof. dr. Petru Hostniku in prof. dr. Josipu Madiću za pregled doktorske naloge in koristne pripombe.

Brez sodelavke asist. dr. Irene Golinar Oven in njene pomoči pri pregledovanju večine seminarskih nalog študentov bi pisanje doktorata trajalo dalj časa. Sodelavki Ireni Klasinc pa se zahvaljujem za vso serološko testiranje. Obema se poleg omenjenega zahvaljujem tudi za spodbudo – lepo je imeti prijatelje tudi v službi!

Zahvaljujem se Simonu Jerebicu, dr. vet. med., Tončku Giderju, dr. vet. med. in Tomažu Šantlu, dr. vet. med. za vso odvzeto kri prašičev.

Podjetje IDEXX mi je poklonilo nekaj diagnostičnih kitov ELISA, za kar se jim lepo zahvaljujem.

Larsu Ericu Larsnu in Jensu Nielsnu z »National Veterinary Institute, Technical University of Denmark« se zahvaljujem za celice (PAM) in za poduk glede izolacije virusa PRRS ter za vsa nova spoznanja, ki sem jih dobila na Danskem.

Satelitskih posnetkov farm v nalogi ne bi bilo brez Jedrt Maurer Wernig, dr. vet. med., ki se ji lepo zahvaljujem. Zahvala gre Marku Potočniku, dr. vet. med. z Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, ki mi je posredoval podatke o staležu prašičev v Sloveniji.

Za statistično obdelavo podatkov se lepo zahvaljujem dr. Špeli Malovrh z Biotehniške fakultete, oddeleka za zootehniko.

Za poduk in pregled poglavij o imunologiji se iskreno zahvaljujem kolegu prof. dr. Tadeju Malovrhu, za pregled poglavja o patoanatomskih spremembah pa svoji kolegici doc. dr. Tanji Švara.

Za pripombe in koristne nasvete gre zahvala prof. dr. Jožetu Jurci. Da so pike in vejice na pravih mestih ter da so besede pravilno napisane, se zahvaljujem tudi očetu.

Zahvaljujem se Ministrstvu za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo, ki mi je v okviru javnega razpisa »Inovativna shema za sofinanciranje doktorskega študija za spodbujanje sodelovanja z gospodarstvom in reševanja aktualnih družbenih izzivov – generacija 2010 Univerza v Ljubljani« sofinanciralo doktorski študij.

Za skrben pregled citirane literature ter za druge koristne napotke se zahvaljujem mag. Brigit Grečs-Smole.

Za lepo obliko doktorata in številne računalniške nasvete gre zahvala Jerneju Alifu.

10 LITERATURA

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York, London: Garland Publishing, 1994.

Albina E, Madec F, Cariolet R, Torrison J. Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pig in farm units. Vet Rec 1994; 134: 567–73.

Albina E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. Vet Microbiol 1997a; 55: 309–16.

Albina E. Porcine reproductive and respiratory syndrome: ten years of experience (1986–1996) with this undesirable viral infection. Vet Res 1997b; 28: 305–52.

Albina E, Carrat C, Charley B. Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Interferon Cytokine Res 1998; 18: 485–90.

Albina E, Mesplede A, Chenut G, et al. A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD), and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991–1998. Vet Microbiol 2000; 77: 43–57.

Alexopoulos C, Kritas SK, Kyriakis CD, Tzika E, Kyriakis SC. Sow performance in an endemically porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)-infected farm after sow vaccination with an attenuated PRRS vaccine. Vet Microbiol 2005; 111: 151–7.

Allan G, Mc Neilly F, Ellis J, et al. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. Arch Virol 2000; 145: 2421–9.

Amass SF, Baysinger A. Swine disease transmission and prevention. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. Diseases of swine. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing Professional, 2006: 1075–98.

Bassaganya-Rier J, Thacker BJ, Yu S, Strait E, Wannemuehler MJ, Thacker EL. Impact of immunizations with porcine reproductive and respiratory syndrome virus on lymphoproliferative recall response of CD8+ T cells. *Viral Immunol* 2004; 17: 25–37.

Batista I, Pijoan C, Torremorell M. Experimental infection of gilts with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) during acclimatization. *J Swine Health Prod* 2002; 10: 147–50.

Batista L, Dee SA, Rossow KD, Deen J, Pijoan C. Assessing the duration of persistence and shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of breeding-age gilts. *Can J Vet Res* 2002; 66: 196–200.

Batista L, Pijoan C, Dee S, et al. Virological and immunological responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of gilts. *Can J Vet Res* 2004; 68: 267–73.

Batista L. Porcine reproductive and respiratory syndrome diagnostics in the breeding herd. Back to the basic. *J Swine Health Prod* 2005; 13: 96–98.

Beilage EG. Die Bedeutung des PRRS – Virus für Erkrankungen des Respirationstraktes beim Schwein: eine Literaturübersicht. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1995; 102: 457-69.

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

Benfield DA, Yaeger MJ, Collins JE. Experimental studies on the transmission and persistence of swine infertility and respiratory disease virus (Mystery Swine Disease). Research investment report. Des Moines: National Pork Producers Council, 1994: 5–14.

Benfield DA, Nelson C, Steffen M, Rowland RRR. Transmission of PRRS by artificial insemination using extended semen seeded with different concentrations of PRRSV. In: Annual meeting of the American Association of Swine Practitioners: proceedings. Indianapolis, 2000: 405–8.

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

Blaha T. Epidemiological investigation into PEARS in Germany: consequences in fattening pigs. In: 12th International Pig Veterinary Society Congress: proceedings. Hague: IPVS, 1992: 126.

Bøtner S, Nielsen J, Bille-Hansen V. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. *Vet Microbiol* 1994; 40: 351–60.

Brockme SL, Halbur PG, Thacker EL. Porcine respiratory disease complex. In: Brogden KA, Guthmiller JM, Polymicrobial diseases. Washington: SM Press, 2002: e 13 (27 str.)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK24781> (12.11.2012)

Bruner L. Serum inoculation in a sow herd for control of virus PRRS: a case report. In: 34th Annual meeting of the American Association of Swine Veterinarians: proceedings. Orlando: AASV, 2007: 65–68.

Buddaert W, van Reeth K, Penseart M. In vivo and in vitro interferon (IFN) studies with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS). *Adv Exp Med Biol* 1998; 40: 461–7.

Burns K. Swine veterinarians resolve to eliminate the PRRS virus. *J Am Vet Med Assoc* 2006; 228: 1315–6.

Canadian Swine Health Board. National swine farm-level biosecurity standard: Technical committee on Biosecurity. Ottawa, 2010: 29 str
http://www.swinehealth.ca/CSHB_Biosecurity_StandardE.pdf (5.11.2012)

Cannon RM, Roe RT. Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians. Canberra: Australian Bureau of Animal Health, 1982.

Cano JP, Dee SA, Murtaugh MP, Pijoan C. Impact of modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine intervention on a population of pigs infected with a heterologous isolate. *Vaccine* 2007a; 25: 4382–91.

Cano JP, Dee SA, Murtaugh MP, Trincado CA, Pijoan CB. Effect of vaccination with a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine on dynamics of homologous viral infection in pigs. *Am J Vet Res* 2007b; 68: 565–71.

Chang CC, Chung WB, Lin MW, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Taiwan. *J Chin Soc Vet Sci* 1993; 19: 268–76.

Charerntantanakul W, Platt R, Johnson W, Roof M, Vaughn E, Roth JA. Immune response and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

Vet Immunol Immunopathol 2006; 109: 99–115.

Charerntantanakul W. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine: immunogenicity, efficacy and safety aspects. *World J Virol* 2012; 1(1): 23–30.

Chiou MT. An overview of PRRS in Taiwan. In: Zimmerman J, Yoon KJ, eds. The PRRS compendium. 2nd ed. Des Moines: National Pork Board, 2003: 281–3.

Chittick WA, Stensland WR, Prickett JR, et al. Comparison of RNA extraction and real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine oral fluid specimens.

J Vet Diagn Invest 2011; 23(2): 248–53.

Cho JG, Dee SA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 2006; 66(3): 655–62.

Choen DS, Chae C. Distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in stillborn and live born piglets from experimentally infected sows.

J Comp Pathol 2001; 124: 231–7.

Christianson WT, Collins JE, Benfield DA, et al. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows.

Am J Vet Res 1992; 53: 485–8.

Christianson WT, Choi CS, Collins JE, Molitor TW, Morrison RB, Joo HS. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and foetuses. Can J Vet Res 1993; 57: 262–8.

Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, et al. Persistence of porcine reproductive respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars.

J Vet Diagn Invest 1995; 7: 456–64.

Christopher-Hennings J. The pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) in the boar. Vet Res 2000; 31: 57–8.

Christopher-Hennings J, Holler L, Benfield D, Nelson E. Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen, serum, peripheral blood mononuclear cells, and tissues from Yorkshire, Hampshire, and Landrace boars.

J Vet Diagn Invest 2001; 13: 133–42.

Chung WB, Lin MW, Chang WF, Hsu M, Yang PC. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in intensive farrow-to-finish pig herds.

Can J Vet Res 1997; 61(4): 292–8.

Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, et al. 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 1992; 4: 117–26.

Cooper VL, Hesse RA, Doster AR. Renal lesions associated with experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) infection.

J Vet Diagn Invest 1997; 9: 198–201.

Corzo CA, Mondaca E, Wayne S, et al. Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 2010; 154: 185–92.

Dee SA, Bilodeau R, Athanassious R, Sauvageau RA, Martineau GP. PRRS syndrome in Quebec: Isolation of a virus serologically related to Lelystad virus. *Can Vet J* 1992; 33: 552–3.

Dee SA, Morrison RB, Joo HS. Eradicating porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus using two-site production and nursery depopulation. *Swine Health Prod* 1993; 5: 20–3.

Dee SA, Joo HS. Prevention of the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in endemically infected pig herds by nursery depopulation. *Vet Rec* 1994; 135: 6–9.

Dee SA. The detection of using PRRS vaccine in the breeding herd: when and how to use it. In: Allen D. Leman Swine Conference: proceedings. St. Paul: University of Minnesota, 1996, 143–6.

Dee SA, Joo HS, Tokach L, et al. Detecting subpopulations after PRRS virus infection in large breeding herds using multiple serologic tests. *J Swine Helth Prod* 1996; 4(4): 181–4.

Dee SA, Joo HS, Polson DD, et al. Evaluation of the effects of nursery depopulation on the profitability of 34 pig farms. *Vet Rec* 1997; 140: 242–8.

Dee SA. Gilt development and PRRS: a model program for the U.S. swine industry. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1997; 19: 228–37.

Dee SA. A protocol for defining breeding herd stability and classifying farms according to PRRS status to identify potential intervention strategies: a summary of 200 farms. In: 15th International Pig Veterinary Society Congress: proceedings. Birmingham: IPVS, 1998: 2.

Dee SA, Molitor TW. Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using a test and removal process. *Vet Rec* 1998; 143(17): 474–6.

Dee SA, Philips R. Using vaccination and unidirectional pig flow to control PRRSV transmission. J Swine Health Prod 1998; 6: 21–5.

Dee SA, Joo HS, Park BK, et al. Attempted elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from a seedstock farm by vaccination of the breeding herd and nursery depopulation. Vet Rec 1998; 142: 569–72.

Dee SA, Molitor TW, Philips RE. Elimination of PRRS virus in five pig farms using a test and removal procedure in the breeding herds. Vet Res 2000; 31: 93–4.

Dee SA, Bierk MD, Deen J, Molitor TW. An evaluation of test and removal for the elimination of PRRS virus from infected breeding herds.

Can J Vet Res 2001; 65: 22–7.

Dee SA, Deen J, Rossow K, Wiese C, Otake S, Joo HS, Pijoan C. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during cold weather. Can J Vet Res 2002; 66: 232–9.

Dee SA, Deen J, Rossow K, et al. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during warm weather. Can J Vet Res 2003; 67: 12–9.

Dee SA. Principles of prevention, control and eradication. In: Zimmerman J, Yoon KJ, Neumann E, eds. PRRS compendium producer edition. Des Moines: National Pork Board, 2003: 77–87.

<http://test.pork.org/filelibrary/PRRS/2003Compendium/PRRSChapter9.pdf> (6. 11.2012)

Dee SA. Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 30 farms by test and removal. J Swine Health Prod 2004; 12(3): 129–33.

Dee SA, Deen J, Pijoan C. Evaluation of four intervention strategies to prevent the mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Can J Vet Res 2004; 68: 19–26.

Dee SA, Deen J, Jacobson L, Rossow KD, Mahlum C, Pijoan C. Laboratory model to evaluate the role of aerosols in the transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Rec* 2005; 156: 501–4.

Dee SA, Deen J, Pijoan C. An evaluation of an industry-based sanitation protocol for full-size PRRSV-contaminated transport vehicles. *Swine Health Prod* 2006; 14: 307–11.

Dee SA. PRRS control. *Pig* 333 2009; Articles: 9. Feb

http://www.pig333.com/prrs/pig_article/556/prrs-control (16.11.2012)

Dee SA, Otake S, Deen J. Evidence of long distance airborne spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res* 2009; 40(4): e 39 (13 str.)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2701181/pdf/vetres-40-39.pdf> (16.11.2012)

Delputte PL, Meerts P, Costers S, Nauwynck HJ. Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102: 179–88.

Desrosiers R, Boutin M. An attempt to eradicate porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) after an outbreak in breeding herd: eradication strategy and persistence of antibody titers in sows. *J Swine Health Prod* 2002; 10(1): 23–5.

Dewey C. PRRS in North America, Latin America, and Asia. *Vet Res* 2000; 31: 84–5.

Diaz I, Darwich L, Pappaterra G, Pujols J, Mateu E. Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology* 2006; 351: 249–59.

Diaz I, Gimeno M, Darwich L, et al. Characterization of homologous and heterologous adaptive immune responses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Res* 2012a; 43: 1–30.

Díaz I, Venteo Á, Rebollo B, et al. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of Porcine reproductive and respiratory syndrome virusinfection. *J Vet Diagn Invest* 2012b; 24(2): 344–8.

Donadeu M, Arias M, Gomez-Tejedor C, et al. Using polymerase chain reaction to obtain virus PRRS-free piglets from epidemically infected herds.

Swine Health Prod 1999; 7: 225–61.

Done SH, Paton DJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. *Vet Rec* 1995; 136: 32–5.

Drew TW, Lowings JP, Yapp F. Variation in open reading frames 3, 4 and 7 among porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the UK.
Vet Microbiol 1997; 55: 209–21.

Drew TW. A review of evidence for immunosuppression due to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Res* 2000; 31: 27–39.

Duinhof T, Van Dam B. PRRSV in the Netherlands: actual status, economic impact, planned actions. In: EuroPRRS 2012 Symposium. Understanding and combating PRRS in Europe. COST Action FA902: proceedings. Budapest, 2012: 100–1.

Dunnett CW. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J Am Stat Assoc* 1995; 50: 1096–121.

Eichhorn G, Frost W. Study on the suitability of sow colostrum for the serological diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS).
Zentralbl Veterinarmed B 1997; 44: 65–72.

Elvstroem A. Views on control and eradication of PRRS in Europe. In: EuroPRRS 2012 Symposium. Understanding and combating PRRS in Europe. COST Action FA902: proceedings. Budapest, 2012: 94.

Epperson B, Holler L. An abortion storm and sow mortality syndrome.

Proc Am Assoc Swine Pract 1997; 28: 479–84.

Fano E, Olea L, Pijoan C. Eradication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by serum inoculation of naïve gilts. Can J Vet Res 2005; 69: 71–4.

Feitsma H, Grooten HJ, Schie FW. The effect on porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) on sperm production. In: 12th International Congress on Animals Reproduction: proceedings. Hague: Indian Council of Agricultural Research, 1992: 1710–2.

Fitzsimmons MA. Principles of dealing with PRRS. In: Proceedings of the 35th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians. Toronto: AASV, 2005: 319–28.

Forsberg R, Storgaard T, Nielsen HS, et al. The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe. Virology 2002; 299: 38–47.

Galina L, Pijoan C, Sitjar M, Christianson WT, Rossow K, Collins JE. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. Vet Rec 1994; 134: 60–4.

Gordon SC. Effect of blue-eared pig disease on a breeding and fattening unit.

Vet Rec 1992; 130: 513–4.

Gillespie TG, Caroll AL. Techniques for PRRSV elimination utilizing modified live virus vaccines on single-site swine farms. In: 4th International symposium on emerging and re-emerging pig diseases: proceedings. Rome, 2003: 127–8.

Gradil C, Dubuc C, Eaglesome MD. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: seminal transmission. Vet Rec 1996; 138: 521–2.

Gramer ML, Christianson WT, Harris DL. Producing PRRS negative pigs from PRRS positive sows. Proc Am Assoc Swine Pract 1999; 413–6.

Greiner LL, Stahly TS, Stabel TJ. Quantitative relationship of systemic virus concentration on growth and immune response in pigs. *J Anim Sci* 2000; 78: 2690–5.

Grosse-Beilage E, Grosse-Beilage T. Epidemiological investigations into PEARS in Germany: influence on reproduction. In: 12th International Pig Veterinary Society Congress: proceedings. Hague: IPVS, 1992: 125.

Gutierrez-Martin CB, Rodriguez-Delgado O, Alvarez-Nistal D, et al. Simultaneous serological evidence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Aujeszky's disease and influenza virus in Spanish finishing pigs. *Res Vet Sci* 2000; 68(1): 9–13.

Halbur PG, Paul PS, Frey ML, et al. Comparison of the pathogenicity of two U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet Pathol* 1995; 32: 648–60.

Halbur PG, Paul PS, Meng XJ, Lum MA, Andrews JJ, Rathje JA. Comparative pathogenicity on nine U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old caesarean-derived, colostrum-deprived pig model. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8: 11–20.

Halbur PG, Bush E. Update on abortion storms and sow mortality. *Swine Health Prod* 1997; 5(2): 73.

Hermann JR, Munoz-Zanzi CA, Roof MB, Burkhart K, Zimmerman JJ. Probability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection as a function of exposure route and dose. *Vet Microbiol* 2005; 110(12): 7–16.

Hill H. Overview and history of mystery swine disease (swine infertility/respiratory syndrome). In: Mystery Swine Disease Committee Meeting: proceedings. Denver: Livestock Conservation Institute, 1990: 29–31.

Hill HT, Mulford JA, Kaisand JJ, Holtcamp A, Reyes C. PRRS control: to hell and back. In: Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians: proceedings. Des Moines: AASV, 2004: 369–75.

Hirose O, Kudo H, Yoshizawa S, Hiroike T, Nakane T. Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Chiba prefecture. *J Jpn Vet Med Assoc* 1995; 48: 650–3.

Hooper SA, White ME, Twiddy N. An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *Vet Rec* 1992; 131: 140–4.

Jacobs AC, Hermann JR, Munoz-Zazil C, et al. Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus at ambient temperatures. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22: 257–60.

Joo HS, Park BK, Dee SA, Pijoan C. Indirect fluorescent IgM antibody response of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 1997; 55: 303–7.

Jusa ER, Inaba Y, Kouno M, et al. Slow-reacting and complement-requiring neutralizing antibody in swine infected with porcine reproductive and respiratory (PRRS) virus. *J Vet Med Sci* 1996; 58: 749–53.

Hopper SA, White ME, Twiddy N. An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *Vet Rec* 1992; 131(7): 140–4.

Hopper CC, Van Alstine WG, Stevenson GW, Kanitz CL. Mice and rat (laboratory and feral) are not a reservoir for PRRS virus. *J Vet Diagn Invest* 1994; 6: 13–5.

Ittman JS. Use of exposure and closure to stabilize health at a large multi-age finishing site. In: Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians: proceedings. Orlando: AASV, 2007: 3–11.

Kang SY, Yun SI, Park HS, Park CK, Choi HS, Lee YM. Molecular characterization of PL97-1, the first Korean isolate of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 2004; 104: 165–79.

Karniychuk UU, Geldhof M, Vanhee M, Van Doorselaere J, Saveleva TA, Nauwynck HJ. Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC Vet Res* 2010; 6: e 30 (10 str.)
<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/6/30/> (23.11.2012)

Keffaber KK. Reproductive failure of unknown etiology. *Am Assoc Swine Pract News* 1989; 1: 1–10.

Keffaber KK, Stevenson G, Van Alstine W, et al. SIRS virus infection in nursery/grower pigs. *Am Assoc Swine Pract News* 1992; 4: 38–9.

Kim H, Kim HK, Jung JH, et al. The assessment of efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected vaccine based on the viral quantity and inactivation methods. *Virol J* 2001; 8: e 323 (12 str.)

<http://www.virologyj.com/content/8/1/323> (23.11.2012)

Kimman TG, Cornelissen LA, Moormann RJ, Rebel JMJ, Stockhove-Zurwieden N. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine* 2009; 27: 3704–18.

Kittawornrat A, Engle M, Johnson J, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: Will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Vet Res* 2010; 154: 170–6.

Kristensen CS. PRRSV control in Denmark: status and perspectives. In: EuroPRRS 2012 Symposium. Understanding and combating PRRS in Europe. COST Action FA902: proceedings. Budapest, 2012: 106–7.

Kuby J. Immunology. New York: WH Freeman and company, 1997: 664 str.

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

Labarque G, Van Reeth K, Nauwynck H, Drexler C, Van Gauch S, Pensaert M. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. *Vaccine* 2004; 22: 4183–90.

Lager KM, Mengeling WL. Pathogenesis of in utero infection in porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res* 1995; 59: 187–92.

Lager KM, Halbur PG. Gross and microscopic lesions in porcine foetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8: 275–82.

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

Lager KM, Mengeling WL, Brockmeier SL. Evaluation of protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge-exposed with antigenically distinct PRRSV isolate.

Am J Vet Res 1999; 60: 1022–7.

Larsen LE. Diagnosis of PRRSV. In: EuroPRRS2011 Symposium: proceedings. Novi Sad: Scientific Veterinary Institute “Novi Sad”, 2011: 15–24.

Le Potier MF, Blanquefort P, Morvan E, Albina E. Result of a control programme for the porcine and reproductive syndrome in French »Pays de la Loire« region.
Vet Microbiol 1997; 55: 355–60.

Lee C, Kim H, Kang B, et al. Prevalence and phylogenetic analysis of the isolated type I porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 2007 to 2008 in Korea.
Virus Genes 2010; 40: 225–30.

Leung FCC. Molecular evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus – What can it really tell us; a trees and forest metaphor! In: EuroPRRS2011 Symposium: proceedings. Novi Sad: Scientific Veterinary Institute “Novi Sad”, 2011: 12–3.

Loemba HD, Mounir S, Mardassi H, Archambault D, Dee SA. Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 1996; 141: 751–61.

Lopez OJ, Oliveira MF, Garcia EA, Kwon BJ, Doster A, Osorio FA. Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent.

Clin Vaccine Immunol 2007; 14: 269–75.

Loula T. Mystery pig disease. *Agripractice* 1991; 12: 23–34.

Magar R, Robinson Y, Dubuc C, Larochelle R. Isolation and experimental oral transmission in pigs of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *Adv Exp Med Biol* 1995; 380: 139–44.

Magar R, Larochelle R. Evaluation of the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pig meat and experimental transmission following oral exposure. *Can J Vet Res* 2004; 68: 259–66.

Mateu E, Diaz I. The challenge of PRRS immunity. *Vet J* 2008; 177: 345–51.

Martelli P, Cordioli P, Alborali LG, et al. Protection and immune response in pigs intradermally vaccinated against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and subsequently exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain. *Vaccine* 2007; 25: 3400–8.

Martelli P, Gozio S, Ferrari L, et al. Efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain: clinical protection and cell-mediated immunity. *Vaccine* 2009; 27: 3788–99.

Martinez E, Riera P, Sitja M, Fang Y, Oliviera S, Maldonado J. Simultaneous detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real time RT-PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. *Res Vet Sci* 2008; 85: 184–93.

McCaw MB. McRebel PRRS: management procedures for PRRS control in large herd numbers. In: AD Leman Swine Conference: proceedings. St. Paul: University of Minnesota, 1995; 22: 161–2.

McCaw M. PRRS control: whole herd management concepts and research update. In: Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar. Greenville: North Carolina Swine Veterinary Group, 1995: 1–8.

McCaw M. Effect of reducing cross fostering at birth on piglet mortality and performance during an acute outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Swine Health Prod* 2000; 8(1): 15–21.

Meier W, Wheeler J, Husmann RJ, Osorio F, Zuckermann FA. Characteristics of the immune response of pigs to PRRS virus. *Vet Res* 2000; 31(1): 41.

Meier W, Galeota J, Osorio FA, Husmann RJ, Schnitzlein WM, Zuckermann FA. Gradual development of the interferon-(response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology*, 2003; 309: 18–31.

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

Mengeling WL, Lager KM. A brief review of procedures and potential problems associated with the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome.

Vet Res 2000; 31: 61–9.

Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC, Koehler KJ. Strain specific of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Microbiol 2003; 93: 13–24.

Mengeling WL. The porcine reproductive and respiratory syndrome quandary. Part II: Vaccines and vaccination strategy. J Swine Health Prod 2005; 13(3): 152–6.

Meulenberg JJ, Hulst MM, de Meijer EJ, et al. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. Virology 1993; 192: 62–72.

Mieli L. Experience on laboratory results on PRRSV control and eradication possibilities. In: EuroPRRS 2012 Symposium. Understanding and combating PRRS in Europe. COST Action FA902: proceedings. Budapest, 2012: 95–99.

Molina RM, Chittick W, Nelson EA, et al. Diagnostic performance of assays for the detection of anti-Porcine reproductive and respiratory syndrome virus antibodies in serum and muscle transudate ("meat juice") based on samples collected under experimental conditions.

J Vet Diagn Invest 2008a; 20(6): 735–43.

Molina RM, Cha SH, Chittick W, et al. Immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus during acute and chronic infection.

Vet Immunol Immunopathol 2008b; 283–92.

Molitor TW, Bautista EM, Choi CS. Immunity to PRRSV: double-edged sword.

Vet Microbiol 1997; 55: 265–76.

Moore C. Clinical presentation of mystery swine disease in the growing pig. In: Mystery swine disease Committee Meeting: proceedings. Denver: Livestock Conservation Institute, 1990: 41–9.

Morrison RB. Cost of animal disease and in particular PRRS. In: The Balkan meeting on PRRS diagnostics: proceedings. Split: Croatian Veterinary Institute, European Cooperation in the field of Scientific and Technical Research (COST), 2011a: 6–7.

Morison RB. How to control and eliminate PRRS from swine herds on farm and regional level. In: EuroPRRS2011 Symposium: proceedings. Novi Sad: Scientific Veterinary Institute “Novi Sad”, 2011b: 83–91.

Morrison RB. Control or elimination of PRRS virus? In: 4th European Symposium of Porcine Health Management: proceedings. Bruges: European College of Porcine Health Management, 2012: 60–3.

Mortensen S, Stryhn H, Sogaard R, et al. Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Prev Vet Med* 2002; 53: 83–101.

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

Murtaugh MP. Update of PRRS immunology and viral genetics: From hopeless to hopeful. In: Proceedings of the 40th American Association of Swine Veterinarians. Dallas: AASV, 2009: 459–62.

Murtaugh MP, Stadejek T, Abrahante JE, Lam TT, Leung FC. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 2010; 154: 18–30.

Murtaugh MP, Gezow M. Immunological solutions for treatment and prevention of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Vaccine* 2011; 29: 8192–204.

Murtaugh MP. Immunopathological consequences of PRRSV infection. In: EuroPRRS 2012 Symposium. Understanding and combating PRRS in Europe. COST Action FA902: proceedings. Budapest, 2012: 111–4.

Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *Food Anim Econ* 2005; 227 (3): 385–92.

Nielsen J, Bøtner A. Haematological and immunological parameters of 4 1/2 –month old pigs infected with PRRS virus. *Vet Microbiol* 1997; 55: 289–94.

Nodelijk G, Nielen M, De Jong MCM, Verheijden JHM. A review of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Dutch breeding herds: population dynamics and clinical relevance. *Prev Vet Med* 2003; 60: 37–52.

OIE. World animal health 1991. Vol 7, no. 2. Animal health status and disease control methods. Paris: Office International des Epizootes, 1992: 2; 126.

Oleksiewicz MB, Bøtner A, Madsen KG, Storgaard T. Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Vet Microbiol* 1998; 64: 7–22.

Opriessing T, Pallares FJ, Nilubol D, et al. Genomic homology of ORF 5 gene sequence between modified live vaccine virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus challenge isolates is not predictive of vaccine efficacy.

J Swine Health Prod 2005; 13: 246–53.

Opriessing T, Baker RB, Halbur PG. Use of an Experimental model to test the efficacy of planned exposure to live porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clinic Vaccine Immunol* 2007; 14(12); 1572–7.

Opriessing T, Madson DM, Prickett JR, et al. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. *Vet Microbiol* 2008; 131: 103–14.

Ostrowski M, Galeota JA, Jar AM, Platt KB, Osorio FA, Lopez OJ. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J Virol* 2002; 76: 4241–50.

Osorio FA, Galeota JA Nelson E, et al. Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity.

Virology 2002; 302: 9–20.

Otake S, Dee SA, Rossow KD, et al. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by fomites (boots and coveralls). *J Swine Health Prod* 2002; 10(2): 59–65.

Otake S, Dee SA, Rossow KD, Moon RD, Trincado C, Pijoan C. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies (*Musca domestica*).

Vet Rec 2003; 152: 73–6.

Otake S, Dee SA, Corzo C, Oliveira S, Deen J. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet Microbiol* 2010; 145: 198–208.

Park BK, Yoon IJ, Joo HS. Pathogenesis of plaque variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pregnant sows. *Am J Vet Res* 1996; 57: 320–3.

Pejsak Z, Markowska-Daniel I. Losses due to porcine reproductive and respiratory syndrome in a large swine farm. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1997; 20(4): 345–52.

Pejsak Z, Markowska-Daniel I. Randomised, placebo-controlled trial of a live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in sows on infected farms.

Vet rec 2006; 158: 475–8.

- Pesch S, Mayer C, Ohlinger VF. New insights into the genetic diversity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol* 2005; 107: 31–48.
- Piras F, Bolland S, Laval F, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus-specific interferon-gamma (+) T-cell responses after PRRS virus infection or vaccination with an inactivated PRRS vaccine. *Viral Immunol* 2005; 18: 381–9.
- Pitkin A, Otake S, Deen J, Moon RD, Dee SA. Further assessment of houseflies (*Musca domestica*) as vectors for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under field conditions. *Can J Vet Res* 2009; 73(2): 91–6.
- Pitkin A, Otake S, Dee S. Biosecurity protocols for the prevention of spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Swine Disease Eradication Center, University of Minnesota College of Veterinary Medicine, 2011: 17 str.
http://www.aasv.org/aasv/VIRUS_PRRS_BiosecurityManual.pdf (5.11.2012)
- Plageman PG, Rowland RR, Faaberg KS. The primary neutralization epitope of porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain VR-2332 is located in the middle of the GP5 ectodomain. *Arch Virol* 2002; 147: 2327–47.
- Pol JM, Van-Dijak JE, Wensvoort G, Terpstra C. Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (syndrome: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). *Vet Q* 1992; 13: 137–43.
- Pol JM, Van Leengoed LAMG, Stockhove N, Kok G, Wensvoort G. Dual infection of PRRSV/*influenza* or PRRSV/*Actinobacillus pleuropneumoniae* in the respiratory tract. *Vet Microbiol* 1997; 55: 259–64.
- Plana-Duran J, Vayreda M, Vilarrasa J, et al. Porcine edemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. *Vet Microbiol* 1992; 33: 203–11.

Pravilnik o boleznih živali. Ur List RS 2007; 81: 11096–142.

Presenta P, Rebonato V, Sandri G, Giovanardi D, Sperati RL, Torriani S. Phylogenetic analysis of ORF5 in ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: a showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management. *Vet Microbiol* 2006; 114: 214–24.

Pricket J, Cutler S, Kinyon JM, et al. Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and antibody in swine oral fluid. *J Swine Health Prod* 2010; 18(4): 187–95.

Prieto C, Suarez P, Sanchez R, et al. Semen changes in boars after experimental infection with porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus. In: 13th International pig Veterinary Society Congress: proceedings. Bangkok: IPVS, 1994: 98.

Prieto C, Sanchez R, Martin-Rillo S, et al. Exposure of gilts in early gestation to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Rec* 1996; 138: 536–9.

Prieto C, Castro JM. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) in gestating sows. *Vet Res* 2000; 31: 56–7.

Prieto C, Álvarez E, Martínez-Lobo FJ, Simarro I, Castro JM. Similarity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus to vaccine strain is not necessarily predictive of the degree of protective immunity conferred. *Vet J* 2008; 175: 356–3.

Prieto C, Vázquez A, Núñez JI, Álvarez E, Simarro I, Castro JM. Influence of time on the genetic heterogeneity of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet J* 2009; 180: 363–70.

Pringproa K, Panyathong R, Chungpivat S, Kalpravidh W, Kesdahgsakonwut S, Thanawongnuwech RV. Study on potential vectors of PRRSV in mosquitos captured from PRRSV positive pig farm in Thailand. In: 18th International Pig Veterinary Society Congress: proceedings. Vol. 1. Hamburg: IPVS, 2004: 70.

- Pugh ML, Main R, DeBuse N, Karriker L. Development of a quality-controlled protocol and resulting commercial sow farm production on-farm live PRRS virus inoculation. Proc Am Assoc Swine Pract 2006; 36: 33–36.
- Ramirez A, Wang C, Prickett JR, et al. Efficient surveillance of pig population using oral fluid. Prev Vet Med 2012; 104: 292–300.
- Reotutar R. Swine reproductive failure syndrome mystifies scientists. J Am Vet Med Assoc 1989; 195: 425–8.
- Reick DL, Munoz-Zani C, Rossow K. Sampling of adult boars during early infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus for testing by polymerase chain reaction using a new blood collection technique (blood-swab method). J Swine Health Prod 2006; 14: 258–64.
- Reicks DL. Using air filtration to reduce the risk of PRRS introduction. In: 21th International Pig Veterinary Society Congress: proceedings. Vancouver: IPVS, 2010: 271.
- Renukaradhya GJ, Alekseev K, Jung K, Fang Y, Saif LJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced immunosuppression exacerbates the inflammatory response to porcine respiratory coronavirus in pigs. Viral Immunol 2010; 23(5): 457–66.
- Roca M, Gimeno M, Bruguera S, et al. Effects of challenge with a virulent genotype II strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on piglets vaccinated with an attenuated genotype I strain vaccine. Vet J 2012; 193(1): 92–6.
- Roic B, Jemersic L, Terzic S, Keros T, Balatinec J, Florijancic T. Prevalence of antibodies to selected viral pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia in 2005-06 and 2009-10. J Wildl Dis 2012; 48(1):131–7.
- Roitt I, Brostoff J and Male D. Immunology. 5th ed. London: Mosby, 1998: 423 str.

Ropp SL, Wess CE, Fang Y, et al. Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States.
J Virol 2004; 78: 3684–703.

Rosenfeld P, Turner V, Macinnes JI, et al. Evaluation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in laboratory rodents. *Can J Vet Res* 2009; 73: 313–8.

Rossow KD, Bautista EM, Goyal SM, et al. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs.
J Vet Diagn Invest 1994; 6: 3–12.

Rossow KD, Collins JE, Goyal SM, et al. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol* 1995; 32: 361–73.

Rowland RR. The interaction between PRRSV and the late gestation pigs fetus.
Virus Res 2010; 154: 114–22.

Rowland RR, Morrison RB. Challenges and opportunities for the control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.
Transbound Emerg Dis 2012; 59(1): 55–9.

Ruen PD, Wagner MA, Davies PR. PRRS planned exposure in sow herds: what to expect. In: 34th Annual meeting of the American Association of Swine Veterinarians: proceedings. Orlando: AASV, 2007: 9–14.

Saliki JT, Rodgers SJ, Eskew G. Serosurvey of selected viral and bacterial diseases in wild swine from Oklahoma. *J Wildl Dis* 1998; 34: 834–8.

Samsom JN, Bruin TG, Voermans JJ, Meulenberg JJ, Pol JM, Bianchi AT. Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8+ cells.
J Gen Virol 2000; 81: 497–505.

Sanford E. Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS): establishment and spread between 1987 and 1992 in Ontario, Canada. In: 12th International Pig Veterinary Society Congress: proceedings. Hague: IPVS, 1992: 117.

Scortti M, Prieto C, Simarro I, Castro JM. Reproductive performance of gilts following vaccination and subsequent heterologous challenge with European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 2006; 66: 1884–93.

Scortti M, Prieto C, Alvarez E, Simarro I, Castro JM. Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against heterologous challenge with PRRSV. *Vet Rec* 2007; 161: 809–13.

Schaefer N, Morrison RB. Effect on total pigs weaned of herd closure for elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

J Swine Health Prod 2007; 15 (3): 152–5.

Segales J, Domingo M, Balasch M, Solano GI, Pijoan C. Ultrastructural study of porcine alveolar macrophages infected in vitro with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus, with and without *Haemophilus parasuis*.

J Comp Pathol 1998; 118: 231–43.

Shibata I, Mori M, Urano K. Experimental infection of maternally immune pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Med Sci* 1998; 60(12): 1285–91.

Sirinarumitr T, Zhang Y, Kluge J, et al. A pneumo-virulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and *in vivo*. *J Gen Virol* 1998; 79: 2989–95.

Solano GI, Segales J, Collins JE, Molitor TW, Pijoan C. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Virus PRRS) interaction with *Haemophilus parasuis*.

Vet Microbiol 1997; 55: 247–57.

Stadejek T, Stankevicius A, Storgaard T, et al. Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *J Gen Virol* 2002; 83: 1861–73.

Stadejek T, Oleksiewicz MB, Patapchuk D, Podgorska K. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in Eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J Gen Virol* 2006; 87: 1835–41.

Stadejek T, Martin B, Oleksiewicz MB, et al. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristic and geographical distribution in Europe. *Arch Virol* 2008; 153: 1479–88.

Stevenson GW, Van Alstine WG, Kanitz CL, Keffaber KK. Edemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of nursery pigs in two swine herds without current reproductive failure. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 432–4.

Suardhat S, Thanawongnuwech R. Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 2003; 84: 2755–60.

Suarez P. Ultrastructural pathogenesis of PRRS virus. *Vet Res* 2000; 31: 47-55.

Sur JH, Doster AB, Christian JS, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J Virol* 1997; 71: 9170–79.

Swenson SL, Zimmerman JJ. In: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimental infected boars: isolation from semen. In: 24th Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners: proceedings. Kansas city, Missouri: American Association of Swine Practitioners, 1993: 719–20.

Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, et al. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars.

J Am Vet Med Assoc 1994; 204: 1943–8.

Štukelj M, Valenčak Z. Ustaviti PRRS v Sloveniji? Reja Pašičev. 2008; 11(3): 15–6.

Štukelj M, Valenčak Z. PRRS – je z boleznijo možno kaj storiti?

Reja Prašičev. 2010; 13(2): 17–8.

Štukelj M, Toplak I, Valenčak Z. Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with serumization: preliminary results. In: EuroPRRS2011 Symposium: proceedings. Novi Sad: Scientific Veterinary Institute “Novi Sad”, 2011:111–6.

Štukelj M, Valenčak Z. Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with serumization, natural exposure and vaccination on six pig farms in Slovenia.

Savrem Poljopr 2012; 61(1): 75–83.

Štukelj M. Ukrepi ob pojavu prašičjega reproduksijskega in respiratornega sindroma. In: Zbornik podiplomskega izpopolnjevanja. Ptuj, 10. februarja 2012. Ljubljana: Veterinarska zbornica, Sekcija zasebnih veterinarjev praktikov, 2012: 37–8.

Taylor DJ. Pig diseases, 8th ed.: Glasgow: Taylor D.J., 2006: 60–8.

Terpstra C, Wensvoort G, Ter Laak EA. The »new« pig disease: laboratory investigations. In: CEC. The new pig disease: porcine reproductive and respiratory syndrome: a report on the seminar/workshop held in Brussels on 29-30 April 1991. Brussels: European Commission Directorate General for Agriculture, 1991: 36–45.

Thacker EL, Halbur PG, Thacker BJ. Effect of vaccination on dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV. Vet Res 2000; 31: 60.

Thanawongnuwech R, Halbur PG, Andrews JJ. Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in neurovascular lesions.

J Vet Diagn Invest 1997; 9: 334–7.

Thanawongnuwech R, Brown G, Halbur P, Roth J, Royer R, Thacker B. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection. Vet Pathol 2000; 37: 143–52.

Thanawongnuwech R, Rungsipipat A, Disatian S, Saiyasombat R, Napakanaporn S, Halbur P. Immunohistochemical staining of IFN- γ positive cells in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected lungs. Vet Immunol Immunopathol 2003; 91: 73–7.

Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tatsanakit A, Damrongwatanapokin S. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. Vet Microbiol 2004a; 101: 9–21.

Thanawongnuwech R, Thacker B, Halbur P, Thacker EL. Increased Production of Proinflammatory Cytokines following Infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Clin Diagn Lab Immunol 2004b; 11(5): 901–8.

Toma B, Vaillancourt JP, Dufour B, et al. Dictionary of veterinary epidemiology. Ames: Iowa State University Press, 1991: 56, 83, 90.

Toplak I, Štukelj M, Zabavnik Piano J, Hostnik P, Grom J, Valenčak Z. Študija o pojavnosti prašičjega reproduktivnega in respiratornega sindroma (PRRS) v Sloveniji v letu 2010. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, Nacionalni veterinarski inštitut, 2010: 40 str.

Toplak I. Molecular epidemiology study of PRRSV in Slovenia and problems with the detection of PRRSV field strains between 2009-2010. In: The Balkan meeting on PRRS diagnostics: proceedings. Split: Hrvatski veterinarski institut, 2011: 16.

Toplak I, Rihtarič D, Hostnik P, Grom J, Štukelj M, Valenčak Z. Identification of a genetically diverse sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Slovenia and the impact on the sensitivity of four molecular tests.
J Virol Methods 2012a; 179: 51–6.

Toplak I, Štukelj M, Gracieux P, Gyla B, Larsen L, Rauh R. Detection of PRRSV in 218 field samples using six molecular methods: what we are looking for? In: EuroPRRS 2012 Symposium. Understanding and combating PRRS in Europe. COST Action FA902: proceedings. Budapest, 2012b: 34–42.

Torremorell M, Christianson WT. PRRS eradication by herd closure.
Adv Pork Prod 2002; 13: 169–76.

Torremorell M, Moore C, Christianson WT. Establishment of a herd negative for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRSV-positive sources.
Swine Health Prod 2002; 10(4): 153–60.

Torremorell M, Henry S, Christianson WT. Eradication using herd closure. In: Zimmerman J, Yoon KJ, eds. The PRRS compendium. 2nd ed. Des Moines, Iowa: National Pork Board, 2003:157–61.

Torremorell M, Geiger JO, Thompson B, Christianson WT. V. Evaluation of virus PRRS outbreaks in negative herds. In: 18th International Pig Veterinary Society Congress: proceedings. Hamburg: IPVS, 2004: Vol 1, 103.

Torremorell M, Rojas M, Cuevas L, et al. National PRRSV eradication program in Chile. In: 20th International Pig Veterinary Society Congress: proceedings. Durban: IPVS, 2008: Vol 1, 55.

Trincado C, Dee SA, Rossow K, Halvorson D, Pijoan C. Evaluation of the role of mallard ducks as vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.
Vet Res 2004; 154: 233–7.

Trincado C, Dee SA, Jaconbson L, et al. Studies about porcine reproductive and respiratory syndrome transmission by aerosol and non-porcine vectors under field condition. In: Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians: proceedings. Orlando: AAS, 2003: 503–6.

Valenčak Z. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Slovenia: evaluation of serology. Slov Vet Res 2004; 41(2): 99–101.

Van Reeth K. Pathogenesis and clinical aspects of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Vet Microbiol 1997; 55: 223–30.

Van Reeth K, Labarque G, Nauwynck H, Penseart M. Differentioal production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different rerspiratory virus infections: correlations with pathogenecy. Res Vet Sci 1999; 67: 47–52.

Vashisht K, Erlandson KR, Firkins LD, Zuckermann FA, Goldberg TL. Evaluation of contact exposure as a method for acclimatizing growing pigs to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Am Vet Med Assoc 2008; 232: 1530–5.

Wagstrom EA, Chang CC, Yoon KJ, Zimmerman JJ. Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary gland secretions of sows. Am J Vet Res 2001; 62: 1876–80.

Wensvoort G, de Kluyver EP, Pol JM, Wagenaar F, et al. Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad. Vet Microbiol 1992; 33: 185–93.

White MEC. The clinical signs and symptoms of blue-eared pig disease (PRRS). Pig Vet J 1992a; 28: 62–8.

White MEC. The clinical signs and symptoms of blue-eared pig disease (PRRS): clinical update. Pig Vet J 1992b; 29: 179–87.

Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, et al. Porcine reproductive and respiratory virus: Routes of excretion. *Vet Microbiol* 1997; 57: 69–81.

Wills RW Doster AR, Galeota J, Sur JH, Osoro FA. Duration of PRRS virus infection and Proportion of persistently infected pigs. In: 2000 Nebraska Swine Reports. Lincoln, 2000: 44–6. <http://jcm.asm.org/content/41/1/58.full.pdf+html> (15.11.2012)

Wills RW, Doster AR, Galeota JA, Sur JH, Osorio FA. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Clinic Microbiol* 2003; 41: 58–62.

Wissink EH, van Wijak HA, Kroese MV, et al. The major envelope protein, GP5, of a European porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralization epitope in its N-terminal ectodomain. *J Gen Virol* 2003; 84(6): 1535–43.

World Organisation for Animal Health (OIE). OIE-listed diseases, infections and infestations inforce in 2013. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for tettestrial animals. 7th ed. Paris: Office International des Epizooties, 2012.

<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2013/> (5.1.2013)

Yager M. The diagnostic sensitivity of immunohistochemistry for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lung of vaccinated and unvaccinated swine. *J Vet Diagn Invest* 2002; 14: 15–9.

Yang JS, Moon HJ, Lee CS. Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from a seedstock breeding farm and supplying boar stud by a modified test and removal. *Vet Rec* 2008; 162; 333–7.

Yoo SH, Wootton SK, Li G, et al. Colocalization and Interaction of the porcine arterivirus nucleocapsid protein with the small nucleolar RNA–Associated protein fibrillarin. *J Virol* 2003; 77(22): 12173–83.

Yoon KJ, Joo HS, Goyal SM, Molitor TW. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J Vet Diagn Invest* 1994; 6: 28992.

Yoon KJ, Zimmerman JJ, Swenson SL, et al. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J Vet Diagn Invest* 1995; 7: 305–12.

Yoon KJ, Zimmerman JJ, Chang CC, Cancel-Tirado S, Harmon KM, McGinley MJ. Effect of challenge dose and route on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in young swine. *Vet Res* 1999; 30: 629–38.

Yoon SH, Song JY, Lee CH, Choi EJ, Kim B. Genetic characterization of the Korean porcine reproductive and respiratory syndrome viruses based on the nucleocapsid protein gene (ORF7) sequences. *Arch Virol* 2008; 153: 627–35.

Zhou L, Yang H. Porcine reproductive and respiratory syndrome in China. *Virus Res* 2010; 154: 31–7.

Zhou YJ, Yu H, Tian ZJ, et al. Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in China from 2006 to 2008. *Virus Res* 2009; 144, 136–44.

Zhuang Q, Barfod K, Wachmann H, Mortesen S, Willeberg P. Serological surveillance for PRRS in Danish genetic pig herds and risk factors for PRRS infection. In: 17th International Pig Veterinary Society Congress: proceedings. Ames, Iowa: IPVS, 2002: Vol 2, 230.

Zimmerman JJ, Yoon KJ, Wills RW, Swenson SL. General overview of PRRSV: a perspective from the United States. *Vet Microbiol* 1997; 55: 187–96.

Zimmerman JJ, Benfield DA, Murtaugh MP, Osorio F, Stevenson GW, Torremorell M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (porcine arterivirus). In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. Diseases of swine. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing Professional, 2006: 387–417.

Zimmerman JJ. V. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): the disease that keeps bugging us. In: Facing the new reality – 8th London Swine Conference: proceedings. London: Ontario, 2008: 63–71.

Zimmerman JJ, Benfield DA, Dee SA, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (porcine arterivirus). In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez KJ, Stevenson GW. Diseases of swine. 10th ed. Ames: Blackwell Publishing Professional, 2012: 461–86.