

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta



UDK 579.852:57.083.1:57.088.7:575.22(043.3)

Jan Plut, dr. vet. med.

**UPORABNOST USTNE TEKOČINE PRAŠIČEV V
LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI PRAŠIČJEGA
REPRODUKCIJSKEGA IN RESPIRATORNEGA
SINDROMA TER NJENA UČINKOVITOST PRI
KONTROLIRANEM PREKUŽEVANJU MLADIC**

Doktorska disertacija

**THE APPLICABILITY OF PIG ORAL FLUID IN
LABORATORY DIAGNOSTICS OF PORCINE
REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME
AND ITS EFFECTIVENESS IN CONTROLLED
EXPOSURE OF GILTS**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2022

Jan Plut

Uporabnost ustne tekočine prašičev v laboratorijski diagnostiki prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma ter njena učinkovitost pri kontroliranem prekuževanju mladic

Delo je bilo opravljeno na Kliniki za prežvekovalce in prašiče Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, na Inštitut za varno hrano, krmo in okolje Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani ter na dveh slovenskih velikih komercialnih rejah prašičev.

Javni zagovor je bil opravljen dne:

Mentorica: izr. prof. dr. Marina Štukelj

Somentorica: doc. dr. Urška Jamnikar Ciglencečki

Izjava o delu: Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršil avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

prof. dr. Tadej Malovrh (Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta)

prof. dr. Peter Hostnik (Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta)

doc. dr. Špela Malovrh (Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta)

IZVLEČEK

Ključne besede: prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom – preventiva in kontrola – imunologija; klinične laboratorijske tehnike; protitelesa proti virusom – kri – imunologija; slina – virologija – imunologija; encimsko imunski test – metode; reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo – metode; adaptacija – imunologija; virus prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma – izolacija in čiščenje; prašiči – imunologija;

Prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom (PRRS) povzroča istoimenski virus (PRRSV). Je ena izmed najpomembnejših boleznih prašičev in zaradi velike gospodarske škode je nujno uvesti nekatere ukrepe za omilitev posledic PRRS. Prvi izmed možnih ukrepov je kontrola bolezni, pri kateri so ključna kategorija mladice. Te po prihodu na farmo s prisotnim PRRSV aklimatiziramo. Cilj aklimatizacije je imunizacija mladice proti homolognemu sevu virusa ter njihova zaščita in zaščita njihovih gnezd pujskov pred kliničnimi posledicami bolezni. Uspešnost aklimatizacije ugotavljamo z molekularnimi in serološkimi diagnostičnimi metodami. Namen dela je primerjati vzorce seruma in ustne tekočine (angl. *oral fluid*; OF) in z ugotavljanjem prisotnosti RNA PRRSV in specifičnih protiteles spremljati potek aklimatizacije pod različnimi pogoji glede na različne skupine mladice. V raziskavi smo spremljali aklimatizacijo pri preliminarni skupini in šestih različnih skupinah mladice, od I do VI. V preliminarni skupini mladice in v skupinah I in II smo uporabili metodo naravne prekužitve in aklimatizacije mladice. Pri skupinah III in IV smo poleg naravne prekužitve uporabili še bombažne vrvi, prepojene z OF s PRRSV okuženih prašičev. Pri skupinah V in VI pa smo za prekuževanje uporabili le bombažne vrvi, prepojene z OF s PRRSV okuženih prašičev. Vpliv uporabe bombažnih vrvi, prepojenih z OF s PRRSV okuženih prašičev, na hitrost in uspešnost aklimatizacije mladice doslej še ni bil opisan v znanstvenih publikacijah. Od uhlevitve smo tedensko ugotavljali prisotnost RNA PRRSV z verižno reakcijo s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) in specifičnih protiteles z encimsko imunskim testom (ELISA) v individualnih vzorcih seruma in skupinskih vzorcih OF. Pri analizi rezultatov prisotnosti RNA PRRSV in specifičnih protiteles smo ugotovili statistično značilne razlike med skupinama I in II ter III in IV. V primerjavi s skupinama I in II lahko pri skupinah III in IV virusno RNA in specifična protitelesa v krvi ugotovimo hitreje. Prav tako je delež živali z ugotovljeno RNA PRRSV v vzorcih krvi v skupinah III in IV značilno manjši 28 dni po okužbi (angl. *days post infection*, DPI) v primerjavi s skupinama I in II. Uporaba vrvi, prepojenih z OF s PRRSV okuženih prašičev, pospeši okužbo in tvorbo specifičnih protiteles. Zadnji dan poskusa, 56 DPI, smo pri skupinah mladice od I do IV ugotovili, da je pri nekaterih mladicih PRRSV RNA v krvi še zaznavna. Pri skupinah V in VI samo z uporabo vrvi, prepojenih z OF s PRRSV okuženih prašičev, nismo mogli izzvati aktivne klinične okužbe. Pri eni mladici iz skupine VI smo ugotovili, da je pozitivno reagirala na prisotnosti specifičnih protiteles od 7 DPI dalje. Primerjava individualnih vzorcev seruma in skupinskih vzorcev OF je pokazala, da lahko RNA PRRSV ugotavljamo s primerljivo verjetnostjo. Pri določanju specifičnih protiteles v skupinskih vzorcih OF ugotavljali prisotnost specifičnih protiteles že pred izpostavitvijo mladice PRRSV. Komercialni komplet za dokaz specifičnih protiteles v OF je medtem proizvajalec umaknil iz redne prodaje.

ABSTRACT

Key words: pigs – immunology; porcine reproductive and respiratory syndrome – prevention and control; saliva virology – immunology; enzyme-linked immunosorbent assay – methods; reverse transcriptase polymerase chain reaction – methods; acclimatization – immunology; porcine respiratory and reproductive syndrome virus – isolation and purification

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). PRRS is one of the most important economic pig diseases. Due to severe economic losses, it is mandatory to take measures to limit the negative disease effects. One of the possible measures against PRRS is control of the disease focusing on naïve replacement gilts as the key pig category in the process. PRRS-free replacement gilts are acclimated as soon as entering the PRRS-positive farm. The goal of acclimatization is homologue protection of them and their offspring against clinical PRRS. The outcome of acclimatization is monitored with molecular and serological diagnostic methods. The aim of this study is to compare sera and oral fluid (OF) samples and to assess the success of different approaches for gilt acclimatization in different gilt groups with detection of PRRSV RNA and specific antibodies in both samples. The gilts in this study were divided into 7 groups: preliminary group and groups I–VI. The method of natural acclimatization through contact with infected pigs and their secrets was used in preliminary group and groups I and II. In groups III and IV, the same method was applied as in groups I and II with addition of ropes soaked with OF from PRRS-positive pigs. In groups V and VI, only ropes soaked with OF from PRRS-positive pigs were used for acclimatization. The impact of additional ropes contaminated with infective material for gilt acclimatization has not been yet assessed in peer-reviewed literature up until today. Gilts were monitored weekly, since the day of arrival at the PRRS-positive farm (day 0), both individual serum samples and group OF samples were tested for presence of PRRSV RNA and specific antibodies with reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. Statistically significant differences were detected in detection of PRRSV RNA and specific antibodies between groups with different treatment, I and II and III and IV. In blood samples from groups III and IV, PRRSV RNA and specific antibodies were detectable sooner compared to groups I and II. The percentage of PRRSV RNA-positive blood samples was significantly lower in groups III and IV compared to groups I and II 28 days post infection (DPI). The implication of cotton ropes soaked with PRRSV-positive OF accelerated the disease course, causing faster emergence of PRRSV RNA and specific antibodies in gilts. At the last day, 56 DPI, there was a smaller number of gilts with detectable PRRSV RNA in the organism. We were unable to induce a clinical PRRS using only peroral contact with ropes containing PRRSV-positive OF in gilt groups V and VI. However, ELISA indicated possible presence of specific antibodies in one of the gilts from group VI since 7 DPI. Some group samples of OF were tested positive for specific antibody presence even before exposure of gilts to the virus. The commercial kit was removed from the regular product list by the manufacturer shortly thereafter due to troubleshooting.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK	4
ABSTRACT	5
KAZALO VSEBINE.....	6
KAZALO TABEL.....	9
KAZALO SLIK.....	10
SEZNAM OKRAJŠAV	11
1 Uvod	15
1.1 Namen dela, cilji in delovne hipoteze	17
2 Pregled literature.....	19
2.1 Etiologija PRRS	19
2.1.1 Zgodovina PRRS	19
2.1.2 Taksonomija	19
2.1.3 Morfologija.....	20
2.1.4 Virusni genom in strukturni ter nestrukturni proteini	20
2.1.5 Raznolikost genoma	21
2.2 Epidemiologija	22
2.2.1 Preživetje virusa izven gostitelja	23
2.2.2 Načini prenosa virusa in kužne doze	23
2.3 Patogeneza	25
2.3.1 Okužba gostiteljskih celic.....	25
2.3.2 Replikacija virusa in mehanizem celičnih poškodb.....	27
2.3.3 Patogeneza v akutni fazi PRRS	27
2.3.4 Patogeneza v endemični fazi PRRS.....	29
2.3.5 Patogeneza reprodukcijskih motenj pri PRRS	29
2.3.5.1 Patogeneza PRRS pri bregih plemenskih svinjah in mladicah.....	29
2.3.5.2 Patogeneza PRRSV pri merjascih	30
2.4 Klinična znamenja.....	31
2.4.1 Klinična znamenja v akutni fazi bolezni.....	31
2.4.1.1 Akutni PRRS pri plemenskih svinjah.....	31
2.4.1.2 Akutni PRRS pri plemenskih merjascih.....	33
2.4.1.3 Akutni PRRS pri sesnih pujskih.....	33
2.4.1.4 Akutni PRRS pri tekačih	33
2.4.1.5 Akutni PRRS pri pitancih.....	34
2.4.2 Klinična znamenja v endemični fazi bolezni	34
2.4.2.1 Endemični PRRS pri plemenskih svinjah	35
2.4.2.2 Endemični PRRS pri merjascih.....	35
2.4.2.3 Endemični PRRS pri sesnih pujskih.....	35
2.4.2.4 Endemični PRRS pri tekačih in pitancih	36
2.5 Imunski odziv proti virusu prrs	36

2.5.1	Imunski odziv in signalne poti na molekularni ravni.....	36
2.5.2	Vloga prirojene in nespecifične imunosti pri okužbi s PRRSV.....	38
2.5.2.1	Genetsko pogojena odpornost.....	38
2.5.2.2	Nespecifična obramba.....	38
2.5.3	Specifična obramba ali imunost.....	39
2.5.3.1	Celična imunost.....	39
2.5.3.2	Protitelesna imunost.....	40
2.5.4	Trajanje imunosti.....	42
2.5.5	Navzkrižna zaščita med heterolognimi sevi PRRSV.....	42
2.5.6	Kolostralna imunost.....	43
2.5.7	Imunosupresivno delovanje virusa in sekundarne ter sočasne okužbe.....	43
2.5.7.1	Imunosupresija.....	43
2.5.7.2	Sekundarne/sočasne okužbe s PRRSV in drugimi patogenimi mikrobi.....	44
2.6	Diagnostika.....	45
2.6.1	Sum na bolezen.....	45
2.6.2	Diferencialna diagnostika.....	45
2.6.3	Vzorci za laboratorijsko diagnostiko PRRSV.....	45
2.6.3.1	Vzorci za dokaz RNA PRRSV ali njegovih antigenov.....	45
2.6.3.2	Vzorci za dokaz protiteles proti virusu PRRS.....	46
2.6.3.3	Metodologija določanja velikosti vzorca.....	46
2.6.3.4	Transport vzorcev krvi in ustne tekočine do laboratorija in pogoji shranjevanja.....	47
2.6.4	Dokaz virusa in virusnih antigenov.....	48
2.6.4.1	Rast PRRSV na celičnih kulturah in celičnih linijah.....	48
2.6.4.2	Dokaz virusnih antigenov z uporabo konjugiranih protiteles.....	48
2.6.4.3	Elektronska mikroskopija.....	49
2.6.5	Molekularne metode dokazovanja PRRSV.....	49
2.6.5.3	Določanje nukleotidnega zaporedja genomov.....	51
2.6.6	Serološke metode za dokazovanje prisotnosti specifičnih protiteles proti PRRSV.....	51
2.7	Ukrepi proti PRRS.....	53
2.7.1	Kontrola PRRS.....	53
2.7.1.1	Aklimatizacija mladic.....	54
2.7.1.2	Kontrola semena za osemenje.....	58
2.7.1.3	Kontrola endemskih bolezni.....	58
2.7.2	Biovarnostni ukrepi.....	59
2.7.2.1	Zunanja biovarnost.....	59
2.7.2.2	Notranja biovarnost.....	60
2.7.3	Nadzor PRRS.....	61
3	Material in metode.....	63
3.1	Material.....	63
3.1.1	Prašičji farmi.....	63
3.1.2	Mladice na farmi A, kjer je prisoten PRRSV.....	64
3.1.3	Hleva in mladice v poskusu na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani.....	66
3.1.4	Odvzem krvi.....	66
3.1.5	Vzorčenje OF in vrvi za prekuževanje mladic.....	67
3.2	Metode.....	67
3.2.1	Časovni potek poskusa.....	67
3.2.2	Aklimatizacija mladic.....	67
3.2.2.1	Naravna prekužitev z izpostavitvijo mladic viremičnim živalim in njihovim izločkom.....	67

3.2.2.2	Naravna prekužitev s sočasno izpostavitvijo mladic viremičnim živalim in bombažnim vrvem, prepojenih z OF viremičnih živali.....	67
3.2.2.3	Poskusne živali v hlevih VF UL – prekuževanje mladic z uporabo bombažnih vrvi, prepojenih z OF viremičnih živali.....	68
3.2.3	Dinamika odvzema vzorcev	68
3.2.4	Transport in priprava vzorcev.....	72
3.2.5	Laboratorijske preiskave.....	72
3.2.5.1	Molekularne analize.....	72
3.2.5.2	Serološka analiza.....	74
3.2.6	Statistične metode za obdelavo rezultatov	75
4	Rezultati.....	76
4.1	Dokazovanje RNA PRRSV.....	76
4.1.1	Preliminarna skupina mladic	76
4.1.2	Skupina mladic I.....	77
4.1.3	Skupina mladic II.....	78
4.1.4	Skupina mladic III	80
4.1.5	Skupina mladic IV	81
4.1.6	Skupini mladic V in VI.....	83
4.1.7	RT-PCR v realnem času za vzorce OF iz vrvi uporabljenih za prekuževanje mladic	83
4.1.8	Določanje nukleotidnega zaporedja dela genoma PRRSV	83
4.2	dokazovanje specifičnih protiteles proti PRRSV	84
4.2.1	Preliminarna skupina mladic	84
4.2.2	Skupini mladic I in II.....	84
4.2.3	Skupini mladic III in IV.....	87
4.2.4	Skupini mladic V in VI.....	90
4.3	Statistična analiza.....	92
4.3.1	Statistična analiza rezultatov molekularne diagnostike	92
4.3.2	Statistična analiza rezultatov serologije.....	92
4.3.2.1	Individualni vzorci seruma.....	92
4.3.2.2	Skupinski vzorci OF.....	93
5	Razprava	95
6	Sklepi	110
7	Povzetek.....	112
8	Summary.....	114
9	Zahvale	116
10	Literatura.....	117

KAZALO TABEL

Tabela 1: Skupno število odvzetih vzorcev	69
Tabela 2: Skupno število preiskanih vzorcev z različnimi laboratorijskimi preiskavami.....	72
Tabela 3: Rezultati preiskav individualnih serumov in združenih individualnih vzorcev serumov ter OF na prisotnost RNA PRRSV z RT-PCR v preliminarni skupini mladic	76
Tabela 4: Rezultati preiskav individualnih vzorcev serumov in skupnega vzorca OF na prisotnost RNA PRRSV z RT-PCR v skupini mladic I.....	77
Tabela 5: Rezultati preiskav individualnih vzorcev serumov in skupnega vzorca OF na prisotnost RNA PRRSV z RT-PCR v skupini mladic II.....	79
Tabela 6: Rezultati preiskav individualnih vzorcev serumov in skupnega vzorca OF na prisotnost RNA PRRS z RT-PCR v skupini III	80
Tabela 7: Rezultati preiskav individualnih vzorcev serumov in skupnega vzorca OF na prisotnost RNA PRRS z RT-PCR v skupini IV	82
Tabela 8: Vrednosti Ct vzorcev OF iz vrvi za aklimatizacijo mladic z metodo qRT-PCR	83
Tabela 9: S/P vrednosti individualnih vzorcev seruma in njihova povprečna vrednost ter S/P vrednosti skupinskih vzorcev OF v preliminarni skupini mladic	84
Tabela 10: Vrednosti S/P pri individualnih vzorcih seruma ter pri skupinskih vzorcih OF v skupini mladic I	85
Tabela 11: Vrednosti S/P pri individualnih vzorcih seruma ter pri skupinskih vzorcih OF v skupini mladic II ...	86
Tabela 12: Vrednosti S/P pri individualnih vzorcih seruma ter pri skupinskih vzorcih OF v skupini mladic III..	88
Tabela 13: Vrednosti S/P pri individualnih vzorcih seruma ter pri skupinskih vzorcih OF v skupini mladic IV .	89
Tabela 14: Vrednosti S/P pri individualnih vzorcih seruma ter pri skupinskih vzorcih OF v skupini mladic V ...	91
Tabela 15: Vrednosti S/P pri individualnih vzorcih seruma ter pri skupinskih vzorcih OF v skupini mladic VI .	91
Tabela 16: Dvostranska analiza rezultatov PCR preiskav za ugotavljanje prisotnosti RNA PRRSV v individualnih vzorcih seruma.	92
Tabela 17: Vpliv obravnavanih spremenljivk, časa in obravnave (OBR) ter njune interakcije (čas*OBR), na skupino mladic pri detekciji specifičnih protiteles v serumu individualnih živali.....	92
Tabela 18: Dvostranska primerjava med skupinami A, B in C pri ugotavljanju prisotnosti specifičnih protiteles v individualnih vzorcih seruma.	93
Tabela 19: Vpliv obravnavanih spremenljivk, časa in načina prekužitve (OBR) ter njune interakcije (čas*OBR) na skupino mladic pri tvorbi protiteles v OF.	94

KAZALO SLIK

Slika 1: Primerjava genomov najpomembnejših virusov družine Arteriviridae in prikaz regij ORF (prirejeno po King in sod., 2012).	20
Slika 2: Vezava PRRSV, preko GP2a-3-4, na CD163 receptor gostiteljske celice (povzeto po Lunney in sod., 2016).....	26
Slika 3: Farma A, na kateri je bil potrjen PRRS. S puščico je označen objekt za prekuževanje, kjer se uhlevljajo nadomestne mladice, preden se prekužijo z virusom.	64
Slika 4: Nadomestne mladice v skupinskih boksih, ki omogočajo neposreden stik z okuženimi živalmi.....	65
Slika 5: Viremični tekači, uhlevljeni v prostore za aklimatizacijo mladic.	65
Slika 6: Mladice v poskusu v hlevih VF UL.	68
Slika 7: Fiksacija mladice z nosno zanko in odvzem krvi iz žile <i>vena cava cranialis</i>	70
Slika 8: Nadomestne mladice, ki žvečijo bombažno vrv.....	70
Slika 9: Ožemanje OF iz vrvi.	71
Slika 10: Shranjevanje vrvi prepojenih z OF prašičev z dokazanim PRRS.....	71
Slika 11: Delež pozitivnih in negativnih mladic iz skupine I na RNA PRRSV določenih z RT-PCR.	78
Slika 12: Delež pozitivnih in negativnih mladic iz skupine II na RNA PRRSV določenih z RT-PCR.....	79
Slika 13: Delež pozitivnih in negativnih mladic iz skupine III na RNA PRRSV določenih z RT-PCR.	81
Slika 14: Delež pozitivnih in negativnih mladic iz skupine IV na RNA PRRSV določenih z RT-PCR.	82
Slika 15: Prikaz nivoja protiteles v individualnih vzorcih seruma s standardnimi napakami v primerjavi s skupinskimi vzorci OF v času trajanja poskusa v skupini mladic I.	85
Slika 16: Prikaz nivoja protiteles v individualnih vzorcih seruma s standardnimi napakami v primerjavi s skupinskimi vzorci OF v času trajanja poskusa v skupini mladic II.....	87
Slika 17: Prikaz nivoja protiteles v individualnih vzorcih seruma s standardnimi napakami v primerjavi s skupinskimi vzorci OF v času trajanja poskusa v skupini mladic III.	88
Slika 18: Prikaz nivoja protiteles v individualnih vzorcih seruma s standardnimi napakami v primerjavi s skupinskimi vzorci OF v času trajanja poskusa v skupini mladic IV.	90

SEZNAM OKRAJŠAV

+ssRNA	pozitivno orientirana enovijačna RNA (angl. <i>positive-sense single-stranded RNA</i>)
ADE	pospeševanje okužbe na osnovi protiteles (angl. <i>antibody-dependent enhancement of viral entry</i>)
AGE	agarozna gelska elektroforeza
AIAO	naenkrat noter, naenkrat ven (angl. <i>all-in/all-out</i>)
ak	aminokislina
APC	antigen predstavitvena celica
BCR	B-celični receptor na površini limfocitov B
bp	bazni par
CD	linija diferenciacije (angl. <i>cluster of differentiation</i>)
Ct	pražni cikel (angl. <i>cycle threshold</i>)
CFU	kolonijska enota (angl. <i>colony forming unit</i>)
CPE	citopatski efekt
DPI	dni po okužbi
EAV	virus konjskega arteritisa (angl. <i>equine arteritis virus</i>)
EM	elektronska mikroskopija
ELISA	encimsko-immunski test za dokazovanje specifičnih protiteles ali antigenov (angl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FFU	fokusna enota oziroma celica, okužena z virusom in zaznana preko vezave fluorescirajočih protiteles (angl., <i>fluorescent foci unit</i> ali <i>focus forming unit</i>)
FMIA	fluorescenčni imunski test z mikrokroglicami (angl. <i>fluorescent microsphere immunoassay</i>)
GP	glikoziliran protein
HP-PRRSV	visoko patogeni sev PRRSV (angl. <i>highly pathogenic PRRSV strain</i>)
ICTV	Mednarodni odbor za taksonomijo virusov (angl. <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)

ID	infekcijska doza potrebna za okužbo
IF	imunofluorescenca
IFN	interferon
Ig	protitelo/-sa (angl. <i>immunoglobulin</i>)
IL	interlevkin
IP	imunoperoksidaza
JAK	Janus-kinaza
LAMP	zanka izotermalnega pomnoževanja (angl. <i>loop mediated isothermal amplification</i>)
LV-PRRSV	referenčni sev Lelystad PRRSV-1
MAT	test mikroaglutinacije (angl. <i>microscopic agglutination test</i>)
MDA	protein, povezan z diferenciacijo melanoma (angl. <i>melanoma differentiation-associated protein</i>)
MHC	histokompatibilnostni kompleks (angl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MLV	živo oslABLjeno cepivo (angl. <i>modified live vaccine</i>)
NAb	nevtralizacijska protitelesa (angl. <i>neutralization antibodies</i>)
nsp	nestrukturni protein
NGS	sekvenciranje naslednje generacije (angl. <i>next generation sequencing</i>)
NK	celice naravne ubijalke (angl. <i>natural killer cells</i>)
nt	nukleotid
OBR	obravnava
OD	optična gostota (angl. <i>optical density</i>)
OF	ustna tekočina (angl. <i>oral fluid</i>)
OIE	Mednarodna organizacija za zdravje živali (fr. <i>Organization Internationale des Epizooties</i>)
ORF	odprti bralni okvir (angl. <i>open reading frame</i>)
PAM	prašičji alveolarni makrofagi

PCV-2	prašičji cirkovirus tipa 2
PCVAD	obolenja povezana s cirkovirusnimi okužbami (angl. <i>porcine circovirus associated diseases</i>)
PI	prašičja influenza
pM	membranski protein
PRCV	prašičji respiratorni koronavirus (angl. <i>porcine respiratory coronavirus</i>)
PRDC	prašičji kompleks respiratornih bolezni (angl. <i>porcine respiratory disease complex</i>)
PRRS	prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom
PRRSV	virus PRRS
PRRSV-1	genotip 1 virusa PRRS
PRRSV-2	genotip 2 virusa PRRS
R _n	reprodukcijsko število virusa
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RIG	gen, katerega prepisovanje pospeši retinoična kislina (angl. <i>retinoic acid-inducible gene</i>)
RTC	replikacijsko-transkripcijski kompleks (angl. <i>replication/transcription complex</i>)
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
S/P	razmerje izmerjene vrednosti preiskovanega vzorca glede na pozitivno kontrolo (angl. <i>sample to positive</i>)
SCNT	prenos jedra somatskim celicam (angl. <i>somatic cell nuclear transfer</i>)
sg mRNA	subgenomska mRNA
SLPI	sekretorni levkocitni proteinazni inhibitorji
STAT	aktivator signalov transkripcije (angl. <i>signal transducer and activator of transcription</i>)
TCID	infekcijska doza za okužbo celične kulture (angl. <i>tissue culture infective dose</i>)

TCR	T-celični receptor na površini limfocitov T
Th	celice T pomagalk (angl. <i>T-helper cells</i>)
TNF	faktor tumorske nekroze (angl. <i>tumor necrosis factor</i>)
VR-2332	severnoameriški referenčni sev PRRSV-2
WGS	sekvenciranje celotnega genoma (angl. <i>whole genome sequencing</i>)

1 UVOD

Prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom (PRRS) je sorazmerno nova, a zelo pomembna bolezen prašičev z vidika gospodarstva. Bolezen in njen povzročitelj sta bila odkrita šele konec 80. let prejšnjega tisočletja (Reotutar, 1989; Hill, 1990; Wensvoort in sod., 1991), danes pa je bolezen razširjena po vsem svetu, v vseh prašičerejsko pomembnejših državah (Shi in sod., 2010; Xing in sod., 2017; Kedkovid in sod., 2020). Države proste PRRS so trenutno le Finska (Nokireki, 2010), Švica (Corbellini in sod., 2006), Švedska (Carlsson in sod., 2009; Frössling in sod., 2009), Norveška (Grøntvedt in sod., 2016), Avstralija (Brookes in sod., 2015), Nova Zelandija (Beltran-Alcrudo in sod., 2007) in Brazilija (Ristow in sod., 2008). Vse od odkritja se uvršča med najpomembnejše ekonomske bolezni prašičev. Enako velja tudi danes kljub obsežni epidemiji afriške prašičje kuge, ki se trenutno širi po Evropi in delih Azije (Kedkovid in sod., 2020; Rawal in sod., 2020). Po zadnjih dostopnih podatkih znaša izguba zaradi PRRS v Združenih državah Amerike 6,25–12,25 ameriškega dolarja na glavo vzrejenega prašiča, kar znaša 664 milijonov ameriških dolarjev na leto za ZDA, ter 1,5 milijarde evrov na ravni celotne EU (Holtkamp in sod., 2013; De Paz in sod., 2015). Nathues in sod. (2017) poročajo, da znašajo ekonomske izgube v Nemčiji skoraj 450 tisoč evrov za farmo s 1.000 plemenskimi svinjami.

Virus PRRS (PRRSV) spada v rod *Arterivirus* in v družino *Arteriviridae* (Cavanagh, 1997). Virus delimo na dva genotipa, in sicer na genotip 1 (PRRSV-1) in genotip 2 (PRRSV-2). Po najnovejši virusni klasifikaciji gre za dve ločeni vrsti virusa, oba genotipa pa izvirata iz prvotne klasifikacije: genotip 1 je evropski, z referenčnim sevom Lelystad (oznaka referenčnega seva LV-PRRS), genotip 2 pa severnoameriški, z referenčnim sevom VR-2332. Danes sta oba razširjena po vsem svetu (Zimmerman in sod., 2019). PRRSV je obdan z ovojnico, genom pa predstavlja pozitivno orientirana enovijačna RNA (+ssRNA) (Benfield in sod., 1992), dolga približno 15–15,5 kilobaz (kb) (Allende in sod., 1999).

Bolezen se izredno hitro širi, predvsem s premiki živali (Leung, 2011). Najpogostejša načina vnosa PRRSV v rejo so okuženi prašiči brez znamenj bolezni (klicenosci) in okuženo seme plemenskih merjascev (Mortensen in sod., 2002). Do prenosa v več kot 80 % primerov pride v območjih z gosto postavitvijo komercialnih prašičerejskih obratov in zaradi nedoslednega izvajanja ukrepov biovarnosti (Torremorell in sod., 2004). Po navedbah raziskave lokalnega prenosa PRRS v francoski regiji Loire predstavljajo v okoli 45 % primerov prenosa vir nove okužbe prašičerejska gospodarstva, oddaljena manj kot 500 metrov (Le Potier in sod., 1997).

Virus povzroča gospodarsko škodo zaradi večjega deleža poginjenih prašičev, zlasti v vzreji, ter slabše konverzije krme in slabšega prirasta tako v vzreji kot tudi tekom nadaljnjega pitanja. Pri brijih svinjah so ekonomsko najpomembnejše reprodukcijske motnje, zaradi imunosupresivnega delovanja virusa pa v okuženih rejah pogosteje prihaja do izbruhov endemičnih bolezni (Štukelj, 2013; Zimmerman in sod., 2019). Zaradi gospodarske škode bi bilo za dolgoročno finančno vzdržnost prireje prašičev nujno uvesti nekatere ukrepe za omilitev posledic PRRS. Z ustreznimi ukrepi in rednim preverjanjem rezultatov opravljenega

dela lahko bolezen iz reje tudi izkoreninimo (Zimmerman in sod., 2010; Linhares in sod., 2015). Prvi možni ukrep ob ugotovitvi PRRS v reji je kontrola bolezn. Kontrola bolezn. pomeni sobivanje z virusom, saj se z izvajanjem ukrepov zmanjša pogostost pojavljanja akutnih izbruhov. S kontrolo omejimo širjenje bolezn. ter zmanjšamo obolevnost in smrtnost v čredi s preprečevanjem vertikalnega in horizontalnega prenosa virusa ter spodbujanjem razvoja imunosti proti farmskemu sevu virusa. Tedaj se proizvodni rezultati izboljšajo na spremenljivo raven (Dee, 1997; Dee, 1998; Morrison, 2012).

Drugi možni ukrep je eliminacija bolezn. oziroma stanje, ko v čredi ne zaznavamo več ne kliničnih znamenj ne prisotnosti virusa; pri plemenskih svinjah in pujskih pa dokažemo zaščitna protitelesa proti PRRSV (Toma in sod., 1991; Štukelj in Valenčak, 2012; Štukelj, 2013). Status je treba po v določenih časovnih intervalih preverjati z laboratorijskimi preiskavami za dokazovanje virusne RNA in specifičnih protiteles. Holtkamp in sod. (2011) so v svoji raziskavi natančno razdelili status rej v postopku eliminacije in eradikacije. Pojem eliminacija je opredeljen s statusom »pozitivna, stabilna reja v procesu eliminacije«. To pomeni, da pri nobeni kategoriji prašičev ni prisotnih kliničnih znamenj, v roku 90 dni pa moramo štirikrat odvzeti individualne vzorce krvi določenemu deležu prašičev, v katerih ne smemo dokazati prisotne RNA PRRSV, lahko pa dokazujemo specifična protitelesa. Eliminaciji sledi izkoreninjenje, kar pomeni, da pri nobenem prašiču v čredi ne dokažemo niti virusa niti specifičnih protiteles (Meier in sod., 2003; Molina in sod., 2008). Za potrditev statusa se uporabi sentinel prašiče, pri katerih 6 mesecev po uhlevitvi ne smemo dokazati ne RNA PRRSV ne specifičnih protiteles proti PRRSV (SPF Sundhedsstyringen, 2016)

Ukrepi, ki se jih poslužujemo pri zmanjševanju posledic PRRS, so omejeni in vezani na možnost izvajanja biovarnostnih ukrepov. Ključni ukrep pri kontroli bolezn. je nadzor nad populacijo mladic (Dee in sod., 1994). Vnos neimunih mladic v plemensko čredo, okuženo s PRRSV, ima za posledico klinične izbruhe in vertikalno širjenje bolezn. Mladice zato po prihodu na farmo prekužimo, če se le da s homolognim (farmskim) sevom virusa v ločenem prostoru (angl. *gilt development unit*). Ta postopek se imenuje aklimatizacija (Dee, 1997). S tem postopkom želimo mladice okužiti in stimulirati razvoj specifičnih protiteles proti sevu virusa, ki je prisoten na farmi, ter s tem doseči homologno imunsko zaščito. Za prekužitev mladic lahko uporabljamo različne pristope. Osnovni je naravna prekužitev s kontaktom mladic z viremičnimi tekači in njihovimi izločki (Corzo in sod., 2010). Možen pristop je tudi aklimatizacija mladic z aplikacijo kužnega seruma, t. i. serumizacijo za prekuževanje. V tem primeru uporabimo serum, ki smo ga pred tem odvzeli viremičnim prašičem. Iz njega pripravimo inokulum ter ga apliciramo mladim v mišično tkivo. Inokulum za serumizacijo vsebuje PRRSV, dodana pa sta mu antibiotik in antimikotik za preprečevanje razmnoževanja bakterij in gliv (Pugh in sod., 2005; Opriessnig in sod., 2007; Štukelj in Valenčak, 2012; Štukelj in sod., 2015). Aklimatizacijo lahko izvedemo tudi s cepljenjem s komercialnimi cepivi, s katerimi se spodbudi imunski odziv in doseže vsaj heterologna zaščita proti virusu (Martelli in sod., 2007; Kimman in sod., 2012; Linhares in sod., 2012; Zimmerman in sod., 2019).

Z namenom dokazovanja prisotnosti PRRSV ali pri nadzoru ukrepov zoper bolezni uporabljamo laboratorijske metode za ugotavljanje virusa, virusne RNA, virusnih antigenov ali specifičnih protiteles v vzorcih različnih izločkov, telesnih tekočin in tkiv prašičev (OIE, 2018; Zimmerman in sod., 2019). Najpogosteje odvzet vzorec za vse osnovne preiskave je individualni vzorec seruma (OIE, 2018). Jemanje krvi je za prašiča naporno in stresno, za reprezentativen vzorec o stanju bolezni v čredi pa je treba odvzeti veliko število individualnih vzorcev krvi. Zato na veljavi pridobivajo tudi druge vrste vzorcev, odvzetih na bistveno manj invaziven način v skladu z zagotavljanjem čim višjega nivoja dobrobiti za prašiče, ki ponujajo primerljivo zanesljive rezultate. Za laboratorijsko diagnostiko PRRS pri živih prašičih se vedno pogosteje uporabljajo individualni in skupinski vzorci ustne tekočine (angl. *oral fluid*; OF), tkivnih ostankov po kastraciji in kupiranju repkov sesnim pujskom (angl. *processing fluids*), semena in bronhoalveolarnih izpirkov, pri poginjenih, zaklanih in žrtvovanih prašičih pa še mesni sok, pljučni parenhim, bezgavke in vranica (Molina in sod., 2008; OIE, 2018; Woonwong in sod., 2018; Trevisian in sod., 2019, Zimmerman in sod., 2019; Plut in sod., 2020).

1.1 NAMEN DELA, CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen doktorske naloge je s primerjavo vzorcev seruma in OF dokazati, da sta obe vrsti vzorcev enako primerni za dokazovanje tako RNA PRRSV kot tudi uspešne prekužitve mladic z dokazovanjem specifičnih protiteles. Z dobljenimi rezultati bomo skušali dokazati, da je neinvazivno odvzeta OF primerljivo uporaben vzorec za ugotavljanje prisotnosti virusne RNA in specifičnih protiteles v čredi prašičev v primerjavi z individualnimi vzorci seruma. Prav tako želimo dokazati, da lahko s peroralno izpostavitvijo mladic OF, ki vsebuje PRRSV, dosežemo učinkovitejši kontakt prašičev z virusom, kar pomeni hitrejšo okužbo in močnejši, učinkovitejši ter hitrejši imunski odziv, v primerjavi z neizpostavljenimi mladicami, s tem pa vzpostavitev visokega nivoja specifičnih protiteles proti sevu virusa, ki kroži v dani reji. S tem namenom bomo spremljali prisotnost RNA PRRSV in specifičnih protiteles pri mladicah v vzorcih seruma in OF, odvzetih enkrat tedensko, prvič pred izpostavljenostjo PRRSV in nato prvih osem tednov po izpostavitvi PRRSV. Bolj natančno želimo določiti, kdaj po začetku prekuževanja mladic RNA PRRSV v serumu ne moremo več dokazati in kdaj razvijejo visok nivo specifičnih protiteles proti PRRSV, s čimer želimo natančneje opredeliti, kdaj lahko imune mladice prestavimo v plemensko čredo. To namreč pomeni, da so se mladice v času aklimatizacije okužile s PRRSV, bolezen prebolele in ustvarile zaščitna protitelesa, ki njih in njihove potomce ščitijo pred ponovno okužbo s homolognim sevom virusa. Menimo, da lahko z uporabo vrvi, prepojenih z OF, ki vsebujejo virus, postopek prekužitve in aklimatizacije pospešimo v primerjavi s skupino mladic, kjer te metode nismo uporabili. Metodo bomo preizkusili tako v farmskih pogojih kot tudi v epidemiološko nadzorovanih hlevskih pogojih. Zaradi neinvazivnosti metode odvzema OF bo dosežen višji nivo dobrobiti prašičev. Dokazati želimo, da OF ni uporabna le kot vzorec za izvedbo laboratorijskih diagnostičnih preiskav, temveč bi jo lahko s pridom uporabljali tudi v postopku aklimatizacije mladic oziroma kot sredstvo za kontrolirano imunizacijo živali proti PRRSV.

Hipoteze:

1. Skupinski vzorec ustne tekočine mladic iz enega boksa je primerljiv z individualnimi vzorci seruma istih mladic za laboratorijski dokaz RNA PRRSV in specifičnih protiteles proti PRRSV.
2. Po kontroliranem umetnem prekuževanju prašičev s PRRSV lahko RNA PRRSV in specifična protitelesa v ustni tekočini prašičev zaznamo in dokažemo približno v enakem časovnem intervalu kot v njihovem serumu.
3. Virološko in imunološko naivne mladice se z žvečenjem bombažnih vrvi, prepojenih z ustno tekočino PRRSV viremičnih prašičev, hitreje kontrolirano umetno okužijo s PRRSV, pri čemer je njihov sistemski imunski odziv močnejši in učinkovitejši, kar vodi v hitrejšo serokonverzijo kot tudi v razvoj dolgotrajnega imunskega spomina.
4. Aklimatizacijo mladic na bolezen, ki so bile izpostavljene vrvem, prepojenih z ustno tekočino PRRSV viremičnih živali, dosežemo prej kot s prekužitvijo po naravni poti.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 ETIOLOGIJA PRRS

2.1.1 Zgodovina PRRS

Prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom je bil prvič ugotovljen leta 1987 v ZDA, novembra 1990 pa še v nemškem mestu Münster, kjer se je zgodil prvi obširnejši izbruh. Povezave med tema dvema izbruhoma boleznimi v Severni Ameriki in Evropi tedaj niso dokazali, prav tako ne povzročitelja boleznimi (Keffaber, 1989; Hill, 1990; Wensvoort in sod., 1991). Izbruhi boleznimi so se nato širili po Evropi: na Nizozemsko (Wensvoort in sod., 1991; Terpstra in sod., 1992), nadalje pa na Norveško, v Belgijo (Varewyck, 1991), Veliko Britanijo (Paton in sod., 1991), Francijo (Baron in sod., 1992), Španijo (Plana Duran in sod., 1992), na Dansko (Mortensen in Madsen, 1992), Poljsko (Wensvoort in sod., 1993) in Češko (Valicek in sod., 1997). Do dokaza povzročitelja so raziskovalci zanj uporabili različna poimenovanja, kot so skrivnostna bolezen prašičev (angl. *mystery swine disease*), bolezen 89 (Keffaber, 1989), prašičja kuga 89 (Keffaber, 1989), prašičji neplodnostni in respiratorni sindrom (angl. *swine infertility and respiratory syndrome*; SIRS), sindrom epidemičnih abortusov in respiratornih motenj prašičev (angl. *porcine epidemic abortion respiratory syndrome*; PEARS) in bolezen modrih uhljev (angl. *blue ear disease*). Prvič so virus izolirali leta 1991 v nizozemskem mestu Lelystad in povzročitelja poimenovali po njem (Lelystad virus; LV) (Wensvoort in sod., 1991) ter izpolnili tudi vse Kochove postulate (Terpstra in sod., 1991). Leta 1992 so na Prvem simpoziju o PRRS (St. Paul, Minnesota, ZDA) bolezen uradno poimenovali »prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom« (Albina in sod., 1992; Meredith, 1993). Kmalu zatem so virus uspešno izolirali tudi v Severni Ameriki (Wensvoort in sod., 1992). Naknadne retrogradne raziskave so pokazale prisotnost specifičnih protiteles pri živalih v Severni Ameriki že leta 1986 (Owen in sod., 1992; Yoon in sod., 1992), zatem pa so retrogradne serološke raziskave pokazale, da je bil virus v Kanadi prisoten že leta 1979 (Carman in sod., 1995), v Aziji 1985 (Shin in sod., 1993) in v Evropi leta 1987 (Ohlinger in sod., 2000).

2.1.2 Taksonomija

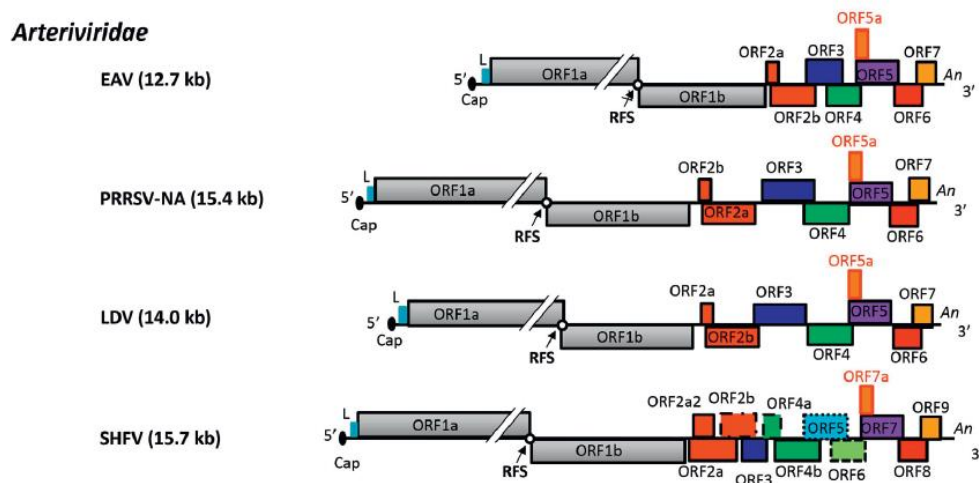
PRRSV uvrščamo v red *Nidovirales*, v družino *Arteriviridae* in v rod *Arterivirus*; ime družine je določeno na podlagi virusa konjskega arteritisa (angl. *equine arteritis virus*; EAV), prvega odkritega virusa v tej družini (MacLachlan in Dubovi, 2017). Med *Arteriviridae* poleg obeh tipov PRRSV spada še 15 virusov, ki jih najdemo pri konjih, primatih in glodavcih (Zimmerman in sod., 2019). Po najnovejših določilih Mednarodnega odbora za taksonomijo virusov (ICTV, angl. *International Committee for the Taxonomy of Viruses*) iz leta 2019 PRRSV-1 in PRRSV-2 uvrščamo v rod *Betaarterivirus* (ICTV, 2019).

2.1.3 Morfologija

Virus PRRS je sferične oblike, s premerom 45–60 nm in je obdan z lipidno ovojnico. Na zunanji strani so na pogled gladke lipidne ovojnice neizrazite, majhne glikoproteinske strukture špičaste oblike. Proteinska jedrna ovojnica (nukleokapsida) družine *Arterivirus* je izometrična, premera 25–35 nm (Lunney in sod., 2016; MacLachlan in Dubovi, 2017).

2.1.4 Virusni genom in strukturni ter nestrukturni proteini

Genom PRRSV predstavlja 15–15,5 kb dolga +ssRNA (Allende in sod., 1999). Na molekuli RNA se nahaja 11 odprtih bralnih okvirjev (angl. *open reading frame*; ORF) za sintezo vsaj 16 nestrukturnih in 8 strukturnih proteinov (Slika 1) (King in sod. 2012). Podenoti ORF 1a in ORF 1b zavzemata 75 % celotnega genoma PRRSV in kodirata 12 glavnih nestrukturnih proteinov (nsp 1–12) (Meulenbergh in sod., 1993). ORF 2–5 kodirajo manjše in večje membranske glikozilirane proteine (GP 2–5) (Snijder in Meulenbergh, 1998). ORF 6 kodira membranski neglikozilirani protein M (pM), ORF 7 pa nukleokapsidni protein N (Mardassi in sod., 1996).



Slika 1: Primerjava genomov najpomembnejših virusov družine Arteriviridae in prikaz regij ORF (prirejeno po King in sod., 2012).

Figure 1: Comparison of genomes of the most important members of *Arteriviridae* family and showcase of ORF (adapted from King et al., 2012).

GP 2 je ključen za kužnost virusa PRRS in slačenje virusne ovojnice (Lunney in sod., 2016). GP 2 skupaj z GP 3–4 tvori multimerni kompleks, ki je ključen za vezavo na receptorje CD163 na celični membrani makrofagov, ki le-tega posedujejo (CD; angl. *cluster of differentiation*, t. i. razlikovanje po skupinah glede na prisotnost membranskih receptorjev) (Xing in sod., 2017). GP3 je najbolj variabilen spremenljiv strukturni protein. Glikozilacija 42., 50. in 131. aminokislina (ak) je nujna za patogenost PRRSV-2 (Oleksiewicz in sod., 2001). Ta glikoprotein je močno imunogen in sproži tvorbo nevtralizacijskih protiteles (Lunney in sod., 2016; Xing in sod., 2017). Glavna posebnost GP 4 je v tem, da se povezuje z

GP 3. Konec 5' ORF 4 in konec 3' ORF 3 se namreč prekrivata. Zato vsaka morebitna delecija na tem mestu vpliva na spremembo izražanja obeh proteinov (Das in sod., 2010). Protein M je najbolj ohranjen strukturni protein in je skoraj identičen pri PRRSV-1 in PRRSV-2 (Kapur in sod., 1996).

2.1.5 Raznolikost genoma

PRRSV-1 in PRRSV-2 naj bi se razvijala popolnoma ločeno, vsak na svojem geografskem območju (Nelsen in sod., 1999). Večina podrobnih raziskav je bilo opravljenih na regiji ORF 5. V regiji ORF 5 je lahko med podtipi PRRSV-1 tudi do 30 % razlik v nukleotidnem (nt) zaporedju (Allende in sod., 1999), medtem ko znaša variabilnost znotraj podtipov PRRSV-2 do 22 % (Han in sod., 2006). Genoma PRRSV-1 in -2 sta med seboj od 55 do 70 % identična (Nelsen in sod., 1999). Na ORF 5 je opazna največja genetska raznolikost med sevi istega genotipa (Lee in sod., 2010). Je najpomembnejša tarča za genetsko analizo v smislu raznolikosti, evolucije in epidemiologije PRRSV (Zhou in sod., 2009) in je zaradi velike variabilnosti najbolj raziskana regija, čeprav predstavlja le približno 4 % celotnega genoma PRRSV (Shi in sod., 2010). Z novejšo metodo sekvenciranja celotnega genoma (angl.: *whole genome sequencing*; WGS) je možna natančnejša klasifikacija različnih virusnih sevov kot na podlagi sekvenciranja posameznih kodirajočih regij. Lalonde in sod. (2020) so na podlagi filogenetskih analiz celotnih nt zaporedij 88 različnih genomov virusa ugotovili, da se 6 zaporedij od teh klasificira drugače, ko analiziramo celotna nt zaporedja, kot če analiziramo zgolj regijo ORF 5.

Znotraj PRRSV-1 (referenčni tip je LV) so trenutno poznani štirje podtipi virusa (Stadejek in sod., 2006). Genetska variabilnost podtipov znotraj PRRSV-1 se v Evropi nekoliko razlikuje glede na geografsko lego. V Zahodni in Srednji Evropi je ta manjša kot v Vzhodni Evropi (Stadejek in sod., 2013); v prvem območju najdemo večinoma virusni podtip 1 (Trus in sod., 2016), medtem ko podtipe 2, 3, in 4 imenujemo tudi »vzhodnoevropski podtipi« (Karniyuchuk in sod., 2010; Stadejek in sod., 2013; Trus in sod., 2014). Prav tako se glede na geografsko lego podtipi razlikujejo glede patogenosti. Za bolj patogene so od leta 2006 veljali vzhodnoevropski podtipi PRRSV-1, ki so bili večinoma povezani z visoko patogenim podtipom 3 oziroma beloruskim sevom Lena. Prav tako je visoko patogen podtip 2 oziroma sev Bor (Karniyuchuk in sod., 2010). Od leta 2015 se pojavljajo visoko patogeni PRRSV-1 tudi znotraj podtipa 1: belgijski sev 13V091 (Frydas in sod., 2015), avstrijski sev AUT15-33 (Sinn in sod., 2016) ter italijanski sev PR40 (Canelli in sod., 2017). Po raznolikosti genoma se omenjeni sevi približno 10 % razlikujejo od referenčnega seva LV in seva Lena. Sprva je veljalo, da je genetska variabilnost pri PRRSV-2 (referenčni tip VR-2332) večja, a so kasnejše raziskave pokazale nasprotno (Prieto in sod., 2009; Stadejek in sod., 2006). Genetska raznolikost znotraj obeh tipov je tako velika, da znotraj vsakega govorimo o kvazivrstah (angl. *quasispecies*) (Lauring in sod., 2010). Podrobnejša sistematična analiza insercijskih in delecijskih polimorfizmov nsp2 pri PRRSV-2 je v štiriletnem obdobju pokazala 25 značilnih vzorcev mutacij, na podlagi katerih bi lahko temeljila nadaljnja klasifikacija virusnih podtipov (Yu in sod., 2020). V raziskavi Chen in sod. (2019) so primerjali dva seva PRRSV-2, XJ17-5

in JSTZ1712-12. Genoma obeh sta 99,45 % identična, pri čemer je prvi visoko virulenten in povzročča pogin 60 % pujskov, drugi pa je avirulenten; razlika v virulenci je posledica razlike v 34 ak na nsp 2.

Danes sta PRRSV-1 in PRRSV-2 razširjena po celem svetu, čeprav se bolj pogosto pojavljata na svojih izvornih geografskih področjih (Shi in sod., 2010). PRRSV-2 se je v Evropo razširil z uporabo živih oslabljenih cepiv (angl. *modified live vaccine*; MLV) in ponovno pridobitvijo virulence oslabljenega virusa v cepivu (Bøtner in sod., 1997). V Sloveniji je edino večjo raziskavo o prisotnosti različnih genetskih različic izvedel Toplak s sodelavci (2012a). V 30 rejah je bilo dokazanih 6 genetsko različnih sevov PRRSV, ki so kazali od 89,1 do 95,1-odstotno identičnost z referenčnim sevom LV in od 62,4 do 65,1-odstotno identičnost z referenčnim sevom VR-2332. Vsi izolati v omenjeni raziskavi so spadali med PRRSV-1. Prisotnost PRRSV-2 smo v Sloveniji prvič dokazali leta 2012, in sicer v 4 vzorcih od 218 odvzetih vzorcev (1,8 %) (Toplak in sod., 2012b), v okviru spremljanja na podlagi dokumenta Odredba o izvajanju sistematičnega spremljanja stanja boleznin in cepljenj živali v letu 2011 (Odredba o izvajanju sistematičnega spremljanja stanja boleznin in cepljenj živali v letu 2012, 2011). Od tedaj je stanje glede prisotnosti PRRSV v Sloveniji neznan.

2.2 EPIDEMIOLOGIJA

Za PRRS so dovzetni domači in divji prašiči vseh kategorij oziroma starosti. Dovzetni so tudi južnoameriški ovratničarski pekarji, ki spadajo v družino *Tayasuidae*; to so svinje novega sveta (lat. *Pecari tajacu*) (Molina-Barrios in sod., 2018). Prevalenca PRRS v populaciji divjih prašičev je malo raziskana. V Sloveniji so Štukelj in sod. (2014) preiskali 182 vzorcev seruma na prisotnost specifičnih protiteles proti PRRSV, v katerih specifičnih protiteles niso dokazali. Litvanska 5-letna raziskava seroprevalence je pokazala prisotnost specifičnih protiteles proti PRRSV pri 5,38 % divjih prašičev vseh starostnih skupin (Stankevicius in sod., 2014), severnoameriška pa pri 1,2 % (Pedersen in sod., 2018). Obe raziskavi zaključujeta, da je prevalenca PRRS v populaciji divjih prašičev nizka in je neznatnega pomena za prenos na domače prašiče. S Hrvaške so v letih 2005/2006 poročali o 9,3-odstotni prevalenci specifičnih protiteles pri divjih prašičih, medtem ko v letih 2009/2010 niso odkrili pozitivnega primera v populaciji divjih prašičev (Roic in sod., 2012). Patogenost za druge vrste divjih prašičev znotraj naddružine *Suoidae* ni potrjena (Zimmerman in sod., 2019). Zimmerman je s sodelavci leta 1997 poročal o možnosti okužbe divjih rac vrste *Anas platyrhynchos*, pri pegatkah in pri kokoši pasme *Cornish cross* (Zimmerman in sod., 1997), a poznejše raziskave tega niso uspele potrditi (Trincado in sod., 2004a). Za PRRS niso dovzetni psi, mačke, budre, vrabci, škorci, miši, podgane, oposumi, rakuni in ameriški dihurji (Hooper in sod., 1994; Wills in sod., 2000b; Rosenfeld in sod., 2009). Virus se v njih ne razmnožuje in ne zadržuje v organizmu, zato niso rezervoar za prenos PRRSV na prašiče. Prav tako za okužbo s PRRSV ni dovzeten človek (Zimmerman in sod., 2019). Z vidika epidemiologije se PRRSV-1 in -2 ne razlikujeta. Pri prenosu virusa in njegovi sposobnosti za okužbo veliko vlogo igra intrinzična genetska variabilnost. Ta povzročča zelo hitre mutacije in nastanek visoko patogenih sevov, ki povzročajo hude akutne izbruhe z veliko smrtnostjo pri vseh kategorijah prašičev (Goldberg

in sod., 2003; Murtaugh in sod., 2010). Visoko patogeni sevi se lahko pojavljajo pri obeh genotipih in tudi pri različnih podtipih (Lunney in sod., 2010; Murtaugh in sod., 2010; Martelli, 2017). Velika nagnjenost virusne RNA k mutacijam povečuje verjetnost, da se bodo na farmi istočasno pojavili različni virusni sevi (Dee in sod., 2001; Yoon in sod., 2001; Martelli in sod., 2003).

2.2.1 Preživetje virusa izven gostitelja

Virus ohranja kužnost pri pH 5,5–6,5, pri nižjem ali višjem pH pa jo izgubi v roku nekaj ur, hitrost izgube sposobnosti za okužbo pa je v neposredni povezavi tudi s temperaturo. Na primer, najdaljši čas ohranjanja sposobnosti okužbe celičnih kultur pri temperaturah 4 °C in 37 °C je določen za pH 6,25 pri 50 urah pri temperaturi 4 °C in za pH 6,0 pri 6,5 urah za temperaturo 37 °C (Bloemraad in sod., 1994). Zamrznjen pri temperaturah –70 °C in –20 °C je obstojen vsaj 4 mesece (Benfield in sod., 1992; Zimmerman in sod., 2019). Iz seruma, zamrznjenega na –20 °C, v katerem je bil prisoten PRRSV, so okužbe sposoben virus izolirali 72 ur po odvzemu (Van Alstine in sod., 1993). Pri temperaturi 25–27 °C virusa, sposobnega okužbe na suhih materialih, kot so plastika, nerjaveče jeklo, guma, lucerna, leseni opilki, slama, koroza in tkanina, ne najdemo po 24 urah (Pirtle in Beran, 1996).

2.2.2 Načini prenosa virusa in kužne doze

Prašiči se lahko s PRRSV okužijo intranazalno, oralno, intramuskularno, intrauterino in vaginalno. Verjetnost za okužbo po različnih poteh se razlikuje glede na količino vnesenega virusa. Virus se prenaša z okuženimi prašiči in njihovimi izločki ter z okuženim semenom (Herman in sod., 2004; Rossow in sod., 1994; Wills in sod., 1997a). Prenasa se lahko tudi s kontaminiranimi veterinarskimi pripomočki (Otake in sod., 2002c), hlevsko opremo ter s prevoznimi sredstvi (Dee in sod., 2002; Dee in sod. 2004a). Nadalje se PRRSV prenaša z organskim materialom s PRRSV okuženih prašičev, kot sta gnoj in gnojevka (Otake in sod., 2002b), preko osebja, predvsem s kontaminirano obleko in obutvijo (Pitkin in sod., 2009), s krmo in vodo (Zimmerman in sod., 2019), pa tudi z vektorji, kot so komarji (Otake in sod., 2002d) in muhe (Otake in sod., 2003; Dee in sod., 2004b), ter z aerosolom (Dee in sod., 2005; Tang Julian, 2009). PRRSV se lahko prenaša tudi vertikalno s plemenske svinje na potomce (Zimmerman in sod., 2019).

Neposredno se PRRSV prenaša s tesnim kontaktom med zdravimi in okuženimi živimi prašiči ter njihovimi izločki. Na hitrost takega načina prenosa močno vpliva gostota naselitve prašičev na posamezni farmi in socialni stiki med vrstniki. Glede na lastnosti virusa, ki vplivajo na njegovo preživetje v gostitelju ali izven njega, je za prenos PRRSV pomemben tudi način reje. Z uporabo sistema »naenkrat noter, naenkrat ven« (angl. *all-in/all-out*; AIAO) in razkuževanjem prostorov pred naselitvijo novih prašičev zmanjšamo virusno breme v reji (McCaw, 2000). Okuženi prašiči izločajo virus z izločki, kot so respiratorni produkti, OF, seme, mleko, kolostrum, urin in blato (Fenner in sod., 2017). S svinje na plodove se lahko virus prenese v kateremkoli obdobju brejosti ali neposredno ob prasiatvi, lahko pa tudi po prasiatvi od matere ali mačehe, z mlekom ali drugimi izločki (Fenner in sod., 2017;

Zimmerman in sod., 2019). Raziskava, ki so jo opravili Bierk in sod. (2001), je pokazala, da so bile načrtno okužene nebreje svinje kljub prenehanju viremije vse do 86 dni po okužbi (angl. *days post infection*; DPI) sposobne okužbe naivnih prašičev preko neposrednega kontakta z živalmi ali njihovimi izločki. Virus se v organizmu prašiča zadržuje zelo dolgo in tak prašič predstavlja tveganje za prenos okužbe; virus lahko v tonzilah in limfatičnih organih dokažemo od 100 do 165 DPI (Allende in sod., 2000; Horter in sod., 2002; Fangman in sod., 2007). Le Potier in sod. (1997) poročajo, da so v obsežni raziskavi ugotavljanja pogostosti posameznega načina prenosa PRRSV v Franciji ugotovili, da je neposreden prenos PRRSV z okuženih prašičev na neokužene razlog za prenos virusa v 56 % vseh preiskanih primerov med okuženimi in neokuženimi rejami prašičev.

Leta 2005 so Hermann in sod. eksperimentalno določili ID₅₀ (angl. *infectious dose*; količina patogena, potrebna za okužbo v polovici preučevanih primerov) za PRRSV referenčni tip VR-2332. Potrebna ID₅₀ za intranazalno okužbo je bila 10^{4.0-5.5} TCID₅₀ (angl. *tissue culture infective dose*; TCID₅₀), medtem ko je parenteralna 10^{2.2} TCID₅₀ pri kontrolni skupini zadostovala za okužbo vseh živali v njej. Frydas in sod. (2015) so primerjali ID₅₀ pri eksperimentalni okužbi 12 tednov starih pitancev s tremi izolati PRRSV-1, ki spadajo v podtip 1; visoko patogena izolata 13V091 in 13V117, izolirana leta 2013, so primerjali z nizko patogenim izolatom 07V063. Za intranazalno okužbo je zadostovala 10⁵ TCID₅₀. Visoko patogena izolata so lahko Frydas in sod. (2015) po eksperimentalni okužbi izolirali hitreje kot nizko patogeni izolat, in sicer 3–5 DPI v primerjavi s 7 DPI. Koncentracija virusa iz brisov žrela je bila pri vseh izolatih od 2- do 3-krat večja na področju žrela v primerjavi z brisom nosnega pretina. ID₅₀ za okužbo pri osemenjevanju znaša 10^{4.5} TCID₅₀, kot navajajo Benfield in sod. (2000). Parenteralna pot je najučinkovitejša za prenos PRRSV. Yoon in sod. (1999) na podlagi eksperimentalne okužbe navajajo, da za intramuskularni prenos in uspešno okužbo zadostuje aplikacija 20 FFU (angl. *fluorescent foci unit*), oziroma 20 makrofagov, okuženih z enim virionom PRRSV. Intranazalna okužba je v isti raziskavi uspela z 200 FFU. V krvi prašičev je največje količina virusa 4 DPI in znaša 10^{4.0-6.0} TCID₅₀ (Hermann in sod., 2005). V nosno-ustnih sekretih okuženih prašičev znaša količina virionov do 10^{4.3} TCID₅₀ (Hermann in sod., 2005). S semenom merjasca se izloča do 10^{6.0} TCID₅₀ (Benfield in sod., 2000). Magar in Larochelle (2004) opisujeta, da za peroralno okužbo TCID₅₀ v eksperimentalnih pogojih zadostuje 10^{5.3} virionov, sposobnih za okužbo. Sama OF, kot kužni medij, pa lahko za uspešno okužbo vsebuje tudi manj okužbe sposobnih virionov, saj je pogosto udeležena pri parenteralnem načinu prenosa PRRSV, kot je prenos preko ugriznih ran, prask in lizanja ran med vrstniki (Hermann in sod., 2005).

Tako rezultati opazovanj v rejah (Robertson, 1992) kot rezultati poskusov (Yaeger in sod., 1993) so potrdili, da je zelo pomemben način prenosa PRRSV prenašanje preko okuženega semena merjascev, predvsem zaradi pogostega osemenjevanja v sodobni prašičereji (Desrosiers, 2011), pa tudi ker se z osemenjevanjem virus veliko lažje prenese med rejami na zelo velike razdalje (Nathues in sod., 2014; Nathues in sod., 2016). Čas izločanja virusa s semenom po okužbi se lahko med merjasci precej razlikuje. Virus sposoben za okužbo so

dokazali 43 DPI (Swenson in sod., 1994), RNA PRRSV pa še 92 DPI (Christopher-Hennings in sod., 1995).

PRRSV se lahko prenaša tudi posredno brez tesnega kontakta med okuženimi prašiči, bodisi klinično bolnimi bodisi klinično zdravimi (klicenosci), in neokuženimi prašiči. Virus mehansko prenašajo ljudje, ki imajo dostop do prašičev, in sicer na koži, na obleki in na obutvi ter s pripomočki, ki jih uporabljajo v hlevu. Otake in sod. (2002b) so preverjali količino in sposobnost virusa za okužbo z brisi kože dlani zaposlenih, obleke in obutve. Virus sposoben okužbe je bilo iz brisov mogoče izolirati še 30 in 60 minut po rokovanju z živaljo (10^5 TCID₅₀). Virus se prenaša tudi preko površine orodja, s krmo in z vodo. Dee in sod. (2005) so eksperimentalno potrdili in glede na preizkus različnih koncentracij virusa tudi ovrednotili uspešnost prenosa PRRSV s transportnimi vozili. Horizontalni prenos v reji, poleg neposrednega stika med prašiči, ponavadi poteka z vdihavanjem kužnega aerosola ali zaužitjem kontaminirane krme. Le Potier in sod. (1997) navajajo, da kontaminacija s kužnim fecesom v 21 % predstavlja način prenosa PRRSV na večje razdalje, seme pa v 20 %, medtem ko v 3 % primerov načina prenosa niso uspeli dokazati. Do podobnih rezultatov so prišli Mortensen in sod. (2002), pri čemer so večjo vlogo pri prenosu na kratke razdalje, do 300 metrov, pripisali aerogenemu prenosu. Obe raziskavi sta bili opravljene s pomočjo epidemiološkega poizvedovanja in serološkega testiranja na farmah, ki bi lahko bile okužene zaradi izmenjave živih prašičev ali s prašičjimi izločki kontaminiranega materiala med okuženimi in neokuženimi rejami.

2.3 PATOGENEZA

Patogeneza PRRSV-1 in -2 je v odnosu virusa do gostitelja, oziroma dovzetnih celic, enaka. Za okužbo s PRRSV so dovzetne celice monocitno-makrofagne linije, edini nujno potrebni element na površini dovzetne celice za pritrjevanje in vstop virusa je receptor CD163 na makrofagih (Dokland, 2010; Welch in Calvert, 2010; Tian in sod., 2012; Prather in sod., 2013). Izražanje receptorja na površini makrofagov pospešuje interlevkin (IL)-6. Preko vezave na receptor CD163 makrofagi odstranjujejo kompleks hemoglobin-haptoglobin (Møller in sod., 2002). Pionirja tehnologije pridobivanja monoklonskih protiteles na tumorsko spremenjenih celičnih linijah sta Köhler in Milstein (1975). Omenjena tehnologija je omogočila razlikovanje levkocitov na podlagi CD površinskih receptorjev s specifičnimi monoklonskimi protitelesi (Clark in sod. 2016).

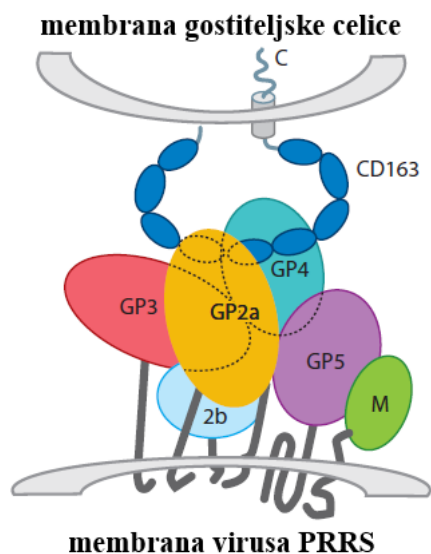
2.3.1 Okužba gostiteljskih celic

Primarne tarčne celice za PRRSV so alveolarni makrofagi (Duan in sod., 1997) in krvni makrofagi (Thanawongnuwech in sod., 2000), pa tudi drugi tkivni makrofagi, ki se nahajajo v srcu, vranici, v Peyerjevih ploščah, v jetrnih sinusoidah, ledvični sredici in nadobistnici (Halbur in sod., 1995a; Halbur in sod., 1996; Duan in sod., 1997; Beyer in sod., 2000). Poleg makrofagov so z *in-situ* hibridizacijo in imunohistokemično dokazali RNA PRRSV in protein N še v zarodnih celicah testisov, endoteliju srca, interdigitalnih celicah v priželjcu in v dendritičnih celicah v vranici in priželjcu (Halbur in sod., 1996; Sur in sod., 1997). Virus

najdemo pri naravno obolelih prašičih tudi v epitelijskih celicah bronhiol (Pol in sod., 1991), epitelioidnih celicah alveolarnih vodov (Magar in sod., 1993) in v pneumocitih (Pol in sod., 1991; Cheon in sod., 1997).

Poleg prisotnosti receptorja CD163 na površini celične membrane na uspešnost vstopa PRRSV v celico vpliva celični površinski sialoadhezin (CD169) (Van Breedam in sod., 2010b; Prather in sod., 2013); njegova prisotnost, izključno v kombinaciji s CD163, po raziskavah *in vitro* pospešuje vstop virusa v celico od 10- do 100-krat (Van Gorp in sod., 2008). Poleg tega so kot možne površinske receptorske molekule za vstop PRRSV v celico omenjene še heparan sulfat, vimentin, CD151, intracelični adhezijski molekulski 3-povezujoči ne-integrin, opredeljen s CD209 (Zhang in Yoo, 2015). Wang in sod. (2019) ter Chen in sod. (2019) so dokazali, da so prašiči, ki so jim z metodama CRISPR/Cas9 uravnavaano homologno rekombinacijo in prenosom jedra somatskih celic (angl. *somatic cell nuclear transfer*; SCNT) odstranili ekson, ki kodira receptor CD163, odporni proti hudi klinični obliki bolezni, ki jo povzroča visoko patogeni sev PRRSV-2.

Na površini virusne ovojnice sta za povezavo s CD163 in vstop v celico odgovorna manjša strukturna glikoproteina, GP2a (249–256 ak) in GP4 (178–183 ak), ki sta med seboj z GP3 povezana v multimerni kompleks GP2a-3-4 (Slika 2) (Das in sod., 2010).



Slika 2: Vezava PRRSV, preko GP2a-3-4, na CD163 receptor gostiteljske celice (povzeto po Lunney in sod., 2016).

Figure 2: Attachment of PRRSV envelope GP2a-3-4 complex to CD163 receptor of the host cell (adapted from Lunney et al., 2016).

Sialoadhezin CD169 omogoča vstop virusa v gostiteljsko celico preko povezave z virusnim GP5/M heterodimerom (Van Breedam in sod., 2010b). Virus v dovzetne celice vstopi z

endocitozo, uravnavano s klatrinom (Nauwynck in sod., 1999), ki je značilna za večino virusov.

2.3.2 Replikacija virusa in mehanizem celičnih poškodb

Po vstopu virusa v gostiteljsko celico je virus obdan z endosomom celične membrane gostiteljske celice. Po vezavi karboksilne skupine molekul na endosom se ta razpre in poveže z lipidno ovojnico virusa, RNA PRRSV pa se sprostí v citoplazmo (Nauwynck in sod., 1999), kjer se prične replikacija. Regiji ORF 1a in ORF 1b, ki zavzemata ~75 % genoma PRRSV, kodirata nestrukturane proteine, ključne za virusno replikacijo. Najpomembnejša je RNA polimeraza (Allende in sod., 1999). Za +ssRNA viruse v redu *Nidovirales* je značilna replikacija in translacija celotne molekule RNA (RNA1) in sinteze več krajših subgenomskih mRNA (sg mRNA). Oba procesa uravnava replikacijsko-transkripcijski kompleks (angl. *replication/transcription complex*, RTC), ki ga uravnava nsp virusa in tudi faktorji gostiteljske celice (Gorbalenya in sod., 2006). Pri izgradnji strukturnih proteinov sodeluje endoplazmatski retikulum gostiteljske celice, del proteina N pa se translocira v jedro in jedrce okužene celice (Rowland in sod., 2003; Yoo in sod., 2003). Translokacija proteina N v jedro okužene celice poteka preko interakcije dela virusnih proteinov N, B23 in nukleolina, z jedrno membrano, pri čemer omenjena proteina omogočita transport celotnega proteina N skozi pore jedra (Srivastava in Pollard, 1999). Ta lastnost je značilna tudi za sorodne EAV (Tijms in sod., 2002) in koronavirus iz skupin I, II in III (Chen in sod., 2002).

PRRSV povzroča celično smrt zaradi nekroze ali apoptoze *in vitro* ter *in vivo* zaradi morfoloških sprememb, fragmentacije DNA in aktivacije signalnih poti vezanih na aktivacijo kaspaze ali mitohondrijske aktivacijske poti (Choi in Chae, 2002; Kim in sod., 2002; Labarque in sod., 2003; Miller in Fox, 2004). Virus lahko apoptozo tudi zavira; v začetku okužbe apoptozo zavira, na koncu pa pospešuje (Costers in sod., 2008). Apoptoza je vidna tako na okuženih celicah kot tudi na celicah v bližini okuženih, kjer kot glavni sprožilni dejavnik deluje GP5 (Choi in Chae, 2002; Kim in sod., 2002; Gagnon in sod., 2003; Miller in Fox, 2004). Apoptoza bližnjih celic v pljučih najpogosteje prizadene okolne makrofage, v manjši meri limfocite in pneumocite; v priželjcu in bezgavkah pa so pogosteje prizadeti okolni limfociti kot makrofagi (Labarque in sod., 2003; Wang in sod., 2014). Delež celic v neposredni okolici, ki jih prizadene apoptoza, je pri visoko patogenih sevih PRRSV-2 za od 5 do 40 % večji kot pri nizko patogenih sevih PRRSV-2 (He in sod., 2012; Li in sod., 2014b). V primerjavi makrofagov, okuženih ali s PRRSV ali s PCV-2 (prašičji cirkovirus tipa 2), je bil delež apoptoze pri prvih od 22- do 34-odstoten, pri drugih pa 3-odstoten (Chang in sod., 2005).

2.3.3 Patogeneza v akutni fazi PRRS

V akutni fazi PRRS je z vidika patogeneze značilno, da okužba predominantno poteka v pljučih in zgornjih dihalih, natančneje v makrofagih in dendritičnih celicah. Nato se v 6 do 12 urah, lahko pa tudi do 48 ur po okužbi, pojavi viremija in virus se s krvjo in z okuženimi makrofagi razširi po celotnem organizmu. Akutna faza lahko traja različno dolgo; zaključí se,

ko se virus odstrani iz krvi in pljuč (Lunney in sod., 2016; Zimmerman in sod., 2019). Pri venerealnem prenosu PRRSV vstopi do ciljnih celic in v krvni obtok neposredno preko endometrija (Swenson in sod., 1994b; Yaeger in sod., 1993). Največjo količino virusa lahko v serumu in pljučih najdemo povprečno od 4 do 14 DPI (Zimmerman in sod., 2019). Tedaj znaša količina 10^{2-5} TCID₅₀, pri visoko patogenih sevih (angl. *highly pathogenic PRRS*; HP-PRRSV) pa do 10^8 TCID₅₀ (Guo in sod., 2013; Hu in sod., 2013). Razlika v količini virusa je posledica celičnega tropizma oziroma dejstva, da imajo visoko patogeni sevi sposobnost replikacije v večjem naboru gostiteljevih makrofagov. Nizko patogeni sev PRRSV-1 se razmnožuje le v makrofagih s prisotnima obema površinskima receptorjema CD163 in CD169, medtem ko se visoko patogeni PRRSV-2 razmnožuje tudi v makrofagih, na katerih je CD163 prisoten, CD169 pa ne (Frydas in sod., 2015; Frydas in Nauwynck, 2016). Nekateri visoko patogeni sevi kažejo atipično povečan tropizem do makrofagov v možganih, zato lahko povzročajo patološke spremembe tudi v možganskem tkivu (Lunney in sod., 2016; Brockmeier in sod., 2017).

Količina virusa začne po doseženi največji koncentraciji v serumu navadno naglo upadati, viremije ne zaznamo več od 21 do 28 DPI z možnostjo odstopanj glede na kategorijo prašiča (Zimmermana in sod., 2019). Pri tekačih traja viremija povprečno od 21 do 28 DPI, pri plemenskih prašičih od 4 do 21 DPI (Christopher-Hennings in sod., 2001; Kittawornrat in sod., 2010), pri sesnih pujskih pa se viremija podaljša tudi do 42 DPI (Christopher-Hennings in sod., 2001). Pri poskusni okužbi mladic med aklimatizacijo je RNA PRRSV v serumu vztrajala do 30 DPI (Batista in sod., 2004). Hitrost izločanja je odvisna od starosti prašiča, mlajši kot so prašiči, večja je količina RNA PRRSV v serumu in viremija traja dlje časa v primerjavi s starejšimi vrstniki (Cho in sod., 2006; Klinge in sod., 2009). Na trajanje viremije vplivajo tudi genotipske lastnosti prašičev. Viremija je lahko enofazna, dvofazna (intermitentna) ali persistentna – vztraja še po 42 DPI (Islam in sod., 2013) oziroma 58 DPI (Reiner in sod., 2010).

Zaradi poškodb alveolarnih makrofagov se zadebelijo alveolarni pretini, v katere se infiltrirajo še limfociti in plazmatke. Posledica zadebelitve je otežena izmenjava plinov v pljučih. Zaradi motene oskrbe so pnevmociti tipa II nad njimi hiperplastični, kasneje propadejo, kar dodatno prizadene oskrbo krvi s kisikom. V alveolah najdemo nekrotične makrofage, celični debris in serozno tekočino. Limfociti in plazmatke okoli alveol in spodaj ležečih žil oblikujejo tako imenovane perivaskularne infiltrate (angl. *cuff; obroč*). Motena oskrba celic s kisikom in energijo vodi do propadanja in iztekanja celične tekočine, kar ima za posledico edeme intersticijskega tkiva okoli alveol pljuč. V zarodnih centrih v bezgavkah vidimo nekrotične makrofage in limfocite. Nekroza makrofagov in levkocitov, ki sledi hiperplaziji, je patohistološko opazna tudi v limfoidnem tkivu vraničnih periarteriol in v limfnih foliklih tonzil ter v Peyerjevih ploščah (Pol in sod., 1991; Halbur in sod. 1995b). Pri visoko patogenih sevih je lahko edem v pljučih tako izrazit, da se iz okolice alveol razširi še v interlobularno vezivo. V priželjcu ti sevi povzročajo od zmerne multifokalne do močne difuzne nekroze s popolno atrofijo skorje (He in sod., 2012; Brockmeier in sod., 2017).

2.3.4 Patogeneza v endemični fazi PRRS

Endemična faza PRRS se začne, ko se viremija konča. Replikacija virusa v endemični fazi v manjši meri poteka v bezgavkah in tonzilah, ne pa v pljučih in vranici. Postopno se zmanjša izločanje virusa (Wills in sod., 1997b; Allende in sod., 2000; Rowland in Yoo, 2003), vendar dokler se virus ohranja v regionalnih bezgavkah, predstavlja možnost za okužbo dovzetnih prašičev z nosno-ustnim sekretom in semenom (Christopher-Hennings in sod., 2008). Deplecija makrofagov v sekundarnih limfatičnih organih ima za posledico slabši lokalni in sistemski imunski odziv na druge patogene mikrobo. Endemična faza se zaključi z eliminacijo virusa iz organizma prašiča. Replikacija virusa v sekundarnih limfatičnih organih se konča, prav tako se virus preneha izločati (Zimmerman in sod., 2019). Virus najdemo v nosnem izcedku 21 DPI (Benfield in sod., 1994; Rossow in sod., 1994), v blatu 38 DPI (Christianson in sod., 1993), v OF 42 DPI (Wills in sod., 1997a), v semenu pa do 92 DPI (Swenson in sod., 1993a; Swenson in sod., 1994; Christopher-Hennings in sod., 1995). Še dlje virus vztraja neposredno na mestu razmnoževanja v različnih limfatičnih tkivih. Wills in sod. (1997b) so RNA PRRSV z metodo verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (*angl. reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR*) v tonzilah dokazali še 157 DPI. V bezgavkah poskusno okuženih mladic med aklimatizacijo je bilo RNA PRRSV možno dokazati z metodo RT-PCR še 135 DPI (Batista in sod., 2004). Čas trajanja endemične faze je spremenljiv. Wills in sod. (2003) so RNA PRRSV iz tonzil in seruma uspeli izolirati še 251 DPI, pri enem izmed 28 prašičev v poskusu. Iz seruma in tkiva tonzil so pripravili tudi inokulat za intraperitonealno vbrizgavanje sentinel prašičem. Z inokulatom seruma so uspeli povzročiti okužbo do 28 DPI, s homogenatom tonzil pa do 56 DPI, kasneje pa ne več.

2.3.5 Patogeneza reprodukcijskih motenj pri PRRS

2.3.5.1 Patogeneza PRRS pri brejih plemenskih svinjah in mladica

PRRSV v endometriju vstopi z ekstravazacijo okuženih monocitov. Nato se pomnožuje v endometrialnih makrofagih ter povzroči apoptozo okuženih in okoliških celic. Ob vstopu virusa v placento prav tako pride do replikacije ter posledične apoptoze okuženih in sosednjih celic. Medtem ko maternalni imunski sistem zavre replikacijo PRRS v endometriju, je ta v placenti multifokalno izrazita ter v teh področjih privede do ločevanja posteljice od endometrija (Karniyuchuk in sod., 2013). Pri tem procesu so bolj prizadeti večji plodovi. Preko maternice naj bi se okužilo le omejeno število plodov, pri čemer se virus širi znotraj maternice na sosednje plodove – s posteljice na posteljico (Malgarin in sod., 2019). Način prehoda PRRSV preko placent ni popolnoma pojasnjen. Placenta prašiča je namreč neprepustna za imunoglobuline, ki so manjši kot PRRSV. Kljub temu lahko RNA PRRSV v plodu najdemo že 2 DPI (Suleman in sod., 2018). O prehodu virusa preko placent obstajajo 3 hipoteze, in sicer: neposredni prehod prostega virusa, prehod virusa preko celic endometrija in placent ali prehod virusa preko placent v okuženih makrofagih. V fetalnih organih najdemo največ virusa v primarnem limfatičnem organu priželjcu, pa tudi v sekundarnih limfatičnih organih, kot so bezgavke in limfatično tkivo sluznic (Novakovic in sod., 2016). Landig in sod. (2015)

so glede na stopnjo in lokalizacijo sprememb v rodilih in na organih plodov ugotovili, da je delež fetalne smrtnosti v pozitivni korelaciji z intenzivnostjo sprememb v priželjcu, ne pa tudi s tistimi na stiku endometrija in placente.

Pri brejih svinjah, okuženih s PRRSV, lahko v uterusu najdemo različno izrazite patološke spremembe, ki zajemajo histiocitni in limfo-plazmocitni endometritis s perivaskularnimi infiltrati (angl. *perivascular cuffings*). Za miometrij in zlasti endometrij je značilen močan edem. Občasno lahko opazimo segmentalen limfo-plazmocitni vaskulitis ter mikroskopske separacije epitela sluznice endometrija od placentarnih trofoblastov, med katerimi pride do nabiranja odmrlih celic in eozinofilne amorfnе tekočine, bogate s proteini (Christianson in sod., 1992; Lager in Halbur, 1996; Novaković in sod., 2016; Novaković in sod., 2017). Podobne spremembe okoli ožilja ter atrofične in nekrotične spremembe priželjca lahko vidimo tudi pri prizadetih plodovih (Landig in sod., 2015). Poškodbe ožilja, perivaskularni infiltrati in edem intersticija prizadetih tkiv tako pri materi kot pri njenih plodovih povzročajo moteno oskrbo plodov s kisikom in hranilnimi snovmi, kar vodi do abortusov, mrtvorojenih plodov ali slabe vitalnosti živorojenih pujskov (Landig in sod., 2015; Novaković in sod., 2016; Novaković in sod., 2017).

Za okužbo s PRRSV so po implantaciji dovzetni zarodki ne glede na starost, vendar pa placentarno bariero v velikih količinah virus prehaja le v zadnji tretjini brejosti (Wang in sod., 2015); izjema so nekateri visoko patogeni sevi, ki so sposobni prehoda te bariere in povzročitve smrti plodu tudi na sredini obdobja brejosti (Wang in sod., 2016; Han in sod., 2017). Vzrok intenzivnejšega prehoda virusa v zadnji tretjini brejosti pripisujejo s PRRSV okuženim makrofagom z izraženima receptorjema CD163 in CD169. Makrofagi z omenjenima receptorjema se v tem obdobju brejosti pogosteje pojavljajo v reprodukcijskih organih svinje (Karniychuk in sod., 2013).

Transplacentarna okužba se lahko konča s smrtjo plodu, z abortusom, s pravitvijo mrtvorojenih ali mumificiranih plodov, z rojstvom bolnih in oslabelih pujskov, lahko pa so pujski tudi inaparentno okuženi ali celo zdravi (Christianson in sod., 1992; Bøtner in sod., 1994; Harding in sod., 2017). Med posameznimi gnezdi, okuženimi z enakim tipom, lahko prihaja do velikih razlik v poteku pravitve ali obolelosti pujskov (Landig in sod., 2014). Okužbo s PRRSV v zgodnji brejosti povezujejo z zgodnjo embrionalno smrtnostjo in manjšim deležem uspešnih oploditev v zgodnji brejosti. Če zarodki preživijo, v srednjem obdobju brejosti ponavadi ni videti težav, v pozni brejosti pa virus najpogosteje preide placento in povzroča abortuse, prezgodnja rojstva slabotnih pujskov z velikim deležem pogina ali rojstvo mrtvih pujskov (Lunney in sod., 2016). Verjetnost transplacentarne okužbe ni povezana z virulenco povzročitelja (Park in sod., 1996).

2.3.5.2 Patogeneza PRRSV pri merjascih

Virus se razmnožuje v spolnem epiteliju zavrtih semenskih cevčic in v makrofagih v intersticiju testisov (Sur in sod., 1997; Wills in sod., 2003). Spremembe se kažejo v atrofiji spolnega epitelija od 5 do 6 mesecev starih merjascev od 7 do 25 DPI (Sur in sod., 1997). Christopher-

Henings (2000) je po eksperimentalni okužbi merjascev ugotovil, da so ti kljub vazektomiji z ejakulatom širili PRRSV. V atrofičnem spolnem epiteliju je mogoče najti RNA PRRSV in antigene ter celice velikanke z od 2 do 15 jedri (Zimmerman in sod., 2019). V ejakulatu se pojavi tudi večja količina nezrelih spolnih celic, okuženih s PRRSV (Sur in sod., 1997). Spremembe na semenu se pojavijo od 2 do 10 tednov po okužbi in se kažejo kot zmanjšana gibljivost spermijev in spremembe na področju akrosomalne kape (Lager in Halbur, 1996; Prieto in sod., 1996a; Prieto in sod., 1996b; Swenson in sod., 1994a; Yaeger in sod., 1993).

2.4 KLINIČNA ZNAMENJA

Zbrana znanstvena poročila glede kliničnih znamenj PRRS iz Severne Amerike, Južne Amerike, Evrope in Azije navajajo enake simptome, ne glede na genotip PRRSV (Zimmerman in sod., 2019). Intenzivnost kliničnih znamenj in odstopanja v kliničnem poteku bolezni pa lahko variirajo od črede do črede, od subkliničnih do izredno akutnih; odvisni so od genotipa prašiča, starosti, virulence virusnega seva, imunskega statusa prašiča, od prisotnosti sočasnih okužb in od menedžmenta v reji (Albina, 1997; Lunney in sod., 2011; White, 1992a).

V primeru okužbe s HP-PRRSV so klinična znamenja bolj izrazita, pojavljajo se tudi v širšem obsegu in zajemajo več organskih sistemov (Karniychuk in sod., 2010; Mengeling in sod., 1998; Wang in sod., 2015a).

2.4.1 Klinična znamenja v akutni fazi bolezni

Klinična znamenja v akutni fazi PRRS se pojavijo v vseh imunološko naivnih populacijah prašičev (Zimmerman in sod., 2019). PRRS lahko iz endemične faze znova preide v akutno ob vnosu drugega seva PRRSV ali ob mutaciji virusnih sevov, ki so že prisotnih v neki populaciji prašičev (Wang in sod., 2015a).

Po vnosu virusa v rejo akutna faza traja do 14 dni, lahko tudi dlje. Okužijo se vse živali v posameznih kategorijah prašičev. Prašiči, ki so nastanjeni skupinsko, zbolijo v roku od 3 do 7 dni, če pa so živali nastanjene individualno, se ta interval podaljša na 7 do 10 dni. Poleg tega se lahko zgodi, da individualne živali sploh ne zbolijo, kar je odvisno od gostote prašičev in načina ter značilnosti reje (Zimmerman in sod., 2019). Izrazitost kliničnih znamenj sovпада s stopnjo viremije; najizrazitejša so klinična znamenja, kadar je količina virusa v serumu največja (Johnson in sod., 2004; Lunney in sod., 2016).

2.4.1.1 Akutni PRRS pri plemenskih svinjah

Pri okuženih svinjah največkrat opazimo pireksijo, apatičnost, zmanjšano konzumacijo krme in različne oblike reprodukcijskih motenj. Reprodukcijske motnje trajajo od 1 do 4 mesecev (Zimmerman in sod., 2019). Pri manjšem deležu svinj se pojavi tudi agalaksija (Hopper in sod., 1992) in nekoordinirano gibanje (de Jong in sod., 1991). Vse okužene svinje ne kažejo kliničnih znamenj PRRS (Ladinig in sod., 2015; Zimmerman in sod., 2019). V akutni fazi PRRS znaša smrtnost pri svinjah 1–4 % in je povezana je s pljučnim edemom kot posledica

primarne ali sekundarne okužbe ter sekundarnih bakterijskih cistitisov in nefritisov (Luola, 1991; Hopper in sod., 1992). Med akutno fazo bolezni pride do popolne izgube v 1–3 % plodov pri vseh svinjah med 21. in 109. dnevem brejosti zaradi povečanega števila abortusov in podaljšane servisne periode. Svinje, ki ne abortirajo, prasijo manjša gnezda, večji pa je tudi delež slabotnih pujskov (Keffaber, 1989; Luola 1991; Hopper in sod., 1992; White, 1992a). Po okužbi s PRRSV 5–80 % svinj prasi prezgodaj; hkrati lahko v istem gnezdu najdemo pujske različnega zdravstvenega stanja (zdravi, okuženi, slabotni, mumificirani, mrtvorojeni). Delež mrtvorojenih pujskov znaša med 7 in 35 %; od pričetka okužbe se, medtem ko svinje prebolevajo in ustvarjajo imunost proti farmskemu sevu virusa, zmanjšuje delež mrtvorojenih in mumificiranih pujskov in povečuje delež živorojenih pujskov, bodisi zdravih, bodisi okuženih ali slabotnih (Keffaber, 1989; Loula, 1991; White, 1992a). Pri visoko patogenih sevih naraste delež obolelih svinj in njihova smrtnost ter tudi delež abortusov (Zimmerman in sod., 2019). Zhou in Yang (2010) poročata o smrtnosti preko 10 % pri svinjah in o abortusih v 40–100 % primerov, telesna temperatura svinj pogosto preseže 42 °C. Poleg osnovnih kliničnih znamenj se pojavljajo kožni eritemi, kašelj, dispneja in tahipneja (Zhou in Yang., 2010). Kljub vsemu lahko klinična slika zelo variira ne glede na virusni sev, od asimptomatskih primerov do izredno hudih, na kar vplivajo individualne značilnosti, faza brejosti in imunski status (Harding in sod., 2016).

Sinn in sod., (2016) v avstrijski klinični raziskavi poročajo o cianozi uhljev in repa pri plemenskih svinjah okuženih s PRRSV, ki so kasneje nekrotizirali. Delež mrtvorojenih pujskov je znašal 50 %, v prvih petih dneh je poginilo 40 % živorojenih pujskov. Pri omenjeni raziskavi je šlo za prvi primer okužbe rej prašičev v Spodnji Avstriji. Analize genoma ORF7 PRRSV kažejo na tesno sorodnost s hrvaškimi sevi PRRSV (88 % identičnost z ref: LV-PRRSV in 80 % identičnost z ref: Lena, PRRSV-1, podtip 3). Sinn in sod. (2016) so pripisali izrazito patogeno delovanje in nadpovprečno visoko smrtnost pri pujskih relativno visokemu deležu sorodnosti s HP-PRRSV sevom Lena in dejstvu, da je šlo za okužbo naivnih živali. Hopper in sod. (1992) opisujejo pojav akutnih kliničnih znamenj pri 60 % vseh odraslih plemenskih svinj. Pri brejih plemenskih svinjah pa so se reprodukcijske motnje manifestirale kot abortusi (3,3 %), prezgodnje prasiatve (20,6 %), v gnezdih je bilo 18 % pujskov mumificiranih, 26 % vseh pujskov pa mrtvorojenih. Epperson in Holler (1997) ter Halbur in Bush (1997) so istega leta opisali nekaj hudih primerov akutnega PRRS pri svinjah z več kot 10-odstono smrtnostjo svinj in med 40- in 100-odstotno incidenco abortusov, ki jih je pri brejih svinjah in mladiceh spremljala 2 do 4 dni trajajoča močno povečana telesna temperatura (40–41 °C). Tudi nebrije svinje so imele močno povišano telesno temperaturo ter smrtnost nad 10 %. Z metodo RFLP (angl. *restriction fragment length polymorphism*) so prisoten PRRSV uvrstili kot podtip 1-4-2. Harbour in sod. (2016) pri abortiranih plodovih opisujejo pojav fetalne hipoksije in zamazanosti z mekonijem. Drigo in sod. (2018) v terenski raziskavi opisujejo klinična znamenja v dveh nestabilnih plemenskih čredah. Na prvi farmi se je delež prasitev zmanjšal za 20 %, v drugi je v zadnji tretjini brejosti delež abortusov znašal 15 %. V gnezdih so prednjačili pujski z izraženimi kliničnimi znamenji PRRS, smrtnost svinj pa se je dvignila do 4 %. Ladinig in sod (2014) so eksperimentalno okužili 114 mladice v

zadnji tretjini brejosti z visoko patogenim sevom NVSL 97-7895, pri čemer je ena mladica poginila (≤ 1 %), dve sta abortirali (1–2 %); klinično je bilo opaziti anoreksijo in bifazno povišano telesno temperaturo 2 in 8 DPI.

2.4.1.2 Akutni PRRS pri plemenskih merjascih

Poleg pireksije, anoreksije, letargije in respiratornih znamenj, se pri plemenskih merjascih zmanjša libido in poslabša se kakovost semena (de Jong in sod., 1991; Feitsma in sod., 1992; Prieto in sod., 1996b). Morfološke spremembe spermijev so pod mikroskopom opazne od 2 do 10 tednov po okužbi. Kljub zmanjšani gibljivosti semenčic in poškodbam akrosoma neposredna povezava med spremembami in zmanjšano oploditveno sposobnostjo ni jasno dokazana (Yaeger in sod., 1993; Swenson in sod., 1994b; Lager in sod., 1996; Prieto in sod., 1996a, Prieto in sod., 1996c).

2.4.1.3 Akutni PRRS pri sesnih pujskih

Smrtnost okuženih, prezgodaj rojenih pujskov do odstavitve, znaša do 60 %. Klinično se lahko pojavijo apatičnost, shiranost, razkrcenost nog, hiperpneja, dispneja in krvavi podlivi. Redkeje se pridružijo živčna znamenja, kot so somnolenca, tremor in veslanje (Keffaber, 1989; Loula, 1991; Rossow in sod., 1999). Sinn in sod. (2016) poročajo, da so v njihovi raziskavi preživeli pujski slabše priraščali. Zaostanek v rasti pujskov je bil hujši pri gnezdih, kjer so svinje prasile prezgodaj – 2 svinji sta prasili z 10-dnevno zamudo, 9 svinj pa prezgodaj; iz prvih dveh gnezd so uspešno odstavili skupno 20 pujskov, od preostalih 9-ih pa skupno 11 pujskov. Navajajo tudi, da je bilo 10 % okuženih pujskov anemičnih.

Pri visoko patogenih azijskih sevih Zhou in Yang navajata do 88-odstotno smrtnost pujskov, Han in sod., (2016) pa do 100-odstotno smrtnost. Poleg vseh kliničnih znamenj, ki se pojavljajo pri okužbah pujskov z nizko patogenimi sevi PRRSV, se pogosteje pridružijo še nevrološka klinična znamenja in diareja ali pa zaprtje.

2.4.1.4 Akutni PRRS pri tekačih

Akutni PRRS pri tekačih se običajno kaže kot povišana telesna temperatura, anoreksija, letargija, hiperemija ali cianoza kože, hiperpneja ali dispneja, kašelj, nasršene ščetine, zmanjšan prirast in povečan delež pogina tekačev (12–20 %) (Moore, 1990; White, 1992b). Thanawongnuwech in sod. (1997) poročajo o pojavu neznačilnih živčnih znamenj v obliki tresavice, ataksije in konvulzij. Renson in sod. (2017) poročajo o blagih kliničnih znamenjih po okužbi 6 tednov starih tekačev s PRRSV-1 sevom Finistere. Pri okužbi s tem sevom je bila telesna temperatura blago povišana (39–40 °C), z blago izraženo dispnejo, kašljem, kihanjem in nosnim izcedkom. Pri 12,5 % tekačev se je od 11 do 12 DPI pojavila značilna cianoza uhljev.

Pri okužbah z visoko patogenimi azijskimi sevi različne raziskave poročajo, da respiratorna klinična znamenja spremljajo še hitro hiranje in pogin, redkeje se pojavijo še cianoza, bruhanje, diareja, zaprtje, tresavica in konjunktivitis ter hemoza očesnih veznic z edemom

očesnih vek (Li in sod., 2007; Tian in sod., 2007, Zhou in sod., 2008; Guo in sod., 2013; Hu in sod., 2013). Pri okužbi z visoko patogenim PRRSV-1 sevom Lena se pojavlja visoka telesna temperatura (nad 40 °C); predvsem respiratorna klinična znamenja so v obdobju od 3 do 22 DPI zelo izrazita, najbolj približno 12 DPI. Močno se poveča frekvenca dihanja, pojavi se močan kašelj, kihanje in nosni izcedek, smrtnost je okoli 40 % (Renson in sod., 2017). Sinn in sod. (2016) ob okužbi z visoko patogenim PRRSV-1 AUT15-33 prav tako poročajo o 40-odstotnem poginu pri 5 tednov starih tekačih. PRRS se je klinično izrazil kot povišana telesna temperatura z otečenimi sklepi in šepavostjo. Li in sod. (2012) so v svoji raziskavi ocenjevali učinke visoko patogenega seva JXwn06 in nizko patogenega HB-1/3.9 PRRSV-2 z intranazalno inokulacijo $2 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀ pri 6 tednov starih tekačih. Pri prvih se je telesna temperatura povečala 2 DPI, pri drugih dan pozneje, s statistično značilnimi razlikami ($p < 0.01$). Pri visoko patogenem sevu so bili opazni apatija, anoreksija, letargija, izguba prožnosti kože, respiratorni distress, tresavica in diareja; vsi prašiči so med 5 in 10 DPI tudi poginili. Pri drugi skupini, okuženi z nizko patogenim sevom PRRSV, se bolezen razen povišane telesne temperature in blagih respiratornih težav ni klinično izrazila.

2.4.1.5 Akutni PRRS pri pitancih

Klinična znamenja pri akutnem PRRS so pri pitancih podobna tistim pri tekačih z zanemarljivim poginom pri nizko patogenih sevih. Pojavljajo se neješčnost, apatičnost, hiperemija kože, oteženo dihanje brez kašlja, naježenost ščetin. Ekonomske izgube v tej fazi so povezane predvsem z zmanjšanim prirastom (White, 1992b; Zimmerman in sod., 2019).

Pri visoko virulentnih sevih lahko pogin tudi pri pitancih doseže 20 % (Zhou in Yang, 2010). Ferlazzo in sod. (2020) poročajo o povišani telesni temperaturi nad 40 °C od 2 do 12 DPI, apatiji, kašlju, dispneji in nosnemu izcedku, ki so trajali do 14 DPI po intranazalni aplikaciji 10^6 TCID visoko patogenega PRRSV-1, sev BS773, 3 mesece starim pitancem. Noben prašič v poskusu zaradi okužbe ni poginil.

2.4.2 **Klinična znamenja v endemični fazi bolezn**

Bolezen preide iz akutne v endemično fazo pri skoraj vseh primerih izbruhov. Prašiči v reji imajo namreč že določeno stopnjo imunske zaščite proti virusu, ki pa ni pri vseh enako učinkovita in ne traja pri vseh enako dolgo. Klinična znamenja so neizrazita, pogosti pa so izbruhi sekundarnih obolenj in poslabšanje proizvodnih parametrov pri vseh kategorijah prašičev (Zimmerman in sod., 2019). Občasno prihaja do ponovnih akutnih izbruhov klinične oblike PRRS, bolezen je pri ponovnem izbruhu krajša in blažja. Pri neupoštevanju ukrepov biovarnosti so lahko akutni izbruhi posledica vnosa novega seva virusa (Štukelj, 2013). Običajno PRRS izbruhne pri določeni kategoriji oziroma skupini prašičev znotraj posameznega oddelka na farmi. Klinična znamenja se pokažejo na primer pri tekačih po padcu maternalne imunosti (Grosse-Beilage in Grosse-Beilage, 1992; Dee in Joo, 1994; Dee in sod., 1996; Zimmerman in sod., 2019). V endemični fazi se lahko pojavi akutna oblika bolezn pri mladica in plemenskih merjascih, če so bili pripeljani v rejo brez predhodne aklimatizacije na farmski sev virusa (Štukelj, 2013). Pri plemenskih svinjah se v endemični

fazi običajno pojavljajo reprodukcijske motnje, ki se razlikujejo glede na fazo brejosti živali (Torrison in sod., 1994).

Za endemično fazo PRRS so značilni pogostejši dodatni izbruhi endemično prisotnih boleznih v reji, ki jih zaradi oslabiljenega imunskega sistema povzročajo drugi patogeni mikrobi: PCV2 (Chung in sod., 2005), virus prašičje influence (PI) (Drew, 2000), *Streptococcus suis* (Xu in sod., 2010), *Glaesserella parasuis* (Palzer in sod., 2015), *Salmonella choleraesuis* (Wills in sod., 2000a) in *M. hyopneumoniae* (Thacker in sod., 2000). Za naštete povzročitelje boleznih je značilno, da je njihov patogeni vpliv zaradi oslabiljenega delovanja imunskega sistema običajno izrazitejši in traja dlje.

2.4.2.1 Endemični PRRS pri plemenskih svinjah

Potek boleznih v endemični fazi je zelo odvisen od števila okuženih plemenskih živali v čredi ter od njihovega imunskega statusa oziroma od stopnje zaščite proti PRRSV, ki je zlasti odvisna od nivoja specifičnih protiteles v serumu. Če je okužen majhen delež živali, vidimo sporadične abortuse, nepravilen povratek v estrus, slabši delež uspešnih osemenitev in redke pozne abortuse. Spremembe so zelo blage in se jih opazi šele pri pregledu evidenc o proizvodnih podatkih (White, 1992). V kolikor se okuži večji del plemenskih živali v določenem oddelku ali pododdelku na farmi, se PRRS ponovno izrazi kot v akutni fazi, pogosteje pri mladicah, a tudi pri starejših plemenskih svinjah ob padcu nivoja specifičnih protiteles (Dee in Joo, 1994). Sinn in sod. (2014) navajajo, da je bil ob akutnem izbruhu delež neuspešnih osemenitev 40 %, v roku enega ciklusa pa se je ta delež zmanjšal na 12 %.

2.4.2.2 Endemični PRRS pri merjascih

Pri merjascih se poslabša kakovost semena zaradi poškodb semenskih tubulov, kar se odraža v slabši kvaliteti semena (Sur in sod., 1997, Zimmerman in sod., 1997b). Perzistenca PRRSV v modih merjascev lahko vztraja tudi po tem, ko patohistološke spremembe že izginejo, kljub temu da se PRRSV ne razmnožuje neposredno v celicah semenskih tubulov (Christopher-Hennings in sod., 1995).

2.4.2.3 Endemični PRRS pri sesnih pujskih

Pri endemični obliki PRRS je smrtnost na okuženih farmah nekoliko povečana, vendar manjša v primerjavi z akutno fazo. Stevenson in sod. (1993) poročajo o 3- do 17-odstotni smrtnosti pujskov v endemično okuženi reji v povezavi z letnim časom; smrtnost je 17-odstotni vrh dosegla v zimskih mesecih zaradi pogostejših izbruhov sekundarnih obolenj in negativnega vpliva nižje temperature na imunski sistem živali. Po podatkih Sinn in sod. (2014) je delež poginjenih pujskov v akutnem obdobju znašal 90 %, ob naslednjih prasitvah pa 60 %; v tretjem zaporednem ciklusu prasitev je bil pogin neznaten. V endemični fazi sesne pujske v gnezdu ščiti kolostralna imunost (Štukelj, 2013).

2.4.2.4 Endemični PRRS pri tekačih in pitancih

Pri tekačih v endemično okuženih rejah prihaja do izbruhov PRRS po padcu kolostralne imunosti živali, najpogosteje pri tekačih, starih med 4 in 12 tednov; pojavljajo se respiratorne težave in slabši prirast zaradi slabše konverzije krme (Keffaber in sod., 1992; Stevenson in sod., 1993). Renson in sod. (2017) poročajo o znatnem upadu prirasta po eksperimentalni okužbi z nizko patogenim sevom Finistere pri 6 tednov starih tekačih po akutni fazi bolezni. Popolno okrevanje se zgodi med 44 in 45 DPI. Po ozdravitvi so okuženi prašiči iz testne skupine priraščali hitreje od zdravih prašičev iz kontrolne skupine. Povečala se je tudi pogostost endemskih bolezni pri okuženih prašičih v primerjavi z neokuženimi (Keffaber in sod., 1992; White, 1992a; Stevenson in sod., 1993). Pri pitancih so v endemični fazi PRRS pogostejše sekundarne bolezni, zmanjšan prirast in slabša konverzija krme (White 1992a; Stevenson in sod., 1993; Sinn in sod., 2016; Drigo in sod., 2018).

2.5 IMUNSKI ODZIV PROTI VIRUSU PRRS

Okužba s PRRSV sproži imunski odziv, ki sčasoma eliminira virus iz organizma in ustvari specifično imunost proti homolognim virusnim sevom ter določeno stopnjo zaščite proti heterolognim sevom. Imunski odziv je po svojih značilnostih enak pri PRRSV-1 in -2 (Zimmerman in sod., 2019).

2.5.1 **Imunski odziv in signalne poti na molekularni ravni**

Po vstopu virusa v okuženo celico se na ravni subceličnih delcev preko različnih encimov in signalnih molekul začne kaskadni proces, ki preko ekspresije različnih genov privede do nespecifičnega in kasneje specifičnega imunskega odziva.

Med signalnimi poti, ki znotraj celic prenašajo informacije in sprožajo raznoliko izražanje genov, sta pri okužbi s PRRSV izpostavljeni RIG-I/MDA5 in JAK/STAT. Virus preko njiju modulira nastanek interferonov tipa I, kot sta IFN- α in β , ki imata zelo močno nespecifično antivirusno delovanje, predvsem preko vpliva na celice naravne ubijalke iz limfocitne celične vrste (angl. *natural killer cells*; v nadaljevanju celice NK) (Sun in sod., 2012). RIG-I je angl. kratica za *retinoic acid inducible gene 1*. To je citoplazemski receptor, specifičen za vezavo virusne ssRNA, kakršen je tudi genom PRRSV. Le nepoškodovana molekula ssRNA lahko z vezavo na RIG-I aktivira signalno pot za ekspresijo in produkcijo IFN tipa I (Gantier in Williams, 2007). Protein, ki deluje v povezavi z diferenciacijo melanoma (angl. *melanoma differentiation-associated protein*; MDA5) je prav tako citoplazemski RNA receptor, ki je strukturno podoben RIG-I, a po funkciji različen. Pomemben je pri aktivaciji nespecifičnega imunskega odziva proti virusom iz družine *Picornaviridae* (Gitlin in sod., 2006). Ko se IFN- α in β vežeta na površino celičnih receptorjev, se sproži signalna pot preko aktivacije Januskinaze (JAK) in prenašalcev ter aktivatorjev signalov transkripcije (angl. *signal transducers and activators of transcription*; STAT) (Schindler in Darnell Jr., 1995). Molekule STAT se aktivirajo s fosforilacijo in vezavo z interferon regulatornim faktorjem (IRF-7) in po translokaciji v jedro celice vplivajo na ekspresijo interferon stimulirajočih genov (ISG).

Njihova ekspresija v okuženi celici ustvari t. i. antivirusno okolje predvsem z aktivacijo makrofagov in pospešenim izražanjem molekul histokompatibilnostnega kompleksa (angl. *major histocompatibility complex*, MHC) tipa I na površini celic, ki omogočajo prepoznavo procesiranih antigenov PRRSV in razvoj celične imunosti (Schindler in Darnell Jr., 1995; Krebs in Hilton, 2001).

Celične signalne poti za sprožitev in uravnavanje imunskega odziva se sprožijo ob prisotnosti nekaterih virusnih proteinov, na primer z nsp1, nsp2 in nsp11, pozneje pa še ob prisotnosti strukturnih proteinov N. Ti so vključeni v zaviranje genske ekspresije IFN- α in transkripcijskega jedrnega faktorja NF- κ B, ki nadzoruje ekspresijo genov in produkcijo pro-vnetnih citokinov (Pahl in Bauerle, 1995; Sun in sod., 2012). Zaviranje ekspresije faktorja tumorske nekroze tipa alfa (angl. *tumor necrosis factor*; TNF- α) je način, s katerim virus zavira apoptozo okuženih celic (Lopez-Fuertes in sod. 2000; Ait-Ali in sod., 2007). V raziskavi, kjer so Li in sod. (2017a) eksperimentalno okužili 7 tednov stare prašičev z nizko patogenim in z visoko patogenim sevom PRRSV, so ugotovili, da se produkcija TNF- α , ki ga v največjem deležu proizvajajo makrofagi in monociti v pljučih ter v serumu, pri okužbah s HP-PRRSV močno poveča v primerjavi z okužbami z nizko patogenimi sevi. Visok nivo TNF- α je v povezavi količino virusa v krvi in pa s pojavom zelo izrazite klinične oblike bolezni.

V zgodnji fazi virusnih okužb imajo vlogo pro-vnetnih citokinov TNF- α , IL-1, IL-6 in IL-8, ki jih izločajo makrofagi. Ti nadalje spodbujajo celice T pomagalke tipa 1 (Th1), da izločajo interferon gama (IFN- γ) in interleukin 2 (IL-2), ki spodbujata nastanek celičnega imunskega odziva. Obratno kot zgoraj naštetih, IL-10 in transformirajoči faktor beta (angl. *transforming growth factor*; TGF- β) nespecifični in celični imunski odziv zavirata (Didierlaurent in sod., 2007). Za pridobljen imunski odziv na različne patogene mikrobo je pogosto značilna polarizacija v smislu citokinskega odziva. Za okužbo z virusi je značilen tip 1 citokinskega odziva s povečano produkcijo IFN- γ , TNF- α , IL-12 in delovanjem citotoksičnih CD8⁺ limfocitov T. V nasprotju s tem je pri okužbah z zunajceličnimi patogeni, tj. bakterijami, glivami in paraziti, bolj značilen in pomemben tip 2 citokinskega odziva s povečano produkcijo IL-4, IL-5 in IL-13. Citokini tipa 1 delno zavirajo produkcijo citokinov tipa 2, in obratno. Patogeni mikrobo z zelo polarizirajočim vplivom na imunski odziv povzročijo nesorazmerje med obema tipoma citokinskega odziva, kar se posledično kaže kot večja občutljivost za sočasne okužbe z drugimi patogenimi mikrobo (Didierlaurent in sod., 2007). To je značilno tudi za okužbo s PRRSV. Citokini lahko delujejo tudi sinergistično ali antagonistično; tako so IL-1, TNF- α in IFN- α znani tudi pod imenom citokinska triada, njihova skupna koncentracija se ob okužbi z respiratornimi virusi v pljučnem tkivu poveča. Van Reeth in sod. (1999) so dokazali prisotnost omenjenih treh citokinov v bronhoalveolarnih izpirkih in histoloških rezinah pljuč eksperimentalno okuženih in kasneje žrtvovanih od 3 do 4 tednov starih pujskov. Ugotovili so, da pri PRRS koncentracije IL-1, TNF- α in IFN- α niso zelo povišane in zato tudi respiratorna klinična znamenja zaradi primarne okužbe s PRRSV niso nujno zelo izrazita; so namreč posledica slabše lokalne imunosti in komplikacij ob sočasnih okužbah.

2.5.2 Vloga prirojene in nespecifične imunosti pri okužbi s PRRSV

2.5.2.1 Genetsko pogojena odpornost

Imunski odziv proti PRRSV je odvisen od nekaterih genetskih predispozicij živali. Doslej so bile opravljene številne raziskave, ki so eksperimentalno pokazale boljšo odpornost nekaterih pasem proti okužbam PRRSV, in sicer glede na manjši obseg patomorfoloških in patohistoloških sprememb v pljučih, boljši prirast in manjšo količino virusa v krvi in tkivih. Večinoma so kot bolj odporne izpostavljene pasme z zelo velikimi gnezdi, kot sta na primer *meishan* in *large white*. To področje se z razvojem metod za preiskavo celotnega genoma in bioinformacijskimi pripomočki za obdelavo velikih količin podatkov pospešeno razvija (Lunney in Chen, 2010). Reiner in sod. (2010) poročajo o genotipskih razlikah o poteku in eliminaciji okužbe iz organizma pri primerjavi miniaturne pasme *wiesenaus* in pri komercialni pasmi *piétrain*; pri slednjih je viremija trajala dlje. Boddicker in sod. (2012) so z metodo sekvenciranja celotnega genoma pri od 2 do 4 tedne starih pujskih, okuženih s PRRSV, odkrili lokuse na 1., 4., 7., 17. kromosomu in na kromosomu X, ki so povezani s trajanjem viremije in zmanjšanjem dnevnega prirasta med okužbo. Variabilnost regije Mb-1 na 4. kromosomu ima značilen vpliv na oba parametra, kar je 42 DPI znašalo razliko 3 kg pri telesni masi prirasta. Nadaljnja raziskava te regije genoma je pokazala, da je nosilec spremembe odpornosti protein za vezavo gvanilata 5 (GBP-5) (Koltes in sod., 2015), ki igra vlogo pospeševalca vnetnega odziva s pozitivno regulacijo interferonov, na primer tudi pri odzivu na lipopolisaharidne antigene v celični steni gramsko negativnih bakterij (Pilla in sod., 2014).

2.5.2.2 Nespecifična obramba

Nespecifična obramba sestoji iz: fizičnih barrier, kot so koža in površina sluznic, kemičnih barrier, ki jih opredeljujejo antimikrobni peptidi, vrednost pH, lipidi in različni encimi iz obrambnih celic z nespecifičnim delovanjem, kot so monociti, makrofagi, eozinofilci, nevtrofilci in celice NK (Koyama in sod., 2008; Lunney in sod., 2016). Te celice imajo različne vloge pri odstranjevanju agensov iz organizma in pri prenosu informacij za nadaljnjo sprožitev specifične imunosti. Celice NK so odgovorne za nespecifično prepoznavanje in neposredno uničevanje katerekoli okužene telesne celice (Lunney in sod., 2016). Poleg tega z izločanjem citokinov omogočajo hiter in učinkovit prenos informacij ter sprožitev specifične celične imunosti (Koyama in sod., 2008). Celice NK regulira citokinsko okolje s citokini IFN- α - β , IL-12, in IL-15 (Nguyen in sod., 2002). Poleg omenjenih sta za regulacijo nespecifičnega odziva pomembna še IL-8 in TNF- α (Li in sod., 2017a). Pri okužbah s PRRSV je nespecifična obramba okvarjena, kar virusu omogoča, da se prvim obrambnim mehanizmom izogne in se tako razširi po organizmu. Regulacija citokinskega odziva celic NK ter okvara funkcij in propadanje makrofagov, ki imajo pomembno vlogo pri fagocitozi ter kasneje pa pri procesiranju in predstavljanju antigena v sklopu MHC II molekul, zelo pomembno vplivajo na večjo dovzetnost za sekundarna obolenja po okužbi s PRRSV (Lunney in sod., 2016).

Odpornost proti PRRS narašča s starostjo živali. Mlajši prašiči, posebno sesni pujski, se pri specifičnem imunskem odzivu zoper PRRSV opirajo le na specifična kolostralna IgG. Imunski sistem sesnih pujskov postane popolnoma kompetenten šele proti koncu pubertete (Klinge in sod., 2009; Polo in sod., 2012; Butler in od., 2014). Preden imunski sistem do konca dozori, se mlajši prašiči proti PRRSV opirajo predvsem na delovanje celic NK. Delovanje makrofagov, tarčnih celic PRRSV, je namreč zaradi okužbe in obrambnih mehanizmov virusa močno okrnjeno. Glede na delež belih krvnih celic je pri mlajših kategorijah prašičev celic NK več, a so te manjše in vsebujejo manj granul, v katerih se nahajajo molekule s citotoksičnim delovanjem (Gerner in sod., 2009). Renukaradhya in sod. (2010) so pri 16 do 20 dni starih pujskih, intranazalno in intramuskularno okuženih s 3×10^4 TCID₅₀ oziroma z 2×10^4 TCID₅₀ PRRSV, zabeležili znaten upad citotoksičnega delovanja celic NK. Supresija celic NK se prične 2 DPI (Dwivedi in sod., 2012) in traja od 3 do 4 tedne (Renukaradhya in sod., 2010). Zmanjšano efektorsko delovanje celic NK dokazano povzročajo tudi živa oslABLJENA cepiva ob intramuskularni ali intranazalni aplikaciji (Albina in sod., 1998; Renukaradhya in sod., 2010; Dwivedi in sod., 2011). Redukcija citotoksične aktivnosti celic NK ni neposredno povezana zgolj s številom teh celic. Kljub temu da se raven celic NK normalizira približno 14 DPI, je njihovo efektorsko delovanje še vedno zmanjšano (Renukaradhya in sod., 2010; Dwivedi in sod., 2011).

2.5.3 Specifična obramba ali imunost

2.5.3.1 Celična imunost

Nosilci celične imunosti so limfociti T. Ti za svoje delovanje oziroma prepoznavo antigenov potrebujejo predstavitev antigena v povezavi z MHC, bodisi MHC I v sklopu s CD8⁺ na površini somatskih celic, bodisi MHC II v sklopu CD4⁺ na površini antigen predstavitvenih celic (APC). Limfociti T prepoznavajo antigen in MHC s T celičnim receptorjem izraženim na celični membrani limfocita (TCR) (Saito, 2012). Geni, ki kodirajo TCR, so zelo sorodni tistim, ki kodirajo protitelesa (Yanagi in sod., 1984). Za nadaljnji prenos signala o prepoznavanju antigena mora biti TCR povezan s CD3 na površini limfocitov, ki po različnih signalnih poteh sproži klonsko ekspanzijo limfocitov (Meuer in sod., 1983) in proliferacijo predvsem limfocitov T CD8⁺. Za izrazito povečanje števila limfocitov je v prvi vrsti odgovoren IL-2, ki ga po aktivaciji začno izločati CD4⁺ limfociti T (njegovo angleško poimenovanje je *T cell growth factor*). Po klonski ekspanziji efektorski limfociti T potujejo na mesto prepoznave antigena, kjer citotoksični limfociti T (CD8⁺) kot efektorske celice direktno uničujejo okužene celice. Celice T pomagalka (CD4⁺ limfociti T) pa imajo kot glavno efektorsko nalogo izločanje citokinov in ekspresijo nekaterih receptorjev na celični membrani, s čimer povezujejo in usmerjajo delovanje drugih levkocitov v celoto. Del teh limfocitov tvori tudi imunski spomin (Saito, 2012). Celično imunost se lahko opredeljuje predvsem na podlagi meritev količine IFN- γ , ki ga povečini izločajo celice T pomagalka tipa 1 (CD4⁺ Th₁, angl. *lymphocyte T helper cell Th*) in CD8⁺ oziroma citotoksični limfociti T ter tudi celice NK. Citokine IFN- γ , TNF- α in IL-2, ki sodelujejo pri celični imunosti, sintetizirajo določene imunске celice. Na podlagi citokinskega okolja in prepoznavanja antigena v sklopu MHC I

molekul citotoksične CD8⁺ limfociti T v svoji citoplazmi producirajo citotoksične produkte, s katerimi po tesnem stiku ubijejo tarčno celico, ki jo predstavljalo tuje, spremenjene ali z intracelularnimi patogenimi mikrobi okužene lastne celice (Kuby, 1997).

Pri okužbi s PRRSV so predvsem okvarjeni efektorski mehanizmi delovanja limfocitov CD8⁺, način pa še ni popolnoma pojasnjen (Lunney in sod., 2016). Vpliv na okrnjeno delovanje naj bi imela povečana apoptoza makrofagov, ki so ene izmed antigen-predstavitvenih celic, atrofija priželjca pri mlajših kategorijah prašičev in posledična limfopenija, sproščanje protivnetnih citokinov IL-10 in TGF- β ter zmanjšano izražanje MHC-I molekul na okuženih celicah. IL-10 in TGF- β izločajo CD4⁺ limfociti T, ki jih smatramo kot regulatorne celice T (T_{reg}) (Lunney in sod., 2016; Li in sod., 2017a). Virus PRRS vpliva tudi na funkcije T_{reg}, CD4⁺ Th₃, saj preko zaviranja funkcije omenjenih celic omejuje nastanek vnetja, kar še dodatno prizadene sposobnost predstavljanja antigenov PRRSV (Gomez-Laguna in sod., 2009; Silva-Campa in sod., 2009; Wongyanin in sod., 2010). Celični imunski odziv pri PRRS se zelo razlikuje pri okužbah z nizko patogenimi in visoko patogenimi sevi virusa; pri prvih je oslabljen in zapoznel, pri drugih pa izjemno buren in lahko povzroči močan, z makrofagno aktivnostjo povezan izbruh pro-vnetnih citokinov IL-1, IL-6 in TNF- α , kar poznamo pod izrazom citokinska nevihta ali citokinski izbruh (Thanawongnuwech in Thacker, 2003; Thanawongnuwech in sod., 2004; Behrens in sod., 2011; Li in sod., 2017a).

2.5.3.2 Protitelesna imunost

Geni, ki kodirajo nastanek protiteles, se nahajajo na vsega dveh lokusih (Dreyer in Bennett 1965; Hozumi in Tonegawa, 1976). Kljub temu se v posameznem organizmu nahaja od 10⁶ do 10⁹ različnih protitelesnih specifičnosti. To omogoča proces somatske hipermutacije, ki se dogaja po prepoznavi antigena in pod vplivom določenih citokinov, katere v največji količini izločajo CD4⁺ limfociti. To so IL-2, IL-4, IL-5 in IL-6 ter IFN- γ , ki pospešujejo proliferacijo limfocitov B in diferenciacijo v plazmatke. Po izpostavitvi omenjenim citokinom se v zarodnem centru limfocitov, tj. v kostnem mozgu, dogajajo izredno hitre mutacije (10⁻³ na bazni par na mitozo) na genu, ki kodira variabilni del protitelesa (DeFazio in sod., 2002). Sposobnost imunskega sistema, da producira za antigen specifična protitelesa, je odvisna od dejstva, da še pred prepoznavo antigena v telesu organizma nastajajo naivni limfociti B, ki imajo na svoji površini B celične receptorje (BCR) za specifične antigene. Le majhen del takih limfocitov dobi možnost, da bo z receptorjem specifično prepoznal antigen tekom življenja. Ko se to zgodi, se limfociti B aktivirajo in se prične klonalna ekspanzija v zrele plazmatke, ki producirajo specifična protitelesa in jih izločajo v okolico. Po srečanju z antigenom se najprej začne tvorba protiteles razreda M (IgM), nakar plazmatke potujejo v germinativne centre v sekundarnih limfatičnih organih, kjer se pod vplivom prej naštetih citokinov CD4⁺ limfocitov prične produkcija ostalih razredov specifičnih protiteles, brez zamenjave antigenske specifičnosti. To je rezultat rekombinacije limfocitne DNA, kar opredeljuje angleški pojem *class switch recombination*, v prevodu zamenjava imunoglobulinskega razreda (Max in Fugmann, 2012). Del plazmatk se na določeni točki

diferenciacije ustavi v razvoju in kasneje služijo kot spominske celice. V organizmu posameznika vztrajajo tudi do več let (McHeyzer-Williams, 2012).

Protitelesa izločajo plazmatke, ki nastanejo iz limfocitov B po prepoznavanju specifičnega antigena in njihove aktivacije. Pri prašičih PRRSV specifične plazmatke najdemo v sekundarnih limfatičnih organih, kot so vranica, tonzile, sternalne in ingvinalne bezgavke, nadalje pa v submukozi, še posebno v najbolj prizadetih organih, na primer v submukozi spodnjega respiratornega trakta in v endometriju (Mulupuri in sod., 2008).

Mulupuri in sod. (2008) poročajo, da se prva specifična IgM v krvi pojavijo že 3 DPI, vrh dosežejo 7 DPI, nakar njihov nivo upada do 21 DPI, ko je v krvi zaznaven le še nizek nivo. Antigeni, proti katerim so uperjeni specifični IgM, predstavljajo nsp PRRSV, medtem ko notranja domena GP-5 ni imunogena, zunanja domena GP-5 povzroči zakasnen odziv s specifičnimi IgM z vrhom od 21 do 28 DPI. Ta protitelesa v krvi vztrajajo več kot 50 DPI.

Prva protitelesa razreda G se v krvi pojavijo med 7 DPI in 9 DPI (Loving in sod., 2015), oziroma 10 DPI (Xing in sod., 2017), a nimajo sposobnosti nevtralizacije PRRSV. Specifična nevtralizacijska protitelesa razreda G (NAb) se pojavijo šele od 28 DPI dalje (Loving in sod., 2015). NAb zagotavljajo določeno stopnjo zaščite proti virusu, a lahko viremija izzveni tudi, če se NAb ne pojavijo (Lunney in sod., 2016), kar kaže na kompleksnost imunskega odziva na PRRSV in velik pomen specifičnih protiteles z drugimi efektorskimi mehanizmi ter na vlogo drugih nespecifičnih mehanizmov imunosti. S transfuzijami prečiščenega prašičjega seruma z visokimi koncentracijami PRRSV specifičnih NAb je bilo mogoče pred okužbo s homolognim PRRSV obvarovati tako svinjo kot njene pujske, za kar je bil potreben visok titer NAb, vsaj 1:8. Pri titru 1:32 se je viremija pojavila pri približno 50 % odstavljenih pujskov. V poskusu je aplikacija specifičnih NAb sicer preprečila viremijo in klinično obliko bolezni, še vedno pa se je virus zadrževal v tonzilah, pljučih ter bezgavkah. Poleg tega so bili prašiči sposobni prenosa PRRSV enako kot kontrolne živali, ki odmerka PRRSV specifičnih NAb niso prejele (Osorio in sod., 2002; Lopez in sod., 2007).

Možnih razlag za pozen pojav specifičnih NAb v primerjavi z ostalimi protitelesi je več. Ansari in sod. (2006) kot razlog navajajo N-glikozilacijo ak N34, N44 in N51 na zunanji domeni membranskega GP5, ki je glavni epitop za sintezo NAb. Ostrowski in sod. (2002) so ugotovili, da sta na GP5 prisotna 2 glavna epitopa, A in B. Epitop A je imunodominantni in hipervariabilen, t. i. *decoy*-epitope, ki močno spodbuja produkcijo protiteles, vendar ne tistih z nevtralizacijskimi lastnostmi. V povezavi s protitelesi povezano pospeševanje okužbe (*antibody-dependent enhancement of viral entry*, ADE) – v tem primeru biološko neučinkovita protitelesa povzročijo, da z njimi opsoniziran virus vstopi v makrofage, ki ga pa po prevzemu ne morejo uničiti z intracelularnim načinom ubijanja (Cancel-Tirado in sod., 2004). Ob vsem imajo pri nastanku protitelesne imunosti vlogo še citokini, ki tvorijo potrebno citokinsko okolje, ki predstavlja most med nespecifično in specifično imunostjo. V primeru okužbe z PRRSV je

izločanje zmanjšano (Sang in sod., 2011; Li in sod., 2017a) in pojavljajo se abnormalni, neučinkoviti limfociti B (Butler in sod., 2014).

2.5.4 Trajanje imunosti

Povprečna razpolovna doba IgG v serumu je od 21 do 24 dni (Schroeder in sod., 2013). Trajanje protitelesne zaščite je odvisna od t. i. dolgoživih plazmatk, ki se pri človeku nahajajo v kostnem mozgu (Radbruch in sod., 2006). Teh celic pri prašičih v kostnem mozgu ni bilo mogoče dokazati, vendar se verjetno nahajajo drugje (Mulupuri in sod., 2008). Mulupuri in sod. (2008) so plazmatke dokazali v sekundarnih limfatičnih organih 120 DPI, vendar ni popolnoma razjasnjeno, ali je njihova prisotnost posledica konstantnega stimulusa persistentnega PRRSV. Po nekaterih raziskavah specifično protitelesno imunost dokažemo do 300 DPI (Nielsen in Bøtner, 1997; Drew, 2000; Mateu in Diaz, 2008). Lager in sod. (1996) so preverjali homologno zaščito pri plemenskih svinjah okuženih na 90. dan brejosti in ugotovili, da so bile nekatere zaščitene še 604 DPI.

2.5.5 Navzkrižna zaščita med heterolognimi sevi PRRSV

Das in sod. (2010) poročajo, da je tarča za nevtralizacijo PRRSV kompleks membranskih proteinov GP2-GP3-GP4 z enim ali več epitopi, kar pojasnjuje heterologno zaščito med virusnimi genotipi in podtipi oziroma sevi ter različno stopnjo zaščite proti njim. Terenske raziskave heterologne zaščite pri prašičih kažejo na boljši prirast živali, ki imajo določeno stopnjo zaščite proti virusu kot nobene. Raziskave preizkušajo učinek komercialnih cepiv MLV PRRSV-2, uporabljenih na prašičih okuženih s tipom PRRSV-1 (Mengeling in sod., 2003; Opriessnig in sod., 2005) ali učinek cepiva proti visoko patogenim sevom (Wei in sod., 2013). Mengeling in sod. (2003) so preverjali stopnjo zaščite pri okužbi s heterolognim sevom po uporabi heterolognega monovalantnega in polivalentnega MLV cepiva z določanjem specifičnih protiteles v serumu in ocenjevanjem patoloških sprememb 28 DPI. Pri obeh cepivih je prišlo do serokonverzije ne glede na heterolognost poskusnega seva, vendar je pri polivalentnem cepivu prišlo še do nepredvidenih bolezenskih sprememb pri neokuženi kontrolni skupini, zato je varnost slednjega cepiva vprašljiva. Opriessnig in sod. (2005) so za kontrolo uspešnosti cepljenja uporabili 76–89 % homologen sev virusa in ugotovili, da se pri cepljeni skupini izboljšajo klinična slika ($p < 0,05$), dnevni prirast ($p < 0,001$) in količina patohistološko zaznanih sprememb v bezgavkah in pljučih ($p < 0,001$). Pri raziskavi Wei in sod. (2013) je visoko patogeni sev pri od 17 do 19 dni starih prašičih povzročal 63-odstotno smrtnost, medtem ko v cepljeni skupini ni poginil noben prašič. Pri obeh je PRRS sicer potekal v hudi akutni obliki s telesno temperaturo nad 41 °C.

Robinson in sod. (2015 in 2018) so v dveh terenskih raziskavah dokazali, da z aplikacijo velikih količin PRRSV specifičnih NAb lahko dosežemo določeno stopnjo heterologne zaščite proti različnim sevom PRRSV. Pri približno 50 % naravno okuženih svinj na terenu je bilo mogoče z uporabo *in-vitro* testa s spremljanjem aktivnosti okuženih makrofagov dokazati dovoljšne titre PRRSV specifičnih NAb za inaktivacijo farmskega seva virusa. Navzkrižna zaščita je značilna tudi med PRRSV-1 in -2, kar so z aplikacijo prečiščenih 242 mg PRRS

specifičnih NAb klinično okuženim 3 tednov starim pujskom preučevali Robinson in sod. (2018). Primerjava med poskusno in kontrolno skupino poskusno okuženih pujskov s PRRSV-1 in -2 *in vivo* glede na stopnjo viremije je pokazala 96-odstotno zmanjšanje količine PRRSV-2 in 87-odstotno zmanjšanje pri PRRSV-1.

2.5.6 Kolostralna imunost

Nivo kolostralnih protiteles pri pujskih je sorazmerno povezan nivojem PRRSV specifičnih NAb pri njihovih materah ali mačehah (Chung in sod., 1997). Kolostralna imunost proti PRRSV je kratkotrajna. Kolostralna protitelesa pri pujskih vztrajajo od 3 do 8 tednov po praritvi (Houben in sod., 1995; Chung in sod., 1997; Murthaugh in sod., 2002). Polo in sod. (2012) navajajo, da je povprečna razpolovna življenjska doba specifičnega kolostralnega protitelesa proti PRRSV približno 9 dni. Pri 3 tedne starih pujskih, cepljenih z MLV cepivom proti PRRSV-1, je prisotnost specifičnih kolostralnih NAb povzročila zapoznel protitelesni in celični imunski odziv. Pri pujskih s specifičnimi kolostralnimi NAb so se cepna protitelesa pojavila šele 14. teden po okužbi, pri naivnih pa 4. teden. Prav tako je bila pri prvih znatno manjša količina IFN- γ . Mehanizem tega pojava ni bil pojasnjen (Fablet in sod., 2016).

2.5.7 Imunosupresivno delovanje virusa in sekundarne ter sočasne okužbe

2.5.7.1 Imunosupresija

Za PRRSV je značilno, da sta nespecifični in specifični imunski odziv zakasnela in sprva šibka (Albina in sod., 1998; Van Reeth in sod., 1999; Renukaradhya in sod., 2010). Da se po okužbi s PRRSV v organizmu zmanjša nivo citokinov, ki nadzorujejo nespecifično odpornost, hkrati pa podaljša tudi čas aktivacije specifične obrambe, so dokazali Van Reeth in sod. (1999). Ravno nasprotno je pri večini drugih virusnih okužb, na primer s PI in s prašičjim respiratornim koronavirusom (angl. *porcine respiratory coronavirus*; PRCV). Zmanjšanje količine citokinov je večje pri bolj patogenih sevih PRRSV (Van Reeth in sod., 1999).

Renukaradhya in sod. (2010) so pri od 16 do 20 dni starih pujskih, intranazalno in intramuskularno okuženih s 3×10^4 TCID₅₀ oziroma z 2×10^4 TCID₅₀ PRRSV, zabeležili znaten upad citotoksičnega delovanja celic NK, odgovornih za nespecifičen imunski odziv. Supresija celic NK se prične 2 DPI (Dwivedi in sod., 2012) in traja od 3 do 4 tedne (Renukaradhya in sod., 2010). Zmanjšano efektorsko delovanje celic NK dokazano povzročajo tudi živa oslabljena cepiva ob intramuskularni ali intranazalni aplikaciji (Albina in sod., 1998; Renukaradhya in sod., 2010; Dwivedi in sod., 2011). Redukcija citotoksične aktivnosti celic NK ni neposredno povezana zgolj s številom teh celic; kljub temu da se raven celic NK normalizira približno 14 DPI, je njihovo citotoksično delovanje še vedno oslABLJENO (Renukaradhya in sod., 2010; Dwivedi in sod., 2011). Pri spremljanju citokinske ekspresije na celičnih kulturah prašičjih alveolarnih makrofagov (PAM) *in vitro* je visoko patogeni PRRSV-2 v kombinaciji z *G. parasuis* povzročil povečano ekspresijo in izločanje IL-1 β , IL-18, IL-6 in TNF- α (Li in sod., 2017b). Gómez-Laguna in sod. (2013) so pri eksperimentalni inokulaciji 3 tednov starih pujskov z nizko patogenim sevom ugotovili, da se je povečala

apoptoza alveolarnih makrofagov, še večja pa je bila deplecija limfocitov B in T v bezgavkah in priželjcu od 7 do 21 DPI, posledično sta bila zavrti tako celični kot protitelesni imunski odziv.

2.5.7.2 Sekundarne/sočasne okužbe s PRRSV in drugimi patogenimi mikrobi

Zaradi imunosupresivnega delovanja se poveča pojavnost sekundarnih in priložnostnih okužb, kar otežuje klinični potek bolezni in povzroča pogostejši kronični potek obolenj (Lunney in sod., 2016). Dokazano je, da PRRSV v interakciji z nekaterimi drugimi patogenimi mikrobi, kot so PRCV, virus PI in bakterija *G. parasuis*, izzove drugačen imunski odziv kot pri delovanju le enega samega mikroorganizma (Van Reeth in sod., 1996; Solano in sod., 1997). Pri sočasni okužbi s PRRSV in PI je bil zmanjšan prirast za 4,6 %, pri okužbi samo s PI pa 1,8 % (Drew, 2000). V primeru sočasne okužbe s PRRSV in *G. parasuis* se je značilno povečalo skupno število bakterijskih kolonij, izoliranih iz krvi (angl. *colony forming unit*; CFU) ($1,5 \times 10^5$ CFU), srca (2×10^5 CFU) in pljuč (6×10^5 CFU). Ob tem je v pljučih močno naraslo število potencialno patogenih bakterij *Mycoplasma hyorhinis*, *G. parasuis* in *E. coli*. (Li in sod., 2017b). V prašičjem kompleksu respiratornih bolezni (angl. *porcine respiratory disease complex*; PRDC) je med vsemi patogenimi etiološkimi agensi najpogosteje zastopan PRRSV (Brockmeier in sod., 2002; Lunney in sod., 2016). Pri prašičih, eksperimentalno okuženih s PRRSV in bakterijo *Mycoplasma hyopneumoniae*, so klinična znamenja intersticijske pljučnice izrazitejša in njeno trajanje daljše (Thacker in sod., 1999); Pri okužbah z virusom PRRS je imelo makroskopske in mikroskopskih bolezenske spremembe 10 DPI 36,5 % živali, medtem ko je bil pri hkratni okužbi z virusom PRRS in z *M. hyopneumoniae* ta delež 43 % (Thanawongnuwech in sod., 2004). Klinični potek bolezni je pri sočasni okužbi z bakterijo *Bordetella bronchiseptica* težji (Brockmeier in sod., 2000). Pri sočasni okužbi z visoko patogenim PRRSV in bakterijo *Streptococcus suis* serotip 7 je bil klinični potek pljučnice hujši pri prašičih sočasno okuženih z obema povzročiteljema. Meningitisi, kot posledice okužbe *S. suis*, so se pojavljali izključno ob sočasni okužbi s PRRSV. Povzročitelja tako en drugemu vzajemno povečujeta virulenco (Xi in sod., 2010). V tem primeru je patogeno delovanje odvisno tudi od primarnih citokinskih mehanizmov, saj okužbe z bakterijami ali virusi sprožijo različen tip citokinskega odziva glede na delovanje različnih limfocitov T. Pri virusih se večinoma odzovejo limfociti Th1, pri bakterijah pa limfociti Th2. Ta dva osnovna citokinska tipa sta si med seboj deloma antagonistična, kar pomeni, da je na račun enega tipa podhranjen drugi. Gre za t. i. polarizacijo (Didierlaurent in sod., 2007). Pri endemičnem poteku PRRS so pogostejša obolenja povezana s cirkovirusnimi okužbami (angl. *porcine circovirus associated diseases*; PCVAD) (Fenner in sod., 2017). Sočasna okužba s PRRSV in PCV-2 se kaže z izrazitejšimi kliničnimi znamenji in patohistološkimi spremembami na pljučih v primerjavi s posamičnimi okužbami (Allan in sod., 2000).

2.6 DIAGNOSTIKA

2.6.1 Sum na bolezen

Na okužbo s PRRSV lahko posumimo na podlagi kliničnih znamenj, ko se v reji prašičev pojavijo reprodukcijske ali respiratorne motnje, povišan pogin zlasti v vzreji in v kombinaciji z anamnestičnimi podatki ter z analizo proizvodnih rezultatov in porastom endemičnih bolezni v reji (Zimmerman in sod., 2019). Pri nekaterih visoko patogenih sevih pa se poleg že omenjenih pojavijo tudi nevrološke težave (Tian in sod., 2007; Cao in sod., 2012).

Analiza proizvodnih parametrov v rejah z akutnim ali endemičnim PRRS pokaže povečano število abortusov, posebej v zadnji tretjini brejosti (več kot 80 dni po pripustu/osemenitvi), več je prezgodnjih prasitev, mrtvorojenih pujskov, pojavlja pa se tudi povečana smrtnost pujskov pred odstavitvijo ter podaljša servisna perioda pri plemenskih svinjah. Odsotnost kliničnih znamenj ne pomeni nujno, da je reja prosta PRRSV (Ladinig in sod., 2014; Drigo in sod., 2018; Zimmerman in sod., 2019). Na PRRS lahko nakazuje tudi porast sekundarnih virusnih in bakterijskih obolenj ter parazitov (Drew, 2000; Brockmeier in sod., 2002; Lunney in sod., 2016; Li in sod., 2017b, Thanawongnuwech in sod., 2004). Ker klinična znamenja pri PRRS niso patognomonična, lahko na podlagi anamneze in kliničnih opažanj na bolezen zgolj posumimo. Za dokončno diagnozo moramo PRRSV potrditi z laboratorijskimi preiskavami (Batista, 2005).

2.6.2 Diferencialna diagnostika

Diferencialno diagnostično se s podobnimi kliničnimi znamenji ali posledicami v proizvodnih podatkih kaže mnogo različnih bolezni. Pri opredelitvi nabora možnih povzročiteljev je potrebno upoštevati klinična znamenja pri različnih kategorijah prašičev in geografsko epidemiološko situacijo v ožji in širši regiji. V kategorijo bolezni, ki se lahko v določeni fazi kažejo podobno kot PRRS, so afriška prašičja kuga, klasična prašičja kuga, bolezen Aujeszkega, enzooska pljučnica, Glässerjeva bolezen, virusni encefalomyelitis, leptospiroza, virusni Nipah encefalitis, bolezen povezane s cirkovirusnimi okužbami, enterovirusni polioencefalomyelitis, parvoviroza, prašičji respiratorni koronavirus, aktinobacilarna plevropnevmonija, salmoneloza, PI ter virusna sincicijska pljučnica in miokarditis (Zimmerman in sod., 2019).

2.6.3 Vzorci za laboratorijsko diagnostiko PRRSV

2.6.3.1 Vzorci za dokaz RNA PRRSV ali njegovih antigenov

Za laboratorijsko diagnostiko PRRSV lahko uporabljamo serum ali kri, bronhoalveolarni izpirek, seme, individualne ali skupinske vzorce OF ter procesno tekočino, tj. izcedek iz tkiv mod in repov, ki jih odrežemo pri kastraciji oziroma kupiranju repov pri pujskih, ter vsaj 5 cm dolge vzorce popkovine novorojenih pujskov (Zimmerman in sod., 2019). Pri poginjenih ali usmrčenih oziroma zaklanih prašičih lahko uporabljamo tudi vzorce pljuč, tonzil in bezgavk (Bloemraad in sod., 1994; Kittawornrat in sod., 2010; Prickett in Zimmerman, 2010; Olsen in

sod., 2013b; Decorte in sod., 2015; Fablet in sod., 2017; Trevisan in sod., 2019). V skupinskih vzorcih blata RNA PRRSV ni mogoče potrditi z dovolj veliko verjetnostjo, zato se uporaba blata za dokaz RNA PRRSV odsvetuje (Plut in sod., 2020). V popkovini je mogoče RNA PRRSV dokazati z večjo verjetnostjo kot v krvi. V raziskavi, ki so jo izvedli Martín-Valls in sod. (2018), je bilo od preiskanih 387 individualnih vzorcev z metodo verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl. *reverse transcription polymerase chain reaction*; RT-PCR) mogoče virus v popkovini dokazati 76-krat, v krvi pa 55-krat, pri obeh s stopnjo zanesljivosti 95 %. Kot vzorec lahko uporabimo tudi abortirane plodove ali mrtvorrojene pujske ter nekatere njihove notranje organe, najpogosteje priželjc in pljuča (Zimmerman in sod., 2019).

2.6.3.2 Vzorci za dokaz protiteles proti virusu PRRS

Z encimsko imunskim testom (ELISA) najpogosteje določamo specifična protitelesa v vzorcih seruma, njihovo določanje pa je mogoče tudi v vzorcih OF ali v mesnem soku (Bloemraad in sod., 1994; Kittawornrat in sod., 2010; Prickett in Zimmerman, 2010; Olsen in sod., 2013b; Decorte in sod., 2015; Fablet in sod., 2017; Trevisan in sod., 2019).

2.6.3.3 Metodologija določanja velikosti vzorca

Za računanje velikosti vzorca imamo na voljo kopico računalniških programov in aplikacij, ki nam lahko glede na osnovne podatke o reji in določeni bolezni določijo število živali iz določene populacije, ki jim moramo odvzeti vzorce. Hkrati ti programi omogočajo tudi naključnost izbire živali. Pri določanju velikosti pa je še vedno nujno oceniti prevalenco bolezni v reji, za kar moramo poznati značilnosti okužb v različnih faza obolenja. Na velikih gospodarstvih je zaradi števila živali in visokih stroškov ter obsega dela nemogoče odvzeti vzorec vsakemu prašiču (Collins in sod., 1996; Frössling in sod., 2009; Holtkamp in sod., 2010; Lebert in sod., 2019). Cannon in Roe (1982) sta na podlagi statističnega izračuna ocenila, kako velik mora biti vzorec, da lahko dokažemo bolezen na podlagi 5-, 10- in 20-odstotne prevalence. Zanesljivost tako načrtovanega vzorčenja je odvisna od ocene prevalence, ki temelji na kliničnem opazovanju ali na analizi rezultatov predhodnih raziskav za opazovani parameter.

Za laboratorijsko diagnostiko lahko uporabljamo individualne ali skupinske vzorce, pri čemer je najlažje odvzeti skupinski vzorec OF. Združevanje dveh ali več individualnih vzorcev (angl. *pooling*) lahko znatno zniža stroške zaradi manjšega števila preiskav, a lahko zaradi nižje meje detekcije poraste delež lažno negativnih rezultatov (Zimmerman in sod., 2019). Gerber in sod. (2013) so v terenski raziskavi sicer dokazali, da lahko pri detekciji RNA PRRSV z veliko zanesljivostjo dokažemo RNA PRRSV z združevanjem do 5 individualnih vzorcev seruma, pri čemer je lahko le v enem od petih zmerno velika količina kužnine, kar pomeni manj od 30 ciklov z metodo PCR v realnem času. Zimmerman in sod. (2019) navajajo, da združevanje skupinskih vzorcev, na primer OF ali procesnih tekočin, ni priporočljivo zaradi slabše zanesljivosti; Lebert in sod. (2019) so v svoji raziskavi primerjali vpliv združevanja 5 individualnih serumov ter 5 skupinskih vzorcev OF (združevali so po 5

skupinskih vzorcev OF iz boksov, kjer je bilo nameščenih 50 ali več odstavljenecv, starih 28 dni) in z metodo RT-PCR v realnem času uspeli ugotoviti prisotnost RNA PRRSV v 67 % individualnih vzorcev seruma, oziroma v 58 % od celotnega gnezda pujskov. Vrednost Ct v združenih vzorcih OF (število ciklov pomnoževanja izoliranega dela nukleinske kisline, po katerem se število kopij eksponentno povečuje, angl. *cycle threshold*; Ct), ko je bila ugotovljena prisotnost RNA PRRSV z metodo RT-PCR v realnem času, ni bila v nobenem primeru pod 31,6. Phoo-ngurn in sod. (2019) so izračunali in številsko predstavili novo matriko, ki temelji na oceni reproduktivne sposobnosti virusa (R_0), ki s pomočjo pridobljenega števila določi optimalno strategijo cepljenja in potrebno število preiskanih vzorcev za kontrolo, kot rezultat pa predstavi model širjenja bolezni v čredi. Z uporabo vse dostopnejših računalniških programov in aplikacij lahko veterinarji danes preprosto dostopamo tudi do zahtevnejših matematičnih podatkov, na podlagi katerih lahko določimo količino in način vzorčenja s poznavanjem osnovnih informacij o reji, kot so velikost črede, pričakovana prevalenca, občutljivost diagnostične metode, želeni interval zaupanja. Na podlagi matematičnega modela lahko sklepamo tudi o možnosti prenosa PRRSV med različnimi rejami glede na sestavo črede in časovno prilagodimo postopek vzorčenja. Pri tem se ob izdelavi načrta upošteva čim več faktorjev, ki vplivajo na prenos virusa, kot so velikost črede, predhodna detekcija virusa, število klinično opaženih izbruhov in časovni interval med njimi, idr. Čim več dostopnih podatkov lahko predvidi več različnih scenarijev širjenja virusa, ob izdelavi načrta pa so upoštevani tudi stroški izvedbe načrta (Alba in sod., 2017).

2.6.3.4 Transport vzorcev krvi in ustne tekočine do laboratorija in pogoji shranjevanja

Po odvzemu vzorce prenesemo v sterilno embalažo za transport do laboratorija. Za odvzem krvi in transport krvi uporabljamo sterilne epruvete z ali brez dodatka sredstva za pospeševanje koagulacije, za transport OF pa sterilno plastično embalažo z navojem, ki omogočajo tesno zapiranje. Zaradi nestabilnosti virusa se morajo vzorci med transportom do laboratorija hraniti pri temperaturi 4 °C in se odpošljejo takoj ali čimprej, vsekakor pa tako, da v laboratorij dospejo najkasneje v roku 24 ur. Če to ni mogoče, je potrebno vzorce zamrzniti na manj kot -18 °C (Benfield in sod., 1992; Jacobs in sod., 2010). Spagnuolo-Weaver in sod. (1998) poročajo, da so za hranjenje in transport vzorcev primerni tudi filtrirni diski oziroma papir (angl. *dried-blood filter paper*), ki vsebuje kemikalije, ki lizirajo celične komponente in ohranjajo DNA ali RNA za nadaljnje molekularne preiskave. Na ta način lahko odzamemo in shranimo do 125 µl seruma, krvi, OF ali katerekoli druge tekočine za nadaljnjo diagnostično preiskavo brez zamrzovanja ali hlajenja. Avtorji poročajo o 94-odstotnem ujemanju v detekciji v primerjavi s serumom, transportiranjem po obeh metodah, v prid transporta v epruveti na 4 °C (Spagnuolo-Weaver in sod. 1998). Yoon in sod. (2010) so uporabo filter papirja primerjali z referenčno odvzeto krvjo z venopunkcijo na 240 preiskanih vzorcih in ugotovili 99,5-odstotno specifičnost in 93,8-odstotno občutljivost pri detekciji RNA PRRSV s filter papirjem pri transportu na 4 °C in zamrzovanju na -80 °C. Kljub nekoliko manjši zanesljivosti je tak način hranjenja in transporta zelo primeren za razmere z omejenimi hladilnimi kapacitetami in razpoložljivimi finančnimi sredstvi.

2.6.4 Dokaz virusa in virusnih antigenov

Za izolacijo PRRSV se največkrat uporablja različne celične kulture ali celične linije, vendar je to težavno in zamudno, zato se v laboratorijski diagnostiki kliničnih primerov ne uporablja (OIE, 2018). Izolacija PRRSV na dovzetnih celicah je neposredni dokaz okužbe sposobnih virionov. Za vizualizacijo kompleksa specifično protitelo-virusni antigen v citoplazmi okuženih celic se uporabljata imunohistokemični metodi, imunofluorescenca (IF) ali imunoperoksidazna reakcija (IP), lahko pa tudi neposredna vizualizacija z elektronsko mikroskopijo (EM) (Zimmerman in sod., 2019).

2.6.4.1 Rast PRRSV na celičnih kulturah in celičnih linijah

PRRSV lahko izoliramo na celicah PAM ali ledvičnih celičnih linijah opic vrste *Rhesus macaque* MA-104 in njenih podtipih CL-2621 in MARC-145 (Benfield in sod., 1992; Kim in sod., 1993). Virus povzroča citopatski efekt (CPE) na celicah PAM v približno 50 % primerov. Tudi če CPE ni prisoten, lahko celice odreagirajo pozitivno z IF (Bautista in sod., 1993). Različni sevi virusa se razlikujejo glede uspešnosti izolacije na PAM ali različnih celičnih linijah, zato je priporočljivo hkrati uporabiti oba tipa celic. Prav tako moramo pred vsako izolacijo preveriti vitalnost celic in dovzetnost za okužbo (Bautista in sod., 1993). Večina sevov PRRSV-1 za razliko od PRRSV-2 nima sposobnosti okužbe in rasti na celični liniji MA-104 in njenih podtipih, zato lahko viruse genotipa 1 izoliramo le na PAM (García-Nicolás in sod., 2014).

Za izolacijo PRRSV so na voljo tudi celične linije, ZMAC-1, ATCC® PTA-8764 (Calzada-Nova in sod., 2012). Med nesmrtnimi celičnimi linijami je na voljo tudi linija PAM z ekspresijo receptorja CD163, celice mieloidne linije nezrelih monocitov, prašičje ledvične celice z ekspresijo receptorjev CD163 in CD169 ter ledvične celice mačke in hrčkov z ekspresijo CD163 (Delrue in sod., 2010; Provost in sod., 2012).

2.6.4.2 Dokaz virusnih antigenov z uporabo konjugiranih protiteles

Za neposreden dokaz PRRSV nukleokapsidnega proteina N v citoplazmi celičnih kultur ali za dokaz PRRSV neposredno iz vzorcev, odvzetih iz organov poginulih ali žrtvovanih prašičev, uporabljamo IF ali IP. Pri detekciji virusnih antigenov ima zaradi lažje izdelave konjugata (označena monoklonska protitelesa) in manjših stroškov laboratorijske opreme metoda IP prednost pred IF (Zimmerman in sod., 2019).

V primeru izvajanja IF ali IP neposredno na vzorcih tkiva moramo v roku 48 ur po odvzemu izvesti fiksacijo v 10-odstotnem formalinu, kjer nato s primernim konjugatom dokazujemo prisotnost virusnega proteina N (Van Alstine in sod., 2002).

De Abin in sod. (2009) poročajo, da je izolacija PRRSV-2 uspešnejša na celicah PAM kot na MA-104. Pri nasajanju 50 terenskih vzorcev seruma je bilo mogoče na PAM z metodo IF virus dokazati v 70 % primerov, na MA-104 pa le v enem izmed 50 vzorcev. Količina kopij

virusne RNA, ugotovljene z metodo RT-PCR v realnem času, je bila na PAM slabša ($C_t = 36-39$) v primerjavi z MA-104 ($C_t = 18-20$).

2.6.4.3 Elektronska mikroskopija

Z elektronsko mikroskopijo je bil PRRSV prvič dokazan leta 1992 (Benfield in sod., 1992). Kljub zelo velikim genetskim razlikam med genotipi in podtipi PRRSV morfološke razlike med njimi z elektronsko mikroskopijo niso opazne (Pol in sod., 1997). Zaradi zelo slabe občutljivosti metode in drage tehnologije se metoda uporablja za vizualizacijo in morfološke raziskave virionov le v eksperimentalne namene (MacLachlan in Dubovi, 2017).

2.6.5 Molekularne metode dokazovanja PRRSV

Virusno RNA dokazujemo z metodami PCR, z *in-situ* hibridizacijo in z metodo LAMP (angl. *loop-mediated isothermal amplification*). Prva je danes široko komercialno dostopna v različnih izvedbah in je daleč najbolj uporabna za posredno ugotavljanje prisotnosti PRRSV v diagnostične namene (Zimmerman in sod., 2019). Z *in-situ* hibridizacijo lahko z uporabo specifičnih in označenih oligonukleotidnih sond razlikujemo med PRRSV-1 in -2 neposredno na fiksiranih tkivnih rezinah (Larochelle in sod., 1996). Metoda LAMP je podobna PCR in temelji na podaljševanju novonastale verige in detekciji specifičnega dela virusne RNA. Ima slabšo občutljivost, a ker podaljševanje poteka pri konstantni temperaturi, je primerna za laboratorije z omejenimi finančnimi in tehničnimi sredstvi (Chen in sod., 2008; Rovira in sod., 2009).

Metoda PCR je danes temelj za laboratorijsko potrditev klinične diagnoze oziroma ugotavljanja prisotnosti nukleinskih kislin patogenih mikrobov v vzorcih. Poleg prisotnosti nukleinske kisline nadalje ugotavljamo tudi nekatere njihove značilne lastnosti, na primer prisotnost genov, ki vplivajo na virulenco ali genov za rezistenco mikroba (Aygan, 2006; Innis in Gelfand, 1990). Glavna omejitev metode PCR v smislu občutljivosti je inhibicija reakcije zaradi prisotnosti različnih zaviralnih substanc v kliničnih vzorcih. Da se omenjeni inhibični vpliv čim bolj zmanjša, se pred izvedbo PCR uporablja različne postopke obdelave vzorcev in osamitve nukleinske kisline (Aygan, 2006).

2.6.5.1 Osamitev RNA PRRSV

Za izvedbo reakcije PCR moramo predhodno osamiti (izolirati, ekstrahirati) nukleinsko kislino patogenega mikroba. To lahko storimo na različne načine, postopek osamitve pa moramo prilagoditi morfološkim značilnostim iskanega mikroba. Skupna značilnost vsem metodam osamitve nukleinske kisline iz mikrobov je prekinitev kontinuitete celične membrane ali virusne ovojnice in/ali nukleokapside, čemur sledi ločevanje genetskega materiala od ostalih komponent, kot so beljakovine, lipidi in ogljikovi hidrati (Aygan, 2006).

Najpreprostejša metoda za razgradnjo nukleokapside je liza (razgradnja). Zanj obstaja vrsta načinov obdelave vzorcev: vrenje v destilirani vodi ali puferirani raztopini, obdelava z detergenti z ali brez toplotne obdelave (Sritharan in Barker, 1991), z natrijevim hidroksidom s

toplotno obdelavo (Brisson-Noel in sod., 1991), z zamrzovanjem in odmrzovanjem (Buck in sod., 1992), z uporabo SDS-proteinaze K (Kwok in sod., 1987) ali perklorove kisline (Sritharan in Barker, 1991), z encimatsko obdelavo (Eisenach in sod., 1991), sonikacijo (Buck in sod., 1992) in dovajanjem toplote (Lebech in Hansen, 1992). Ker je virusna RNA zelo občutljiva za razgradnjo pri nihanju pH, se v procesu osamitve nadalje uporablja različne pufre, ki preprečujejo spremembe pH v okolju. Pri osamitvi se vedno uporablja prečiščena destilirana voda, ki ne vsebuje encimov za razgradnjo RNA in mikroorganizmov, ki bi lahko kontaminirali vzorec. Reagenti za osamitev vsebujejo še proteinske inhibitorje, ki hidrolizirajo proteine in detergente, ki topijo membranske proteine (Tsai JC in sod., 2011). Za osamitev nukleinske kisline imamo na voljo precejšnje število komercialno dostopnih kompletov reagentov. Najpogosteje komercialni kompleti delujejo na sistemu membran *silica-gel* ali filtrov s steklenimi vlakni v kolonah ter magnetnih delcev. Ti specifično vežejo nukleinske kisline, v postopku pa se odstranijo kontaminanti in inhibitorji reakcije PCR (Fahle in Fischer, 2000; Smith in sod., 2003; van der Zee in sod., 2002; Yoza in sod., 2003). Postopek osamitve nukleinske kisline je mogoče tudi avtomatizirati (Saiyed in sod., 2003; Yoza in sod., 2003).

2.6.5.2 Metoda verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo

Za detekcijo RNA PRRSV uporabljamo metodo RT-PCR oziroma njene modifikacije (OIE, 2018). Osnovna modifikacija, ki omogoča zaznavanje dela genoma RNA virusov, je predhodna reverzna transkripcija, pri kateri z encimom reverzne transkriptaze RNA prepisemo v DNA, čemur sledi izvedba PCR (Rio, 2014). Poznamo tudi druge modifikacije osnovne metode; pri diagnostiki PRRSV se najpogosteje uporabljajo ugnezdeni (angl. *nested*) RT-PCR in RT-PCR v realnem času ter »hkratno« (angl. *multiplex*) RT-PCR, s katero lahko zaznavamo RNA več povzročiteljev ali različnih sevov istega povzročitelja naenkrat. Metodo PCR za detekcijo RNA PRRSV odlikuje visoka specifičnost in občutljivost v primerjavi z izolacijo virusa na celični kulturi ali dokazom antigenov, za izvedbo RT-PCR je potreben je relativno krajši čas. Za diagnostiko PRRSV se največkrat kot tarča v genomu uporablja regija ORF 7, ki je najbolj ohranjena. Lahko se uporablja tudi katero drugo regijo genoma ali pa več regij hkrati (Toplak, 2015). V praksi se največ uporabljata RT-PCR in RT-PCR v realnem času, ki je tudi kvantitativna metoda s krajšim časom preiskave, zato ima pri dokazovanju prednost. Izbira med obema je odvisna od opremljenosti laboratorija in usposobljenosti osebja (OIE, 2018). Težavo pri detekciji RNA PRRSV predstavlja prisotnost različnih tipov in podtipov virusa, ki vpliva na specifičnost in zanesljivost molekularne diagnostike. Zaradi velike genske variabilnosti PRRSV je treba spremembe znotraj virusnega genoma sprti spremljati in glede na njih ustrezno prilagajati metodologijo za detekcijo RNA (Toplak, 2015). Za izolacijo RNA PRRSV lahko kot tip vzorca v rutinski diagnostiki uporabljamo homogenizirane organe in serum (Kleiboeker in sod., 2005) pa tudi OF (Kittawornrat in sod., 2010). Z metodo ne moremo dokazati, ali je virus sposoben okužbe, prav tako je problematična izolacija infektivnega virusa iz semena merjascev (Christopher-Hennings in sod., 1997). Z večino komercialnih in znotraj laboratorijskih, t. i. *in-house*, protokolov lahko tudi uspešno razlikujemo med PRRSV-1 in -2 (Kleiboeker in sod., 2005; Wernike in sod.,

2012a; Wernike in sod., 2012b). Pri ugnezdenem RT-PCR lahko v diagnostiki PRRSV določamo različne genotipe in podtipe virusa tako, da sprva podaljšujemo določen odsek regije, nato pa dodamo nove oligonukleotidne začetnike za ugotavljanje specifičnih odsekov znotraj te regije (Kono in sod., 1996). Wernike in sod. (2012b) so uspeli razviti *multiplex* RT-PCR v realnem času, kjer lahko uspešno sočasno dokazujemo in razlikujemo seve PRRSV. Za uspešno detekcijo RNA PRRSV s to metodo zadostuje od 200 kopij RNA PRRSV-1 oziroma od 20 kopij RNA PRRSV-2 v mikrolitru vzorca. Poleg razlikovanja obeh genotipov lahko s to metodo zaznavamo tudi HP-PRRSV.

2.6.5.3 Določanje nukleotidnega zaporedja genomov

Sanger in sod. (1977) so razvili metodo za določanja nukleotidnega zaporedja DNA. Temelji na vezavi oligonukleotidnega začetnika z znanim zaporedjem, ki je označen z radioaktivnim izotopom fosforja (^{32}P), s komplementarnim zaporedjem nukleinskih kislin na preiskovani molekuli DNA. V prisotnosti DNA polimeraze nato poteka kataliza polimerizacije z dodanimi deoksinukleozid trifosfati (dNTP). Polimerizacija poteka do inkorporacije terminalnega dNTP, to je dideoksinukleozid trifosfat (ddNTP). Metoda z uporabo encima DNA polimeraze je najpogosteje uporabljena metoda določanja nukleotidnega zaporedja za preiskave genoma. Med različnimi modifikacijami osnovne metode sta najpogosteje uporabljeni t. i. tehniki *shotgun* in *primer walking* sekvenciranje (Griffin in Griffin, 1993). Radioaktivni ^{32}P so kasneje v veliki meri nadomestila fluorescentna barvila (Smith in sod., 1986). Določanje nukleotidnega zaporedja pomnoženega dela nukleinske kisline poteka na podlagi podaljševanja nove verige nukleinske kisline. Pomnožen fragment služi kot matrika za komplementarno verigo, to pa sestavljajo individualno fluorescentno označeni nukleotidi (Harding in Keller, 1992; Shera in sod., 1990).

S tehniko sekvenciranja naslednje generacije (angl., *next generation sequencing*, NGS) so postale vse bolj dostopne tudi raziskave celotnega genoma PRRSV. Zhang in sod. (2017) so uporabili NGS za sekvenciranje virusa PRRS tako iz kliničnih vzorcev kot iz virusnih izolatov na celični kulturi. Z metodo so uspeli istočasno dobiti informacije o nukleotidnem zaporedju določenih odsekov genoma in ugotoviti razliko med preiskovanimi virusnimi sevi. Iz serumskega izolata so uspeli iz kliničnega vzorca dokazati mešano okužbo z dvema različnima sevoma virusa. Celoten genom je bil uspešno sekvenciran iz izolatov z vrednostjo $\text{Ct} \leq 23,6$ (Zhang in sod., 2017).

2.6.6 Serološke metode za dokazovanje prisotnosti specifičnih protiteles proti PRRSV

Specifična protitelesa lahko s komercialno dostopnimi kompleti reagentov določamo v vzorcih seruma in OF (Kittawornrat in sod., 2012a; Kittawornrat in sod., 2012b; Lanhenhorst in sod., 2012; Rotolo in sod., 2018). V rejah s prisotnim PRRSV se na podlagi periodičnega ugotavljanja prisotnosti specifičnih protiteles v razmiku od 2 do 3 tednov ugotavlja serokonverzijo aklimatiziranih živali (OIE, 2018; Zimmerman in sod., 2019). Za dokaz prisotnosti protiteles proti PRRSV se najpogosteje uporabljajo ELISA, indirektni imunoperoksidazni test (IPMA), indirektni imunofluorescenčni test (IFA) in virus

nevtralizacijski test (VNT). Gerber in sod. (2014) ter Langenhorst in sod. (2012) kot uporabnega za določanje protiteles proti PRRSV označujejo tudi test FMIA (angl. *fluorescent microsphere immunoassay*), katerega rezultati so primerljivi ostalim različicam ELISA, a se ga v rutinski laboratorijski diagnostiki ne uporablja.

ELISA ima daleč največjo uporabno vrednost v laboratorijski diagnostiki, saj je standardizirana in jo s primerno opremo ter laboratorijskim znanjem lahko skoraj v celoti avtomatiziramo. Na voljo je širok nabor komercialno dostopnih diagnostičnih kompletov, redne izboljšave testa pa so zanesljivost rezultatov dvignili na nivo ostalih testov (Croft in sod., 2020). Ostale serološke metode se ponašajo z visoko občutljivostjo in specifičnostjo, potrebujejo uporabo laboratorijskih celičnih kultur ali linij za razmnoževanje PRRSV, do rezultata preteče dlje časa in interpretacija je zahtevnejša (Yoon in sod. 1992; Jusa in sod., 1996; Sørensen in sod, 1998; Díaz in sod., 2012; Venteo in sod, 2012). Z nekaterimi serološkimi testi lahko tako razlikujemo med različnima podtipoma PRRSV na podlagi detekcije protiteles. Brownu in sod. (2009) je uspelo ustvariti tudi *in-house* indirektno ELISA, ki na podlagi rekombinantnega nsp7, vezanega na dno mikrotitrne plošče, uspešno razlikuje med specifičnimi protitelesi proti PRRSV-1 in specifičnimi protitelesi proti PRRSV-2. Sørensen in sod. (1998) so na Danskem razvili različico testa, blokirajočo (angl. *blocking*) ELISA, ki je prav tako primerna za razločevanje specifičnih protiteles proti PRRSV-1 in PRRSV-2.

Za detekcijo specifičnih protiteles proti PRRSV imamo na voljo veliko število različnih ELISA, tako komercialnih kot t. i. *in-house* laboratorijskih testov. Večina komercialnih ELISA dokazuje specifična protitelesa proti PRRSV-1 in -2, ne more jih pa razlikovati glede na specifičnost tipa PRRSV. Občutljivost in specifičnost različnih komercialnih testov na trgu se med seboj razlikuje. Biernacka in sod. (2018) so med seboj primerjali 6 različnih komercialnih ELISA: IDEXX PRRS X3 Ab Test (IDEXX, ZDA), Civtest Suis E/S (Hipra, Španija, INgezim PRRS 2.0 (Ingenasa, Španija), VetExpert PRRS Ab ELISA 4.0 (BioNote, Južna Koreja), Pigtype PRRSV Ab (Qiagen, Nemčija) in PrioCHECK PRRSV Antibody ELISA (ThermoFisher, ZDA). Specifičnost vseh testov je znašala od 94,2 % (ThermoFisher, ZDA) do 100 % (IDEXX, ZDA in Hipra, Španija), medtem ko so občutljivost petih proizvajalcev ocenjevali v primerjavi s kompletom reagentov proizvajalca IDEXX in je znašala od 80,3 % (Hipra) do 96,3 % (ThermoFischer). Raziskava je pokazala zanemarljive razlike med ELISA različnih proizvajalcev v serumskih vzorcih iz akutno okuženih čred. Rezultati so močno odstopali v čredah, kjer PRRSV ni bil prisoten, saj so se pojavljali lažno pozitivni rezultati, kot tudi v stabilnih čredah s prisotnim PRRSV. Komercialni testi za dokaz specifičnih protiteles običajno dokazujejo protitelesa proti virusnemu proteinu N, ki se pojavijo zgodaj, a niso NAb, zato njihova prisotnost ni povezana z učinkovito imunsko zaščito (Lopez in Osorio, 2004, Lopez in sod., 2007; Venteo in sod., 2012).

2.7 UKREPI PROTI PRRS

Zaradi negativnih posledic PRRS na zdravstveno stanje prašičev in posledično tudi ekonomskih izgub zaradi poslabšanja proizvodnih parametrov je zoper bolezen nujno potrebno pravočasno ukrepati. Zoper PRRS se ukrepa na različne načine. V vsaki reji z dokazano prisotnostjo PRRSV se načrt ukrepov in cilji pripravijo v skladu z vsemi njihovimi značilnostmi reje. Cilj uvedenih ukrepov proti PRRS je bodisi kontrola bolezni bodisi eradikacija, t. i. izkoreninjenje, ki je odvisno od možnosti izvajanja določenih biovarnostnih ukrepov (Štukelj, 2013).

2.7.1 Kontrola PRRS

Kontrola bolezni je ukrep, katerega cilj je zmanjšanje kliničnih znamenj in z njimi povezanih negativnih učinkov, kot so poslabšanje proizvodnih rezultatov ali povečanje deleža smrtnosti in klinične manifestacija endemičnih bolezni (Morrison, 2012). Kontrola PRRS se izvaja v reji, v kolikor kategorije prašičev niso ločene po prostorih in posledično ni možno izvajati sistema AIAO. Zaradi omenjenega izkoreninjenje ni možno, farma z boleznijo živi na način, da so proizvodni rezultati finančno sprejemljivi in da so akutni izbruhi karseda redki (Dee, 1998; Drigo in sod., 2018). Zmanjšanje zdravstvenih in ekonomskih posledic ter preprečevanje akutnih izbruhov PRRS dosežemo z aklimatizacijo in prekužitvijo naivnih mladic, preden jih pripuščamo oz. osemenjemo. S tem ukrepom dosežemo, da mladice ustvarijo delno ali popolno imunost proti virusnem sevu, ki kroži na farmi. Na ta način zaščitimo mladice pred reprodukcijskimi motnjami, pujski pa so zaščiteni preko kolostralnih protiteles (Vashisht in sod., 2008). Za čim boljše prekuževanje s PRRSV uporabljamo različne pristope ali njihove kombinacije. Možni načini aklimatizacije so naravna prekužitev s kontaktom z viremičnimi tekači, s serumizacijo ali s cepljenjem. Vsaka izmed metod ima svoje prednosti in slabosti, kar se tiče hitrosti širjenja PRRSV in aklimatizacije ter pridobljene specifične imunosti na hlevski sev PRRSV (Pugh in sod., 2005; Bruner in sod., 2007; Štukelj, 2013; Zimmerman in sod., 2019).

Obenem je treba pozornost nameniti tudi kontroli ostalih endemičnih bolezni s preventivnimi ukrepi in ustrezno terapijo. To najlažje zagotavljamo z uvedbo rednega preventivnega cepljenja, z uporabo antibiotične terapije za zmanjševanje posledic bakterijskih okužb in z izboljšanjem rejskih praks in bivanjskih ter mikroklimatskih pogojev v reji (Stevenson in sod., 1993; Batista, 2005; Zimmerman in sod., 2019). Za učinkovito kontrolo PRRS potrebujemo ustrezen načrt in strogo izvajanje biovarnostnih ukrepov ter učinkovit program aklimatizacije mladic. V prvi vrsti je treba poskrbeti za ustrezne biovarnostne ukrepe. Mladice, ki vstopajo na farmo, morajo biti proste PRRSV, da se prepreči vnos novih sevov PRRSV na farmo. Mladice do končanega obdobja aklimatizacije ne smejo priti v stik z ostalimi živalmi na farmi, zaposleni jih oskrbujejo v popolnoma ločenih hlevih. Po aklimatizacijskem obdobju je treba preveriti, če v vzorcih krvi in OF res ne moremo več zaznati RNA PRRSV in lahko najdemo specifična protitelesa proti PRRSV (Woonwong in sod., 2018).

2.7.1.1 Aklimatizacija mladic

Mladice, ki prihajajo v rejo, kjer je prisoten PRRSV, z namenom obnove plemenske črede, so ključna kategorija pri kontroli PRRS (Dee in sod., 1994; Dee, 1997; Batista in sod., 2004; Presente in sod., 2006; Vashisht in sod., 2008). Mladice morajo biti proste PRRSV, da v rejo ne vnašamo novih sevov virusa (Dee, 2003). To pomeni, da ob izpostavitvi farmskemu sevu virusa akutno zbolijo, v fazi okužbe širijo velike količine virusa, na koncu pa bolezen prebolijo in ustvarijo homologno zaščito proti sevu PRRSV, ki kroži v reji. Aklimatizacija torej pomeni izpostavljanje serološko negativnih mladic, v kolikor je mogoče, homolognemu sevu virusa za dovolj dolgo obdobje, da se prekužijo in razvijejo specifično imunost (Fano in sod., 2005a; Vashisht in sod., 2008).

Aklimatizacija mladic poteka ločeno od ostale plemenske črede, v za to prilagojenih prostorih (Dee in sod., 1997). Zgodaj po odstavitvi mladice namestimo v prostore za aklimatizacijo pri telesni masi med približno 25 in 35 kg. Do premestitve v plemensko čredo mine od 4 do 6 mesecev, tako da se v tem času vse živali zagotovo aklimatizirajo (Zimmerman in sod., 2019). Pred prestavitvijo aklimatiziranih mladic v plemensko čredo se opravi test RT-PCR za potrditev odsotnosti RNA PRRSV in ELISA za dokaz prisotnosti specifičnih protiteles (Dee in sod., 1994; Dee, 1997; Presente in sod., 2006). Aklimatizacija mladic je ob predpogoju izvajanja biovarnostnih ukrepov tudi prvi in osnovni korak pri kontroli PRRS (Torremorell in Christianson, 2002; Schaefer in Morrison, 2007; Meier in sod., 2008; Holtkamp in sod., 2010).

2.7.1.1.1 *Naravna prekužitev – aklimatizacija s kontaktom s kužnimi prašiči*

Aklimatizacijo dosežemo tako, da mladice izpostavimo starejšim mladim, ki smo jih že prej naselili v prostore za aklimatizacijo, ali tekačem z viremijo. Ti prašiči služijo kot donorji virusa. Poleg okuženih živih prašičev lahko uporabimo tudi homogenizirana tkiva mrtvorojenih, slabotnih in mumificiranih pujskov, ki izvirajo od plemenskih svinj okuženih s PRRSV. Novo naseljeni prašiči tkiva zaužijejo in pridejo v peroralni kontakt z virusom (Batista in sod., 2002; Dee, 2003). Okužene prašiče namestimo v iste prostore, še boljše kar neposredno v boks k novo nastanjenim mladim. Z naravno prekužitvijo dosežemo homologno zaščito proti sevu PRRSV, ki kroži v reji (Batista in sod., 2004). Uporaba viremičnih prašičev je poceni metoda prekuževanja in zahteva malo fizičnega dela delavcev ali lastnika živali (Vashisht in sod., 2008). Vashisht in sod. (2008) poročajo, da so v svoji raziskavi v isti boks uhlevili 40 neokuženih mladic, starih 6,5 tedna. Polovico izmed teh so eksperimentalno okužili s PRRSV. Po 4 tednih so k tem mladim vselili še 40 neokuženih mladic. Po nadaljnjih 4 tednih so bili vsi preiskani vzorci pozitivni na prisotnost RNA PRRSV, kot tudi na prisotnost specifičnih protiteles. Dee (1997) glede na svoje izkušnje in raziskave v terenskih pogojih navaja, da mladic v plemensko čredo ne bi smeli predstavljati prej kot 13. teden po prvem stiku s PRRSV okuženimi prašiči. Aklimatizacija mladic zgolj s fizičnim kontaktom je zelo odvisna od aktivnosti, števila in gostote prašičev v skupini, pa tudi od individualnih značilnosti živali. Uspešnost takega načina prekužitve lahko potrdimo le z

laboratorijskimi preiskavami s testom RT-PCR in ELISA (Presente in sod., 2006; Štukelj, 2013). Naravna prekužitev je zaradi nizkih stroškov v primerjavi z uporabo drugih metod pogosto uporabljena metoda aklimatizacije na PRRSV zlasti v ZDA (Corzo in sod., 2010). V Sloveniji sta njeno uporabnost v praksi pokazala Štukelj in Valenčak (2012), in sicer v manjših rejah, kjer se z naravnim kontaktom vse mladice v skupini prekužijo v predvidenem času za aklimatizacijo, tj. v obdobju od 3 do 6 mesecev. Na velikih farmah, kjer vsak teden potrebujejo veliko število mladic, aklimatizacija z zgolj naravnim kontaktom ni ustrezna kot samostojna metoda, saj traja predolgo časa, da bi se vse mladice z gotovostjo prekužile v obdobju treh mesecev (Torremorell in Christianson, 2002; Štukelj, 2013).

2.7.1.1.2 Aklimatizacija z uporabo bombažnih vrvi prepojenih z ustno tekočino obolelih prašičev

V strokovni literaturi ne obstaja veliko zapisov o uporabi in uspešnosti prekuževanja mladic z uporabo bombažnih vrvi prepojenih z OF prašičev obolelih za PRRS. Možnost uporabe s PRRSV kontaminiranih vrvi je omenjena na severnoameriških spletnih portalih https://www.pig333.com/articles/exposure-to-oral-fluid-in-prrs-gilt-acclimation_11164/ in <https://www.nationalhogfarmer.com/reproduction/take-care-acclimate-gilts>. Vsem raziskavam manjka številsko oprijemljivih podatkov in meritev ter primerjav med poskusno in kontrolno skupino prašičev, ker niso bile objavljene v znanstvenih publikacijah s faktorjem vpliva. Naša raziskava o učinkovitosti uporabe vrvi prepojenih z OF prašičev okuženih s PRRSV je prva, pri kateri smo v določenem časovnem obdobju periodično spremljamo prisotnost RNA PRRSV v serumu in protitelesni imunski odziv. Med seboj smo primerjali tudi različne metode aklimatizacije in pri tem upoštevali s PRRSV kontaminirane vrvi kot enega izmed dejavnikov, ki vpliva na potek aklimatizacije.

2.7.1.1.3 Aklimatizacija s serumizacijo

Pri serumizaciji se uporablja serum tekačev različnih starosti, saj pri njih PRRS poteka najbolj intenzivno in njihov serum vsebuje največjo količino PRRSV in viremija traja najdlje (Ruen in sod., 2007). Z metodo RT-PCR določimo prisotnost RNA PRRSV v serumu posameznih živali. Pripravimo inokulum, ki vsebuje del seruma in tekoče gojišče z dodatkom antibiotika in antimikotika, ki zavira rast bakterij in gliv, s katerim se cepi vse plemenske prašiče isti dan, da se vzpostavi enotno serološko pozitivno čredo (Batista in sod., 2002; Pugh in sod., 2005). Po treh mesecih sledi preverjanje uspešnosti serumizacije z ELISA za detekcijo specifičnih protiteles (Dee, 2009; Štukelj in Valenčak, 2012; Štukelj, 2013). Prednost serumizacije je, da je zaščita proti PRRSV homologna, poleg omenjenega pa je zaradi parenteralne poti vnosa virusa potrebna bistveno manjša infektivna doza, ki je zadošča za okužbo s PRRSV. Opriessnig in sod. (2007) so raziskovali vpliv števila virionov v inokulumu na kasnejšo zaščito proti homologni in heterologni naknadni eksperimentalni okužbi. V dveh poskusnih skupinah so uporabili 10^2 ali 10^5 TCID PRRSV. Po kasnejši okužbi, 4 tedne po inokulaciji s kužnim serumom, med poskusnimi skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v kliničnem poteku, prav tako ne v dnevnom prirastu ali izraženosti makroskopskih patoloških sprememb.

Pri skupini, kjer so uporabili nižji odmerek, so bile značilno bolj izrazite mikroskopske patološke spremembe. Oba odmerka sta zagotovila zaščito pred naknadno okužbo s homolognim ali heterolognim sevom, v primerjavi s kontrolno skupino, ki ni prejela nikakršne predhodne zaščite proti PRRSV. Pri serumizaciji sicer obstaja potencialna nevarnost prenosa drugih patogenih mikrobov, poleg tega pa metoda zahteva v primerjavi z naravno prekužitvijo bistveno več znanja, časa in finančnega vložka (Bruner in sod., 2007). S serumizacijo prekuževanje črede traja bistveno manj časa, kot če bi se živali prekuževale po naravni poti, zato je metoda primerna za velike reje (Bruner in sod., 2007; Štukelj, 2013). Bruner in sod. (2007) poročajo o pojavu reprodukcijskih motenj, kot so abortusi in manj številčna gnezda pujskov po serumizaciji v dveh zaporednih prasiatvenih ciklih. Štukelj in sod. (2015) poročajo, da je bila serumizacija uspešna metoda za aklimatizacijo pa tudi za kasnejšo eliminacijo virusa na manjših, *one-site* prašičjih rejah ob predpogoju, da so v njih striktno držali vseh določenih biovarnostnih ukrepov, zlasti zapore reje, preoblačenja in preobnavljanja pred vstopom v hleve ter principa prostorskega ločevanja različnih kategorij prašičev in izvajanja sistema reje AIAO, in tudi uporabe preverjeno negativnega semena za osemenjevanje. Linhares in sod. (2014) so pri raziskavi časa za doseg aklimatizacije v 61 rejah prašičev s potrjenimi primeri PRRS ugotovili, da je prednost serumizacije v primerjavi z uporabo komercialnih oslavljenih cepiv predvsem krajši časovni interval potreben za prekuževanje (25,1 tednov v primerjavi s 31 tedni), medtem ko je spremljanje različnih proizvodnih parametrov pokazalo, da uporaba cepiv povzroča manj negativnih stranskih učinkov v primerjavi s serumizacijo.

2.7.1.1.4 Aklimatizacija s pomočjo cepiv

Trenutno tržno dostopna cepiva proti PRRSV spadajo v dve kategoriji: večinoma gre za živa in oslabljenega cepiva, na voljo pa so tudi inaktivirana, mrtva cepiva. Slednja se zaradi zelo slabe imunogenosti v vsakdanji praksi uporabljajo zelo redko (Zimmerman in sod., 2019). Cepiva proti PRRSV vsebujejo ali PRRSV-1 ali PRRSV-2, ne pa obeh genotipov hkrati. Med obema genotipoma sicer obstaja določena stopnja navzkrižne zaščite (Du in sod., 2017).

Prvo komercialno cepivo je bilo modificirano živo cepivo Ingelvac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim, Nemčija) (angl. modified live vaccine; MLV), ki ga je razvila ameriška izpostava nemškega farmacevtskega podjetja leta 1994. Cepivo je temeljilo na korejskem izolatu PRRSV-2, kjer je bilo tudi prvič praktično preizkušeno leta 1996. Zagotovilo je določeno stopnjo imunosti proti homolognemu hlevskemu sevu PRRSV, pri čemer se je zmanjšalo izločanje virusa iz organizma cepljenih prašičev (Christopher-Hennings in sod., 1997; Opriessnig in sod., 2002; Cano in sod. 2007a; Linhares in sod., 2012a). Od odkritja PRRSV je bilo registriranih nekaj različnih komercialnih živih oslavljenih cepiv proti enemu ali drugemu genotipu virusa. Komercialna cepiva Porcilis1 PRRS (Merck, ZDA), Ingelvac PRRS FLEX EU (Boehringer Ingelheim, Nemčija), Amervac-PRRS (Hipra, Španija), Pyrsvac-183 (Syva, Španija) in ReproCyc PRRS EU (Boehringer Ingelheim, Nemčija) so registrirana za zaščito proti PRRSV-1 in se uporabljajo večinoma v Zahodni Evropi. Komercialna cepiva Ingelvac PRRS2 MLV (Boehringer Ingelheim, Nemčija),

ReproCyc PRRS-PLE (Boehringer Ingelheim, Nemčija), Ingelvac PRRS1 ATP (Boehringer Ingelheim, Nemčija) in Fostera PRRS (Zoetis, ZDA) pa vsebujejo oslavljen PRRSV-2 (Du in sod., 2017). Kljub temu da določena navzkrižna zaščita med PRRSV-1 in -2 obstaja, so komercialna cepiva proti nehomolognemu genotipu virusa praviloma v praksi slabo učinkovita ali pa povsem neučinkovita. Park in sod. (2015) so v *in vitro* pogojih dokazali določeno stopnjo zaščite, ki jo zagotavlja komercialno cepivo proti PRRSV-2 Fostera PRRS (Zoetis, ZDA) proti PRRSV-1. Oh in sod. (2019) so preučevali stopnjo zaščite ob uporabi štirih komercialnih cepiv, po dve proti vsakemu genotipu, na veliki farmi prašičev, v kateri sočasno cirkulirata oba genotipa PRRSV. Uporaba kateregakoli cepiva proti PRRSV-1 ni imela vpliva na potek viremije kljub lažšanju klinične oblike bolezni in izboljšanju proizvodnih rezultatov, medtem ko sta cepivi proti PRRSV-2 povzročili zmanjšanje skupnega titra virusa v krvi, vendar le na račun zmanjšanja titra PRRSV-2.

Živa oslabljenega cepiva kot tudi mrtva cepiva se lahko uporabljajo za pomoč k hitrejši in bolj učinkoviti aklimatizaciji mladic, vendar ne samostojno, vedno v kombinaciji z vsemi ukrepi za zmanjševanje prenosa virusa in posledic PRRS. Ti ukrepi obsegajo striktno upoštevanje vseh zahtev zunanje in notranje biovarnosti, predvsem na podlagi nabave potrjeno zdravih prašičev in semena ter kontrole endemskih bolezni v reji z zaščitnimi cepljenji in protimikrobno terapijo (Dee, 2003; Batista in sod., 2004; Štukelj, 2013). Cepiva imajo namreč omejen učinek zaradi velike genetske raznolikosti med PRRSV. Posledično zagotavljajo zgolj delno oziroma navzkrižno stopnjo zaščite proti farmskim sevom virusa, torej ublažijo klinični potek bolezni in skrajšajo njeno trajanje, vendar je ne preprečijo ali pa zaščite sploh ni (Zimmerman in sod., 2019). V skrajnem primeru lahko cepni sev iz živega oslabljenega cepiva prek mutacij povzroči klinične izbruhe in kot tak pomeni vnos nove virusne različice v rejo (Cano in sod., 2007a; Cano in sod., 2007b). Ravno zaradi tega dejstva se živih oslabljenih cepiv nikoli ne uporablja v rejah, kjer PRRSV ni dokazano prisoten. Po drugi strani pa se tudi uporaba mrtvih cepiv v rejah, kjer PRRSV ni dokazan, ni izkazala za smiselno, saj niso dovolj imunogena (Murtaugh in sod., 2010; Charentantanakul, 2012; Rajkhowa in sod., 2015; Du in sod., 2017). Rawal in sod. (2020) navajajo, da so pri uporabi mrtvega komercialnega cepiva MJPRRS (Phibro Animal health corporation, ZDA) v kombinaciji s predhodno uporabo živega oslabljenega cepiva dosegli izrazito boljše proizvodne rezultate ($p = 0,0505$) in izrazito manj izgub na 1000 plemenskih svinj ($p = 0,0003$) v primerjavi z uporabo le živih oslabljenih cepiv ob vseh drugih ukrepih za aklimatizacijo mladic.

Živo oslabljenega cepivo pomaga zaščititi mladice pred viremijo, zmanjša prenatalno in postnatalno smrtnost ter okužbo med brejestjo, tudi če ni homologno hlevskemu sevu PRRSV (Scortti in sod., 2006). Raziskave na področju proučevanja cepiv proti PRRS kažejo zelo različne rezultate, ki so posledica mnogih individualno pogojenih dejavnikov in izjemne genetske raznolikosti PRRSV. Torrents Gil (2019) navaja, da v eno leto trajajoči raziskavi ob aklimatizaciji mladic tudi s pomočjo komercialnega cepiva na 35 različnih farmah prašičev 25,7 % farm ni uspelo doseči stabilnosti. Garcia-Morante in sod. (2020) so preučevali učinkovitost komercialnih cepiv ReproCyc PRRS-PLE (Boehringer Ingelheim, Nemčija) in multivalentnega cepiva ReproCyc/ParvoFLEX, ki sočasno deluje tudi proti PPV pri

aklimatizaciji mladic. Mladice so osemnili 4 tedne po uporabi cepiva, nakar so jih 90. dan brejosti okužili s heterolognim sevom PRRSV-1. S poskusom so ugotavljali učinkovitost obeh različic cepiva tudi proti heterolognemu sevu PRRSV-1, pri čemer se je imunost pojavila 4 tedne po cepljenju in je trajala do 117 dni po nastopu. Ob tem se je znatno izboljšalo tudi preživetje pujskov in trajanje kolostralne zaščite v primerjavi z necepljeno skupino živali. Monovalentno cepivo istega proizvajalca so uporabljali tudi Kroll in sod. (2017) pri nebrehjih naivnih mladicah. Primerjava cepljene in necepljene skupine mladic v procesu aklimatizacije proti enakemu hlevskemu sevu virusa je pokazala bistveno hitrejše prenehanje viremije pri cepljeni skupini med 98 in 101 DPI ($p < 0,0001$).

2.7.1.2 Kontrola semena za osemenjevanje

Ker se PRRSV v velikih količinah izloča s semenom merjascev ($10^{4,5}$ TCID₅₀), je treba preprečiti prenos virusa preko semena (Benfield in sod., 2000). Večina intenzivnih rej prašičev uporablja osemenjevanje plemenskih svinj. Pri nakupu semena je pomembno, da to prihaja od potrjeno negativnih živali, oziroma iz certificiranih osemenjevalnih središč (Pitkin in sod., 2011; Štukelj, 2013; Zimmerman in sod., 2019). Če v reji nabavljajo plemenske merjase, ki jih uporabljajo bodisi za odvzem semena bodisi za naravni pripust, morajo kot vse ostale plemenske živali v rejo vstopati preko karantene z dvakratnim preverjanjem zdravstvenega statusa in prisotnosti RNA ter specifičnih protiteles proti PRRSV (Pitkin in sod., 2011). Tudi če je v reji potrjen PRRSV, se mora uporabljati seme prosto PRRSV, da se v rejo ne vnaša novih sevov PRRSV (Pitkin in sod., 2011; Štukelj, 2013).

2.7.1.3 Kontrola endemskih bolezni

Zaradi imunosupresivnega delovanja PRRSV se v reji poveča pojavnost vseh endemičnih bolezni, kot so streptokokni meningitis, sindrom multisistemskega poodstavitvenega hiranja, enzooska pnevmonija, Glässerjeva bolezen, stafilokokne okužbe kože in globljih mehkih tkiv in notranjih organov. Vsi povzročitelji naštetih bolezni so ubikvitarni in so redno prisotni v okolju in v organizmu prašičev, klinične manifestacije obolenj pa so zelo odvisne od splošnega zdravstvenega statusa črede in odzivnosti imunskega sistema ter od fizikalnih dejavnikov, kot so na primer temperatura, vlažnost in gibanje zraka, število prašnih delcev v ozračju, higiena prostorov ter odgnojevanje in nenazadnje tudi od številnih drugih dejavnikov vodenja reje, ki jih je v opisu metode McREBEL povzel McCaw (1995). Poveča se tudi pojavnost parazitov, kar vodi v porast porabe antiparazitikov in antibiotikov za zdravljenje sekundarnih bakterijskih okužb. Kontrola PRRS torej zajema ukrepanje zoper endemične in druge sekundarne bolezni (Batista, 2005; Zimmerman in sod., 2019). Zimmerman in sod. (2019) navajajo tudi, da se v akutni fazi pojava endemskih obolenj uporabljajo nesteroidna protivnetna zdravila za lajšanje bolečine in splošne oslabelosti ter povišane telesne temperature.

2.7.2 Biovarnostni ukrepi

Biovarnostni ukrepi so temelj za zagotavljanje in ohranjanje splošnega zdravja živali tudi pri preprečevanju okužb s PRRSV. Biovarnost obsega preprečevanje vnosa povzročitelja bolezni v rejo (zunanja biovarnost) in preprečevanje prenosa tega znotraj reje (notranja biovarnost) (Pitkin in sod., 2011; Štukelj, 2013). Uspešno izvajanje biovarnostnih ukrepov poleg nekaterih infrastrukturnih vložkov in posodobitev ter prilagoditev objektov terja tudi spremembo in prilagoditev navad ter obnašanja ljudi, ki so kakorkoli vpleteni v dogajanje v reji (McCaw, 1995b).

Biovarnostni ukrepi temeljijo na nekaterih osnovnih tehničnih principih. Eden izmed njih je segregacija z uporabo barrier (fizične bariere, časovna razdelitev opravil in določenih posegov v čredi), s katero se omeji tveganje za vnos povzročitelja bolezni z okuženimi živalmi ali s kontaminiranim materialom v rejo prosto bolezni oziroma v čredo zdravih živali. Temu sledi sanitacija, ki zajema čiščenje, dezinfekcijo in sušenje, kar zmanjšuje število patogenih mikrobov ali pa jih uniči. K temu gre prišteti tudi upravljanje gibanja živali in ljudi v reji ter redno spremljanje proizvodnih podatkov (McCaw, 1995; Canadian Swine Health Board, 2010).

2.7.2.1 Zunanja biovarnost

Zunanja biovarnost zajema ukrepe, s katerimi preprečimo vse možne načine vnosa nekega agensa v rejo. Bolezni se v rejo najlažje vnesejo z nakupom prašičev, okuženih s patogeni, kot je PRRSV, še posebej s subklinično okuženimi živalmi (Pitkin in sod., 2011). Tako je pglavitni ukrep za preprečitev vnosa PRRSV v rejo nakup potrjeno negativnih živali in semena od preverjeno negativnega, certificiranega rejca oziroma prodajalca (Pitkin in sod., 2011; Štukelj, 2013). Novih prašičev se nikoli ne uhlevi neposredno med ostale živali brez predhodne karantene, ki za PRRS traja vsaj 40 dni. V tem času se v karanteni dvakrat opravi preiskave na prisotnost virusa in protiteles, od 24 do 48 ur po prihodu in od 5 do 7 dni pred načrtovanim koncem (McCaw, 1995; Pitkin in sod., 2011, Štukelj in Golinar-Oven, 2015). Enako pomembno vlogo kot živi prašiči ima tudi seme za osemenjevanje, ki mora izvirati iz preverjeno negativnih rej prašičev ali od lastnih plemenskih merjascev, ki smo jih uhlevili prek opisanega procesa karantene (Pitkin in sod., 2011). Vnos PRRSV je mogoč tudi na posredne načine, zato se moramo držati tudi vseh drugih ukrepov za zmanjšanje tveganja za vnos povzročitelja v rejo. Virus se prenaša z vsemi izločki okuženih prašičev, pri čemer lahko človek ali oprema pa tudi škodljivci in insekti služijo kot mehanski prenašalci. Virus se lahko prenaša s transportnimi sredstvi. Preden se prašiče naloži v vozilo, se ga očisti, razkuži ter posuši zunanost vozila, notranost tovornega prostora in voznikovo kabino. Samo v celoti očiščeno in razkuženo vozilo lahko nakladamo živali pred premiki. Najbolje je, da je reja načrtovana tako, da vozila ne vstopajo na dvorišče. To pomeni, da je nakladalna rampa za dovoz in odvoz živali postavljena tako, da nakladanje in razkladanje poteka tako, da vozila ne prečkajo zunanje ograde farmskega kompleksa. V primeru izjem mora vozilo s celotno dolžino in profilom pnevmatik zapeljati skozi razkuževalne šobe ali dezinfekcijsko bariero.

Če je transportno vozilo zamazano z blatom ali organskim materialom, je treba najprej z visokotlačnim čistilcem odstraniti vse vidne nečistoče, čemur sledi razkuževanje tako podvozja kot površine transportnega sredstva. Vsa hlevska in veterinarska oprema se redno čisti in razkužuje ter se hrani na farmi. Nova nerazkužena oprema se ne vnaša od zunaj. Enako velja za obleko in obutev. Število zunanjih obiskovalcev se maksimalno omeji, pri čemer naj ti ob vstopu ne vnašajo hrane in opreme, pred vstopom pa vsaj od 48 do 72 ur ne smejo biti v stiku z drugimi prašiči. Pred vstopom je obvezno tuširanje in preoblačenje v čisto obleko in obutev, ki se hrani na farmi. Farmo zunaj ščitijo mreže, ograje in druge fizične prepreke, da se divjim živalim onemogoči dostop do prašičev in krme (Canadian Swine Health Board, 2010; Pitkin in sod., 2011; Štukelj, 2013; Zimmerman in sod., 2019). Za zmanjšanje možnosti vnosa virusa z aerosolom je priporočljiva uporaba prezračevalnih sistemov z ustreznimi filtri, ki preprečujejo vstop virusa skozi zajeti zrak (Otake in sod., 2010).

2.7.2.2 Notranja biovarnost

Notranja biovarnost zajema ukrepe, s katerimi preprečimo prenos povzročiteljev kužnih bolezni med prašiči v reji (Pitkin in sod., 2011). V primeru izbruha PRRS je treba izbruh zavezati in preprečiti nadaljnje širjenje bolezni. Zoper PRRS ni zdravila, zato se v primeru izbruha z uvedbo ukrepov zgolj omilijo negativne posledice v akutni in endemični fazi bolezni (MacLachlan in Dubovi, 2017; Zimmerman in sod., 2019). V rejah z dokazanim PRRSV so pomembni ukrepi za t. i. uravnavanje pretoka oziroma gibanja različnih skupin prašičev skozi prostore farme. Za uspešno izvajanje notranjih ukrepov biovarnosti je zelo pomembna arhitekturna zasnova objektov in načrtovanje gibanja ljudi in živali. Idealno je, da so različne kategorije prašičev ločene po prostorih, kar omogoča izvedbo sistema AIAO, ki nudi možnost za temeljito čiščenje in razkuževanje objektov, čemur sledi vsaj 7-dnevni sanitarni premor (McCaw, 2000; Pitkin in sod., 2011). McCaw (1995) je za primer dobre prakse menedžmenta patentiral metodo McREBEL (angl. *Management Changes to Reduce Exposure to Bacteria to Eliminate Losses*), ki v primeru uporabe te prakse v prasilišču prinese izboljšanje zdravstvenega stanja tudi v primeru PRRS (McCaw, 2000).

Glede na značilne karakteristike prenosa PRRSV in dolžine persistence v okuženem organizmu smo poleg vseh ostalih načel notranje biovarnosti najbolj pozorni na vzpostavitev ukrepov, ki zmanjšujejo možnost parenteralnega prenosa virusa, saj so po tej poti potrebne najmanjše infekcijske doze. Zelo striktno je treba uporabljati sterilne igle in jih menjavati med gnezdi ter za vsakega plemenskega prašiča uporabiti novo sterilno iglo. Pri posegih, kjer je prekinjena kontinuiteta kože (na primer kastracija, krajšanje repov, rovašenje, tetoviranje in drugo) je treba vedno uporabljati sterilne instrumente, orodje ali material ter obenem skrbeti za najvišji možen nivo higiene in asepse. V največji možni meri je treba tudi zmanjšati število parenteralnih aplikacij; na primer, namesto parenteralne aplikacije železa se uporabljajo peroralne paste in posipe ter peroralne medikamente ali cepiva, v kolikor je to seveda mogoče (Otake in sod., 2002c). Pomembno je tudi, da je gostota naselitve ustrežna in da se ustrezno skrbi za dobrobit živali, kar zmanjša pojavnost krvavih hierarhičnih bojev med vrstniki v

skupinskih boksih. Da se čimbolj zmanjša prenos virusa med različnimi kategorijami prašičev in možnost akutnih izbruhov PRRS, lahko najbolj rizično populacijo, kot so tekači, ki jim izzveni kolostralna imunost, predstavimo na drugo, popolnoma ločeno lokacijo hleva. Pujske lahko po rojstvu premeščamo k mačeham le znotraj prvih 24 ur, slabotne pujske izločimo iz reje. Vse bolne živali se osami v posebej ločen bolnišnični prostor ter se jih po terapiji in preteku karence izloči iz reje (Otake in sod., 2002a; Canadian Swine Health Board, 2010; Pitkin in sod., 2011).

Človek lahko kužne agense prenaša tudi mehansko na koži in oblačilih ter obutvi kontaminirani z izločki okuženih prašičev. Zaposleni na farmi morajo čim manj prehajati med oddelki, kjer so uhlevljene različne kategorije živali. Če to ni mogoče, je treba ob prehajanju med oddelki razkuževati roke in obutev ter menjati zaščitno obleko in obutev. Pred vsakim vhom v rejo ali med prehodi med različnimi oddelki morajo biti nameščene dezinfekcijske bariere, v katerih si delavci in morebitni obiskovalci razkužijo obutev. Razkužilo v njih se menjava minimalno vsak tretji dan. Gibanje zaposlenih naj vedno poteka od najbolj rizične kategorije do najmanj dovzetne, vsa opravila se začnejo v prasilišču, kjer so visoko breje svinje in svinje z gnezdi pujskov. Smer opravil se nato izvaja preko pripustišča in čakališča do tekačev in pitancev. Ob manipulaciji s prašiči je priporočena uporaba gumijastih rokavic in njihovo redno menjavanje, enako velja za medicinski material, saj moramo opremo obvezno zamenjati, očistiti ali razkužiti vsaj pred vsakim prehodom med fizično ločenimi prostori, v prasilišču pa med vsakim gnezdom (Otake in sod., 2002b; Canadian Swine Health Board, 2010; Pitkin in sod., 2011; Štukelj, 2013). V reji se redno odpravlja škodljivce, kot so miši, podgane ali druge glodavce, in insekte, ki lahko prav tako mehanično prenašajo viruse na svoji površini (Otake in sod., 2002d; Otake in sod., 2003).

2.7.3 Nadzor PRRS

V Pravilniku o boleznih živali je PRRS naveden kot obvezno prijavljiva bolezen. V Pravilniku je določeno, da se na vsake pol leta stanje beleži in poroča na OIE (Pravilnik o boleznih živali, 2010). Dolgoročno sta finančno bolj kot kontrola zaželeni eliminacija in izkoreninjenje PRRSV. Kljub vsemu eliminacija in izkoreninjenje nista izvedljiva, če se na farmi striktno ne upošteva vseh ukrepov zunanje in notranje biovarnosti, zlasti če na farmi kategorije prašičev niso ločene po prostorih in ni vzpostavljenega sistema AIAO, ki omogoča popolno izpraznitev prostora, čiščenje, razkuževanje in t. i. *downtime*, tj. zagotavljanje intervala vsaj 14 dni med izhlevljanjem starih in uhlevljanjem novih živali. Hkrati je treba izvajati tudi laboratorijsko dokazovanje RNA PRRSV in specifičnih protiteles z namenom ocenjevanja uspešnosti uvedenih ukrepov (Pitkin in sod., 2011; Štukelj, 2013; Zimmerman in sod., 2019).

Za monitoring statusa farme glede PRRS se kot referenčni vzorec uporabljajo individualni vzorci seruma. Kljub vsemu različni avtorji in njihove raziskave v zadnjem desetletju potrjujejo, da individualni ali skupinski vzorci OF in neonatalna procesna tekočina v primeru monitoringa predstavljajo vzorec, v katerem lahko z večjo verjetnostjo dokazujemo PRRSV v

populaciji prašičev kot v individualnih vzorcih seruma. Takšno vzorčenje pomeni občutno zmanjšanje časovnega in finančnega vložka. Vzorce OF jemljemo na preprost način ter velikemu številu živali, pri čemer uporabljamo le osnovne pripomočke, kot so sterilne bombažne vrvi in plastična embalaža (Olsen in sod., 2013a; Olsen in sod., 2013b; Kittawornrat in sod., 2014; Rotolo in sod., 2017; Lopez in sod., 2018; Rotolo in sod., 2018).

Reje, kjer PRRSV ni ugotovljen, si morajo čimbolj prizadevati za zmanjšanje možnosti za vnos virusa v rejo z doslednim izvajanjem in upoštevanjem ukrepov biovarnosti. Na ravni Evropske skupnosti in Slovenije v zvezi s PRRS zakonodaja ne predvideva specifičnih ukrepov za omejevanje okužb. Bolezen je uvrščena na listo Svetovne organizacije za zdravje živali (angl. *World Organisation for Animal Health*; fr. *Office International des Epizooties*; OIE) (OIE, 2018) in v Prilogo 1 Pravilnika o boleznih živali. Vsak laboratorijsko potrjen primer se beleži v centralni informacijski sistem (CIS-EPI), ki ga nadzoruje Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR). Po pravilniku se na pol leta poroča o vsakem diagnosticiranem primeru preko sistema WAHIS, hkrati pa se podatke vnaša tudi v evidenco Evropske skupnosti (Pravilnik o boleznih živali, 2010). Na PRRS se nanaša tudi uradni dokument AHL (angl: *Animal Health Law*) v Uredbi EU 2016/429, in sicer v členu številka 5 (obvezno poročanje o bolezni), členu številka 7 (profil bolezni in njeni vplivi), v členu 8 o živalskih vrstah dovzetnih za PRRS in členu številka 9 o kategorizaciji PRRS glede ukrepov za preventivo in nadzor bolezni (More in sod., 2017).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Prašičji farmi

Prvo in drugo fazo poskusa smo izvedli v terenskih pogojih, na dveh največjih slovenskih farmah prašičev, ki imata vsaka po približno 3.000 plemenskih svinj in sta v lasti istega lastnika. Na prvi farmi (farma A) je bil PRRSV potrjen, prav tako se na tej farmi pojavljajo s PRRS povezana klinična znamenja, zoper virus pa izvajajo ukrep kontrole bolezni. Na drugi farmi (farma B) pred začetkom poskusa ni PRRSV nikoli potrjen. Od tu so bile na farmo A, kjer je PRRSV prisoten, predstavljene mladice, katerim smo tekom poskusa tedensko odvzeli vzorce krvi in OF za dokaz RNA PRRSV in specifičnih protiteles. Mladice so se prekuževale v objektu za prekuževanje, ki je bil velik približno 400 m², z 18 boksi za prašiče v treh vrstah, (6 v vsaki vrsti), s površino 15 m². Boksi so bili med seboj ločeni z rešetkastimi kovinskimi pregradami, ki so omogočale fizični kontakt med prašiči sosednjih boksov. V vsakem boksu je avtomatski krmilnik za doziranje komercialne krmne mešanice za pitance (Jata Emona, Slovenija). Poleg objekta namenjenega prekuževanju mladic se v sklopu farme A nahajajo še trije objekti, kjer poteka nadaljnja proizvodnja od pripusta do vzreje.

Farmi A in B se nahajata v različnih regijah Slovenije in sta preko obstoječe cestne povezave med seboj oddaljeni 78 km. Na obeh farmah izvajajo stroge biovarnostne ukrepe. Farmi obdaja dvojna žičnata ograja, vozila vstopajo na posestvo prek dezinfekcijske bariere. Vstop nezaposlenim je prepovedan, obiski so strogo omejeni in nadzorovani. Vsak obiskovalec si ob vstopu razkuži obutev in roke ter podpiše izjavo, da ni bil v stiku z drugimi prašiči vsaj 72 ur. Pred vstopom v hleve se v garderobi (sanitarni vozil) stušira, preobuje in preobleče v obleko in obutev, ki je hranjena na farmi. Pred vstopom v posamezni oddelek je nameščena dezinfekcijska bariera. Na farmah vsaj dvakrat letno opravljajo programa deratizacije in dezinfekcije. Enkrat na teden, po koncu proizvodnega ciklusa, ko so vsi boksi v pododdelku prazni, se izvedeta čiščenje in razkuževanje hleva. Vsi kupljeni merjasci preživijo vsaj mesec dni v karantenskem objektu, ki je na drugi lokaciji, preden se jih prestavi v čredo. Plemenski merjasci služijo kot donorji semena za osemenjevanje plemenskih svinj, drugi pa služijo za stimulacijo estrusa, za odkrivanje bukanja ter za boljše uspešnost osemenitve. Kategorije prašičev so med seboj ločene po prostorih, zaposleni oskrbovalci se med kategorijami ne mešajo (ločeno se oskrbujejo pripustišče in čakališče, porodnišnice in vzreja tekačev).

Tri tedne pred pričakovano prasiatvijo se plemenske svinje cepi proti najpogostejšim kužnim boleznim, to so rdečica, Glässerjeva bolezen in kolibaciloza. Mladice prejmejo dva odmerka cepiva, prvega že 6 tednov in drugega 3 tedne pred prasiatvijo. Igle se menja med posameznimi boksi mladic, ne med vsako živaljo posebej. Prejmejo tudi cepivo proti parvovirozi, nato pa enkrat na leto poživitveni odmerek. Vse plemenske živali prejmejo odmerek antiparazitika 3 tedne pred prasiatvijo. Proti enakim boleznim so cepljeni plemenski merjasci dvakrat letno, kar velja tudi za odmerek antiparazitika. En teden pred pričakovano

prasiatvijo se svinje po predhodnem umivanju in razkuževanju prestavi v čista in razkužena prasilišča. Sesne pujske se odstavi 28. dan po prasiatvi, v čiste in razkužene skupinske bokse. Tekači, so v ločenih prostorih vzrejani do 12. tedna starosti, nakar živali predajo v nadaljnjo rejo kooperantom oz. kmetijam, ki izvajajo pitanje prašičev v svojih prostorih na širšem geografskem območju Slovenije.

3.1.2 Mladice na farmi A, kjer je prisoten PRRSV

Mladice, stare 12 tednov in težke približno 30 kg, so na farmi A, kjer je prisoten PRRSV, uhlevljene v ločen objekt za prekuževanje, ki se nahaja znotraj ograjenega posestva (Slika 3). Na farmi A se mladice oskrbujejo se popolnoma ločeno od ostalih živali, kar pomeni, da njihov delavec, ki se rokuje z mladnicami, tega dne nima kontakta z ostalimi živalmi na farmi in uporablja hlevsko orodje in pripomočke namenjene izključno za uporabo v hlevu za prekuževanje. Enako velja za delovna oblačila in obutev.



Slika 3: Farma A, na kateri je bil potrjen PRRS. S puščico je označen objekt za prekuževanje, kjer se uhlevljajo mladice, preden se prekužijo z virusom.

Figure 3: PRRS-positive pig farm (farm A). Arrow indicates a farm building, where PRRS-free replacement gilts are in-housed after arrival before the infection with the virus.

V objektu za aklimatizacijo na farmi A s prisotnim PRRSV je bilo nameščenih okoli 500 mladic različnih starosti, ki so bile v različnih fazah prekuževanja. Vsak teden so na to farmo A s farme B brez prisotnega PRRSV pripeljali med 16 in 20 mladic. Te so bile uhlevljene poleg starejših živali, ki so že bile v postopku aklimatizacije na PRRSV. Mladice so bile nameščene v rešetkaste bokse, ki so omogočali neposreden kontakt z ostalimi prašiči in njihovimi izločki (Slika 4). V hlev so tedensko premestili iz vzrejališča iste farme tudi nekatere tekače, ki so kazali klinična znamenja značilna za PRRS in njihove iztrebke (Slika 5). Ti tekači niso imeli direktnega stika z mladnicami v poskusu in tudi ne z vrvmi za jemanje vzorcev OF pri skupinah mladic I–IV. Nahajajo se v ločenem boksu v hlevu za prekuževanje

in na ta način posredno pospešujejo k prenosu PRRSV na ostale mladice v istem hlevu, kar pripomore k hitrejši okužbi novo naseljenih mladic. Virus se lahko prenaša tudi z aerosolom.



Slika 4: Mladice v skupinskih boksih, ki omogočajo neposreden stik z okuženimi živalmi.

Figure 4: Gilts in-housed in group open-framed boxes enabling direct contact with infected animals.



Slika 5: Viremični tekači, uhlevljeni v prostore za aklimatizacijo mladic.

Figure 5: Viremic weaners in the gilt acclimatization facilities.

V prvi fazi poskusa (preliminarna skupina) smo spremljali skupino šestnajstih mladic. Iz skupine smo po nastanitvi živali vsak teden, 7 tednov zapored, desetim naključno izbranim mladim odvzeli individualne vzorce krvi in skupinski vzorec OF. V drugi fazi poskusa smo 8 tednov spremljali 4, v zaporednih tednih uhlevljene, skupine šestnajstih individualno označenih plemenskih mladic, kar pomeni skupaj 64 mladic, po 16 mladic v vsaki skupini. Skupine mladic so označene z rimskimi številkami I, II, III in IV. Te mladice so bile uhlevljene v isti hlev za prekuževanje, na farmo s prisotnim PRRSV, kot tiste iz preliminarne skupine.

Aklimatizacija v objektu za prekuževanje na farmi A, z dokazanim PRRSV, traja 3 mesece. Po tem obdobju se mladice premesti v plemensko čredo, natančneje v pripustišče. Ob premeščanju so tehtale približno 100 kilogramov, stare pa so bile pol leta. V tem času naj bi se živali okužile s farmskim sevom virusa, bolezen prebolele in razvile specifična protitelesa, ki se po prasitvi, preko kolostruma, prenesejo na sesne pujske.

3.1.3 Hleva in mladice v poskusu na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani

Tretja faza poskusa je potekala v Hlevu številka 1 ter številka 2 na VF UL, v prostorih Klinike za prežvekovalce in prašiče. V Hlevu 1 se nahajajo 3 boksi v velikosti 6,5 m², v vsakem sta 2 napajalnika in 2 krmilni koriti za ročno pokladanje krme prašičem. V Hlevu 2 se nahaja en takšen boks. Pred oba vhoda v hlev je bila nameščena dezinfekcijska bariera, v kateri smo dnevno menjavali razkužilo za obutev. Izvedli smo poskus prekužitve dveh skupin šestnajstih 12 tednov starih mladic (skupini V in VI), ki so izhajale s farme B, brez potrjenega PRRSV. Po spolu in telesni masi so bile enake mladim iz prejšnjih skupin. V hlevih VF UL je bilo v treh boksih nastanjenih po 5 do 6 mladic v skladu s prostorskimi zahtevami, navedenimi v Dovoljenju za izvajanje poskusa na živalih (številka U34401-36/2017/5, izdano dne: 11.1.2018). Mladice smo naselili v dveh zaporednih skupinah z vmesnim 14-dnevnim premorom, med katerim smo lahko temeljito očistili in razkužili hleva. Prašiči so bili krmljeni dvakrat dnevno, na 12 ur, s približno 750 g komercialne krmne mešanice za pitance (Jata Emona, Slovenija). Vodo za pitje so imele mladice vedno na voljo. Po štirih tednih smo zaradi rasti mladic štiri živali preselili v hlev številka 2, ki se nahaja v ločenem prostoru prav tako v pritličju stavbe, v njem pa se nahaja še en boks za namestitev prašičev, enakih dimenzij kot v hlevu številka 1. Do mladic smo vsakodnevno dostopali le izvajalci poskusa in oskrbnik tehnik, enkrat na teden so pod nadzorom in z upoštevanjem biovarnostnih ukrepov do živali pristopili tudi študenti VF UL.

3.1.4 Odvzem krvi

Za odvzem individualnih vzorcev krvi z venopunkcijo smo uporabili od 4 do 8 cm dolge injekcijske igle (Tovarna igel Kobarid, Slovenija), nameščene na 10 ml injekcije (Chirana, Slovaška). Kri smo takoj po odvzemu prelili v individualno označene sterilne 10 ml epruvete z dodatkom faktorja za aktivacijo koagulacije BD Vacutainer, ki omogoča ekstrahiranje seruma iz vzorca krvi (BD Biosciences, ZDA).

3.1.5 Vzorčenje OF in vrvi za prekuževanje mladic

Za odvzem OF smo uporabljali sterilne, 100-odstotne bombažne vrvi dolžine 100 cm in premera 1,4 cm iz komercialnega kompleta reagentov (IDEXX Oral Fluid Collection Kit, ZDA). Iste vrvi, prepojene s slino, smo uporabljali tudi za kasnejšo prekuževanje in aklimatizacijo mladic iz skupin od III do VI.

3.2 METODE

3.2.1 Časovni potek poskusa

Poskus smo izvedli v treh časovno ločenih obdobjih pri različnih skupinah mladic:

- Prva faza: preliminarna skupina na farmi prašičev, za katero je bilo predhodno znano, da je na njej prisoten PRRSV. Na farmi smo 8 tednov zapored odvzeli individualne vzorce seruma ter skupinski vzorec OF desetim naključno izbranim mladim, začeni z dnevom uhlevitve mladic pri starosti 12 tednov (od 13. 4. 2017 do 1. 6. 2017).
- Druga faza (skupine mladic od I do IV): poskus na isti farmi prašičev, kjer je potekala prva faza. Pri vseh 16 uhlevljenih in individualno označenih mladim smo 9 tednov zapored individualno vzorčili serum ter skupinski vzorec OF, začeni z dnevom uhlevitve mladic pri starosti 12 tednov (od 11. 10. 2017 do 28. 12. 2017).
- Tretja faza (skupini mladic V in VI): poskus v hlevih Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani (VF UL), kjer smo 9 tednov zapored individualno vzorčili serum ter skupinski vzorec OF vsem 16. uhlevljenim in individualno označenim PRRSV negativnim mladim, začeni z dnem uhlevitve mladic pri starosti 12 tednov (od 5. 2. 2018 do 15. 5. 2018).

3.2.2 Aklimatizacija mladic

3.2.2.1 Naravna prekužitev z izpostavitvijo mladic viremičnim živalim in njihovim izločkom

To metodo prekuževanja smo uporabili pri preliminarni skupini ter skupinah I in II. Mladice smo spremljali od vstopa mladic na farmo dne (DPI 0), do 9. tedna po uhlevitvi (DPI 56), v tedenskih intervalih, z vzorčenjem individualnih vzorcev krvi in skupinskih vzorcev OF vseh živali v skupinah I in II. Mladice so predhodno odbrali na farmi B, glede na spremljanje proizvodnih rezultatov.

3.2.2.2 Naravna prekužitev s sočasno izpostavitvijo mladic viremičnim živalim in bombažnim vrvem, prepojenih z OF viremičnih živali

Pri skupinah mladic III in IV je prekuževanje potekalo na enak način kot pri skupinah I in II, a smo mladim iz teh skupin po uhlevljanju in prvem vzorčenju v bokse namestili bombažne vrvi, prepojene z OF mladic I in II. Prve 4 tedne po uhlevitvi smo tedensko menjavali vrvi za prekuževanje. Na ta način smo poskusili izkoristiti naravno obnašanje prašičev in njihovo željo po raziskovanju, da so z žvečenjem kontaminiranih vrvi prišli v tesnejši in hitrejši stik s

kužnino. Prisotnost RNA PRRSV smo predhodno potrdili z RT-PCR. Pri tem smo v enakih intervalih v serumu in OF določali prisotnost virusne RNA in specifičnih protiteles proti PRRSV in jih primerjali s prvima dvema skupinama mladic.

3.2.2.3 Poskusne živali v hlevih VF UL – prekuževanje mladic z uporabo bombažnih vrvi, prepojenih z OF viremičnih živali

Živali iz skupine V smo prekuževali tako, da smo jim v bokse namestili predhodno zamrznjene in pred poskusom odtajane kontaminirane vrvi viremičnih prašičev iz skupin mladic I–IV, ki so jih te žvečile (Slika 6). Vrvi so imele na voljo za žvečenje prve 4 tedne po uhlevitvi, menjavali smo jih vsak teden. Za živali iz skupine VI smo uporabljali kontaminirane vrvi brez predhodnega zamrzovanja, ki smo jih z avtomobilom v roku ene ure prepeljali v hladilni torbi, s farme, kjer je smo potrdili PRRSV.



Slika 6: Mladice v poskusu v hlevih VF UL. Odmrznjena vrv s farme, na kateri je bil potrjena RNA PRRSV, je nameščena na sredino boksa, tako da se ne dotika stranic, tal, krmilnikov ali napajalnikov. Mladice jo uporabljajo za igro. Vrvi za mladic iz skupine V smo hranili zamrznjene pri temperaturi -20°C .

Figure 6: Gilt in the facilities of Veterinary faculty in Ljubljana. The thawed rope containing OF from PRRS-positive farm is placed in the middle of the crate hanging from the metal construction preventing it from touching the sides, floor, feeders, and drinkers. Gilts use the rope as a playing tool for chewing. The ropes for gilts from group V were stored frozen at -20°C .

3.2.3 Dinamika odvzema vzorcev

Pri mladicah v poskusu smo tedensko individualno vzorčili kri ter skupinske vzorce OF. Individualni vzorec seruma je vzorec, ki smo ga odvzeli posamezni živali, medtem ko smo skupinski vzorec OF odvzeli celotni skupini mladic iz istega boksa, ki so sočasno žvečile bombažno vrv.

Vzorčenje smo pričeli v prvi fazi poskusa, pri preliminarni skupini živali, na farmi, kjer je bila dokazana prisotnost PRRSV v objektu za prekuževanje. V tej skupini mladice niso bile individualno označene; iz skupine vseh živali smo izbrali 10 naključnih mladic za odvzem krvi in hkrati smo odvzeli še skupinski vzorec OF. V vseh nadaljnjih skupinah, to je v drugi in tretji fazi poskusa (označene od I do VI), smo mladice pred vzorčenjem individualno označili, nato pa odvzeli individualne vzorce krvi in skupinske vzorce OF štirim zaporednim skupinam 16-ih mladic (skupine mladic od I do IV). Nadalje smo na enak način izvedli vzorčenje pri mladicah uhlevljenih v prostore VF UL (skupini mladic V in VI). Skupno smo odvzeli 808 individualnih vzorcev seruma in 58 vzorcev OF (Tabela 1).

Tabela 1: Skupno število odvzetih vzorcev.

Table 1: The number of obtained samples.

	število individualnih vzorcev seruma	število skupinskih vzorcev OF
preliminarna	80	8
Skupina mladic	I	9
	II	9
	III	9
	IV	9
	V	7
	VI	7
skupaj	808	58

Po predhodni fiksaciji in odčitavanju individualne ušesne številke smo odvzeli iz žile *vena cava cranialis* (Slika 7) od 5 do 10 ml krvi, ki smo jo takoj prenesli v individualno označene sterilne 10 ml epruvete z dodatkom faktorja za aktivacijo koagulacije (BD Biosciences, ZDA).



Slika 7: Fiksacija mladice z nosno zanko in odvzem krvi iz žile *vena cava cranialis*.

Figure 7: Gilt restraint with a snare loop and blood drawing from cranial vena cava.

Na sredino ograde smo s plastičnimi veznimi trakovi pritrdili čiste bombažne pletene vrvi (IDEXX, ZDA), tako da se niso dotikale tal, krmilnikov ali napajalnikov. Vrvi smo v boksu pustili 30 minut, kot to svetuje proizvajalec, oziroma dokler se vrvi ne prepojijo z OF do te mere, da lahko iz vrvi iztisnemo vsaj 5 mililitrov OF. V tem času so jih vsi prašiči iz skupinežvečili (Slika 8) in jih prepojili z OF.



Slika 8: Mladice, ki žvečijo bombažno vrv.

Figure 8: Gilts chewing on a cotton rope.

Nato smo OF oželi v plastično vrečko z zadrgo in jo prelili v sterilne 50 ml sterilne plastične epruvete z navojem (Slika 9).



Slika 9: Ožemanje OF iz vrvi.

Figure 9: OF sampling from the ropes.

Vrvi smo po ožemanju še približno 15 min pustili v ogradi, da so jih prašiči žvečili in znova prepojili z OF, nato pa smo vrvi shranili v plastične in označene vrečke in shranili za prekuževanje prašičev iz skupin III, IV in V (Slika 10).



Slika 10: Shranjevanje vrvi prepojenih z OF prašičev z dokazanim PRRS.

Figure 10: Storage of the ropes soaked with PRRS-positive pig OF.

3.2.4 Transport in priprava vzorcev

Individualne vzorce krvi smo hranili pri sobni temperaturi, dokler se ni izoblikoval krvni strdek in se oddvojil serum. Epruvete z vzorci OF in v vrečke zapakirane prepojene vrvi smo shranili v hladilno torbo na temperaturi 4 °C in jih v eni uri prepeljali na VF UL, kjer smo vrvi shranili v zamrzovalnik na –20 °C, preden smo jih nadalje uporabili za prekuževanje mladice iz skupin V in VI. Pri skupini mladice VI smo se naknadno odločili (po neuspešnem poskusu prekuževanja mladice iz skupine V), da vrvi pred nadaljnjo uporabo ne zamrzujemo, temveč jih obesimo v bokse mladice takoj po transportu.

Po tvorbi krvnega strdka iz odvzetih vzorcev krvi, smo epruvete z vzorci 10 min centrifugirali na 3000 × g. Vzorce OF smo centrifugirali pri 2000 × g takoj po dostavi v laboratorij. Serum in OF smo odpipetirali v individualno označene sterilne epruvete po 1 do 2 ml, v dveh ali treh alikvotih. Za nadaljnje preiskave smo vzorce seruma in OF zamrzili pri temperaturi –20 °C za serološke preiskave in pri –80 °C za dokazovanje virusne RNA.

3.2.5 Laboratorijske preiskave

Skupno število vzorcev preiskanih z različnimi laboratorijskimi preiskavami pri različnih skupinah mladice prikazuje Tabela 2.

Tabela 2: Skupno število preiskanih vzorcev z različnimi laboratorijskimi preiskavami.

Table 2: The number of samples tested with different diagnostic methods.

	število opravljenih preiskav z različnimi metodami				
	RT-PCR	Ab ELISA	RT-PCR	Ab ELISA	
	serum	serum	OF	OF	
preliminarna	20	80	8	8	
skupina mladice	I	136	136	9	9
	II	120	120	9	9
	III	128	128	9	9
	IV	120	120	9	9
	V	0	112	7	7
	VI	0	112	7	7
skupaj	524	808	58	58	

3.2.5.1 Molekularne analize

3.2.5.1.1 *Osamitev RNA*

Po navodilih proizvajalca komercialnega kompleta reagentov QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Nemčija) smo RNA osamili iz 140 µL supernatanta seruma ali OF. Izolirano RNA smo uporabili za takojšnje nadaljnje molekularne analize oziroma jo shranili na –70 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.5.1.2 RT-PCR

Metodo RT-PCR za specifično detekcijo nukleokapsidnega proteina regije ORF 7 PRRSV smo izvedli s komercialnim kompletom reagentov One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Nemčija). Uporabili smo specifične oligonukleotidne začetnike PRRS P1 in PRRS P2 za detekcijo PRRSV-1 in -2 odseka dolžine 291 oziroma 301 bp (Donadeu in sod., 1999).

Pripravljena reakcijska mešanica s končnim volumnom 25 μ l je vsebovala 5 μ l 5 \times pufra PCR, 11 μ l H₂O brez DNaz in RNaz, 1 μ l 10mM mešanice dNTP (dinukleozid tri-fosfat), 0,5 μ l vsakega oligonukleotidnega začetnika v koncentraciji 20 pmol/ μ l ter 6 μ l RNA. Reakcijsko mešanico smo pripravili v 0,2 ml sterilnih epruveh, ki smo jih vstavili v termopomnoževalnik Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, Nemčija). Reverzna transkripcija je potekala 30 min pri temperaturi 50 °C in 15 min pri 94 °C; sledilo je 40 ciklov denaturacije pri 94 °C za 30 sek, prileganja oligonukleotidnih začetnikov pri 60 °C za 30 s in podaljševanje novonastale verige pri 72 °C za 14 min. Zadnje podaljševanje novonastale verige je potekalo še 10 min, nato pa se je produkt ohladil na 4 °C. Pomnožen PCR produkt oziroma reakcijsko mešanico smo nanесли na 1,8-odstotni agarozni gel za agarozno glesko elektroforezo (AGE) (200 V/400 A). Gel smo po izvedeni elektroforezi obarvali z etidijevim bromidom, da smo lahko pod UV lučjo odčitali velikosti fragmentov. Obarvane fragmente velikosti 291/301 bp smo po odčitavanju z agaroznega gela opredelili kot pozitivne za prisotnost virusne RNA PRRSV-1 ali -2.

3.2.5.1.3 Določanje prisotnosti RNA PRRSV z RT-PCR v realnem času v vzorcih OF

Potrditve prisotnosti RNA PRRSV in količino virusne RNA so izvedli v laboratoriju proizvajalca diagnostičnih kompletov reagentov Virotype (Qiagen, Nemčija). Hkrati smo analizo vzorcev opravili še na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo VF UL z uporabo drugega komercialnega kompleta reagentov VetMAX (ThermoFisher, ZDA). Rezultate smo podali v vrednostih Ct. Vzorce z vrednostmi Ct < 40 smo opredelili kot pozitivne na prisotnost RNA PRRSV. Rezultate obeh preiskav opravljenih z metodo RT-PCR v realnem času s komercialnima kompletoma različnih proizvajalcev smo primerjali med seboj.

3.2.5.1.4 Določanje nukleotidnih zaporedij PRRSV

Nekaterim pomnoženim PCR produktom iz regije ORF 7, ki smo jih na AGE prepoznali kot pozitivne, smo za potrditev določili nukleotidna zaporedja z metodo po Sangerju (Macrogen, Nizozemska).

Dobljene kromatograme smo pregledali in uredili s pomočjo programov Seqman in Editseq, ki so del računalniškega paketa DNASTAR (Lasergene, ZDA). Urejena nukleotidna zaporedja smo preverili z iskanjem podobnih zaporedij v podatkovni zbirki NCBI GenBank s spletnim orodjem BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Kumar in sod., 2016). Prav tako smo podatke o nukleotidnih zaporedjih PRRSV iz drugih držav pridobili iz podatkovne zbirke NCBI GenBank.

3.2.5.2 Serološka analiza

Pri vseh individualnih vzorcih seruma, ter skupinskih vzorcih OF smo preverili morebitno prisotnost specifičnih protiteles proti PRRSV. Uporabili smo komercialni komplet diagnostičnih reagentov istega proizvajalca, in sicer Pigtype PRRS Ab in Pigtype PRRS Ab OF (Qiagen, Nemčija). Dokazovanje protiteles temelji na metodologiji indirektna ELISA. S testom istočasno dokazujemo prisotnost specifičnih protiteles različnih razredov proti obema genotipoma virusa. Mikroplošče smo spirali z avtomatskim spiralnikom AW1 (Anthos Labtec, Nizozemska), rezultate pa smo odčitali z optičnim s čitalcem HtII (Anthos Labtec, Nizozemska).

3.2.5.2.1 *Dokaz prisotnosti protiteles v individualnih vzorcih seruma in v skupinskih vzorcih OF*

Postopek smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca. Pred uporabo smo vse reagente segreti na sobno temperaturo, tj. od 18 do 25 °C. Z destilirano vodo smo pripravili 10-kratno razredčino komercialno pripravljene pufrice za izpiranje mikroplošč (angl. *automatic wash buffer*; AW (Qiagen, Nemčija)). Preiskovane vzorce seruma smo razredčili s komercialno pripravljeno raztopino za redčenje vzorcev v razmerju 1:40 in v razmerju 1:2 za vzorce OF (ne velja za kontrole). V 96-jamične mikroplošče smo nanесли po 100 µl razredčenega vzorca ali nerazredčene kontrole. Ploščo z vzorci seruma smo inkubirali 30 min, ploščo z vzorci OF pa 120 min, obe pri 18–25 °C. Jamice smo po inkubaciji 5× sprali s 300 µl predhodno pripravljene AW in odstranili odvečno tekočino. Sledili sta pipetiranje 100 µl konjugata in ponovna inkubacija 30 min ter 5-kratno spiranje mikroplošče s 300 µl AW. Nato smo v jamice nanесли 100 µl substrata in ploščo inkubirali 10 min v temnem prostoru pri 18 do 25 °C. Rezultat (optično gostoto, angl. *optical density*; OD) smo izmerili pri valovni dolžini 450 nm.

3.2.5.2.2 *Interpretacija rezultata*

Na podlagi vrednosti OD smo rezultat izračunali po formuli, ki primerja OD vzorca glede na popravek s povprečji OD pozitivne ($PC\bar{X}$) in negativne kontrole ($NC\bar{X}$), ki sta del diagnostičnega kompleta (angl.: *sample to positive ratio*; S/P), ki je za oba testa enaka.

$$S/P = \frac{OD_{vzorec} - NC\bar{X}}{PC\bar{X} - NC\bar{X}}$$

Pogoja za veljavnost testa sta:

$$PC\bar{X} - NC\bar{X} > 0.150$$

$$NC\bar{X} < 0.150$$

Rezultat testa se smatra kot pozitiven, če je razmerje S/P > 0.400.

3.2.6 Statistične metode za obdelavo rezultatov

Rezultate smo obdelali s pomočjo statističnega programa *R commander*. Za obdelavo smo uporabili model linearnih mešanih vplivov. Vplive smo razdelili na naključne, to sta bila skupina prašičev in individualna oznaka prašiča, ter na sistematske, ki so bili enaki tako za skupino živali kot za individualnega prašiča, to sta čas [t] (tedensko) in metoda aklimatizacije (naravna prekužitev z izpostavitvijo mladic viremičnim živalim in njihovim izločkom, naravna prekužitev s sočasno izpostavitvijo mladic viremičnim živalim in bombažnim vrvem, prepojenih z OF viremičnih živali, ter le z izpostavitvijo mladic bombažnim vrvem, prepojenih z OF viremičnih živali – vsaka izmed teh predstavlja posamezen način aklimatizacije, t. i. obravnavo (OBR). Ker so bile skupine mladic I in II, III in IV ter V in VI obravnavane z enako metodo prekužitve, smo jim pripisali tri regresijske koeficiente A (skupine mladic I in II), B (skupine mladic III in IV) ter C (skupine mladic V in VI). Rezultate smo analizirali z metodo dvostranska ANOVA (angl. *analysis of variance*). Pri tem smo analizirali vpliv variabilnih spremenljivk časa, načina aklimatizacije ter njune kombinacije, torej t, obr in $t*obr$. Kombinacije kvantitativne spremenljivke [t] in kvalitativne spremenljivke [obr] smo analizirali po metodi analize najmanjših kvadratov. Vplive teh variabilnih spremenljivk smo nato spremljali za vsak način dokazovanja virusne RNA in protiteles proti virusu za vsakega izmed dveh analiziranih odvzetih bioloških vzorcev, torej individualne vzorce seruma ali skupinski vzorec OF. Meja za statistično značilno spremembo smo določili pri $p < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 DOKAZOVANJE RNA PRRSV

Vse odvzete individualne in skupinske vzorce seruma in OF smo preiskali z metodo RT-PCR za dokaz virusne RNA. Dne 0 smo potrdili, da prispele živali s farme, na kateri PRRSV predhodno še ni bil dokazan, niso okužene s PRRSV.

4.1.1 Preliminarna skupina mladic

V preliminarni skupini mladic smo odvzeli in preiskali 10 vzorcev seruma tedensko (Tabela 3). Mladice v boksu niso bile individualno označene, temveč smo jih izbrali naključno. Glede na rezultate preliminarne raziskave smo prilagodili časovni okvir vzorčenja za nadaljnje skupine mladic v drugi in tretji fazi raziskave.

Tabela 3: Rezultati preiskav individualnih serumov in združenih individualnih vzorcev serumov ter OF na prisotnost RNA PRRSV z RT-PCR v preliminarni skupini mladic. Pozitivni rezultati so obarvani rdeče.

Table 3: Results of sera, serum pools and OF testing for PRRSV RNA with RT-PCR in preliminary group. Positive results are coloured red.

	DNI PO INFEKCIJI							
	0	7	14	21	28	35	42	49
ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV SERUMA (pozitivni/vsi preiskani)	0/10	9/10	nt	nt	nt	nt	nt	1/10
OF	neg	poz	poz	poz	poz	neg	poz	neg
združeni ind. vzorci serumov (<i>pool</i>)	neg	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg

nt = ni testirano, preiskani so bili individualni združeni vzorci serumov (*pool*)

V preliminarni skupini je bilo 7 DPI delež pozitivnih vzorcev seruma na prisotnost RNA PRRSV 90 % (9 od 10 mladic). V skupinskih vzorcih OF smo RNA PRRSV uspešno dokazali od 7 do 42 DPI, 35 DPI pa ne. Pri zadnjem vzorčenju (49 DPI) pri preliminarni skupini v nobenem od preiskovanih individualnih vzorcev seruma nismo dokazali prisotne RNA PRRSV, z izjemo enega individualnega vzorca seruma. Zadnji dan prav tako nismo dokazali RNA PRRSV v skupinskem vzorcu OF. Glede na zaostalo okužbo enega prašiča 49 DPI smo se odločili, da podaljšamo čas poskusa za 7 dni in individualno označimo prašiče ter vzorčimo

celo skupino 16 mladic, da bi lahko dobili podrobnejši vpogled v okužbo s PRRSV za vsako posamezno žival teden za tednom.

4.1.2 Skupina mladic I

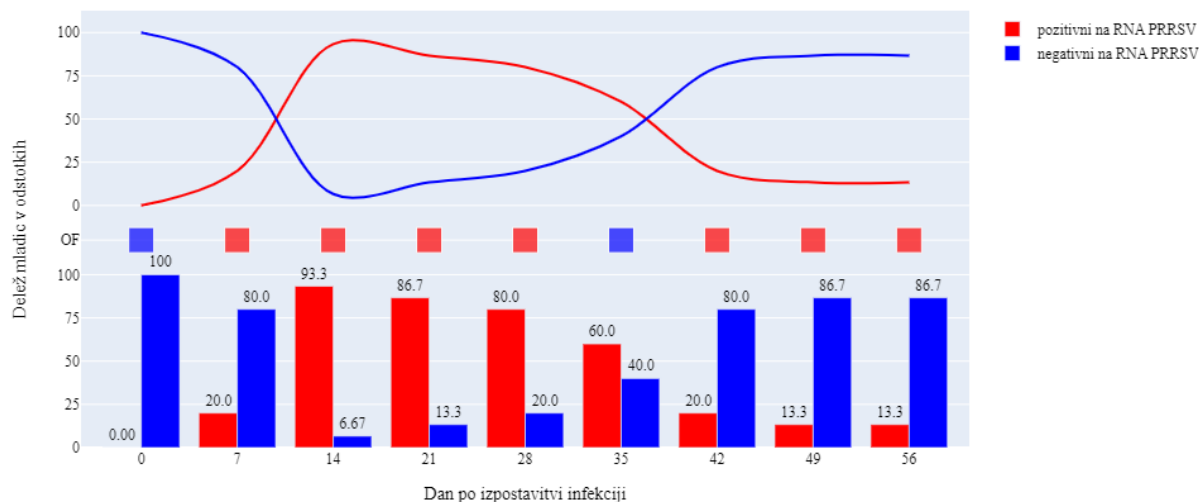
V skupini I smo 7 DPI dokazali RNA PRRSV pri 20 % mladic (3 od 15 mladic); ta delež je čez en teden narasel na 93 % (14 od 15 mladic). Nikoli v celotnem obdobju raziskave nismo v serumu hkrati dokazali prisotne virusne RNA pri vseh mladicah v skupini. Pri mladici številka 3 smo virusno RNA prvič dokazali šele 21 DPI. Pri 13 % mladic (2 od 15) smo dokazali prisotnost virusne RNA še 56 DPI. Kljub nizkem deležu v individualnih vzorcih je bilo prisotnost RNA PRRSV zaznati tudi v OF. 9 od 15 mladic je imelo enofazno viremijo, ostalih 6 je imelo dvofazno viremijo. Rezultati po tednih so prikazani v Tabeli 4 in na Sliki 11. Tekom izvajanja raziskave je poginila 1 mladica od 16.

Tabela 4: Rezultati preiskav individualnih vzorcev serumov in skupnega vzorca OF na prisotnost RNA PRRSV z RT-PCR v skupini mladic I. Pozitivni rezultati so obarvani rdeče.

Table 4: Results of sera and OF testing for PRRSV RNA with RT-PCR in group I. Positive results are coloured red.

		DNI PO INFEKCIJI								
		0	7	14	21	28	35	42	49	56
ŠTEVILKA MLADICE (SERUM)	1	neg	†	†	†	†	†	†	†	†
	2	neg	neg	poz	poz	poz	poz	neg	neg	neg
	3	neg	neg	neg	poz	poz	neg	poz	neg	neg
	4	neg	neg	poz	poz	neg	poz	poz	neg	neg
	5	neg	poz	poz	poz	poz	neg	neg	neg	neg
	6	neg	neg	poz	poz	poz	neg	neg	neg	neg
	7	neg	neg	poz	poz	poz	neg	neg	neg	neg
	8	neg	neg	poz	neg	poz	poz	poz	neg	poz
	9	neg	neg	poz	poz	poz	poz	neg	neg	neg
	10	neg	poz	poz	poz	poz	poz	neg	neg	neg
	11	neg	neg	poz	poz	poz	poz	neg	neg	neg
	12	neg	neg	poz	poz	poz	poz	neg	neg	neg
	13	neg	neg	poz	poz	neg	neg	neg	poz	neg
	14	neg	neg	poz	poz	poz	poz	neg	neg	neg
	15	neg	neg	poz	neg	neg	neg	neg	poz	neg
	16	neg	poz	poz	poz	poz	poz	neg	neg	poz
poz/vsi	0/16	3/15	14/15	13/15	12/15	9/15	3/15	2/15	2/15	
% poz	0	20,0	93,0	86,0	80,0	60,0	20,0	13,0	13,0	
OF	neg	poz	poz	poz	poz	neg	poz	poz	poz	

† pogin mladice



Slika 11: Delež pozitivnih in negativnih mladic iz skupine I na RNA PRRSV določenih z RT-PCR.

Figure 11: Percentage of PRRSV RNA positive and negative gilts from group I.

4.1.3 Skupina mladic II

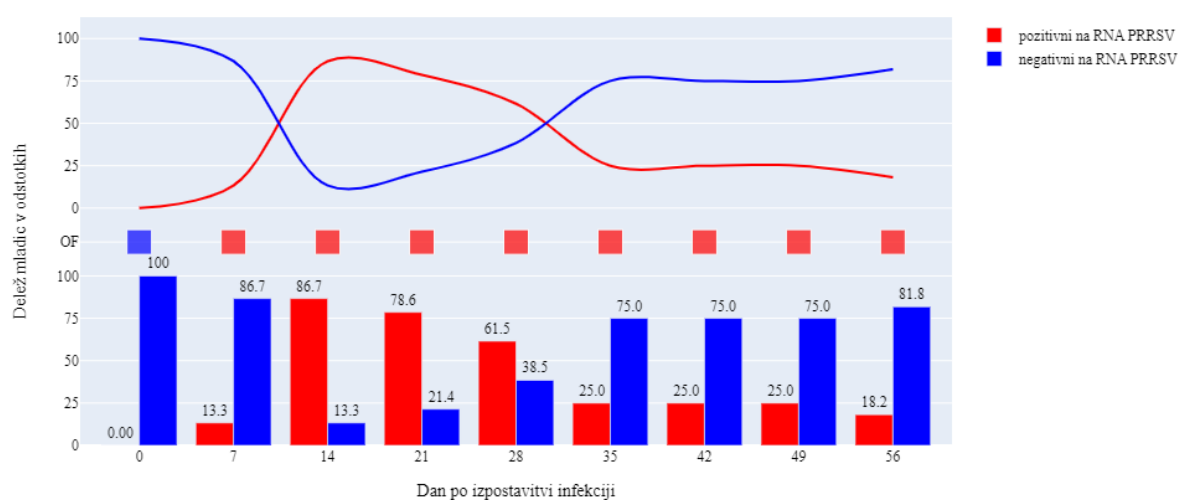
Pri mladicah iz skupine II smo 7 DPI virusno RNA v serumu dokazali pri 13,3 % mladic (2 od 15). Pri največjem deležu mladic smo virusno RNA dokazali 14 DPI, in sicer pri 86,7 %, oziroma pri 13 od 15 mladic. Pri mladici številka 11 smo virusno RNA v krvi prvič zaznali šele 35 DPI in to je bil tudi edini teden, ko smo pri tej živali zaznali viremijo. Pri mladici številka 2 smo virusno RNA dokazali le 14 DPI, po tem pa je bila žival neviremična vse do zadnjega dne vzorčenja, ko smo znova dokazali RNA PRRSV v njenem serumu. Viremija je pri 3 od 11 preživelih mladic do konca vzorčenja potekala enofazno, pri vseh ostalih dvofazno. Poginilo je 5 od 16 mladic. V OF smo virusno RNA dokazali neprekinjeno, vsak teden od 7 DPI do 56 DPI. Rezultati po tednih so prikazani v Tabeli 5 in na Sliki 12.

Tabela 5: Rezultati preiskav individualnih vzorcev serumov in skupnega vzorca OF na prisotnost RNA PRRSV z RT-PCR v skupini mladic II. Pozitivni rezultati so obarvani rdeče.

Table 5: Results of sera and OF testing for PRRSV RNA with RT-PCR in group II. Positive results are coloured red.

	DNI PO INFEKCIJI									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	
ŠTEVILKA MLADICE (SERUM)	1	neg	neg	poz	poz	†	†	†	†	†
	2	neg	neg	poz	neg	neg	neg	neg	neg	poz
	3	neg	neg	poz	poz	poz	†	†	†	†
	4	neg	neg	poz	poz	poz	poz	poz	poz	†
	5	neg	neg	poz	poz	poz	neg	poz	neg	neg
	6	neg	poz	poz	neg	poz	neg	neg	neg	neg
	7	neg	neg	poz	poz	poz	neg	neg	poz	neg
	8	neg	†	†	†	†	†	†	†	†
	9	neg	neg	neg	poz	poz	neg	neg	neg	neg
	10	neg	neg	poz	poz	poz	neg	neg	neg	neg
	11	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	neg	neg
	12	neg	neg	poz	poz	neg	poz	neg	neg	poz
	13	neg	neg	poz	poz	poz	neg	neg	poz	neg
	14	neg	neg	poz	†	†	†	†	†	†
	15	neg	poz	poz	poz	neg	neg	poz	neg	neg
	16	neg	neg	poz	poz	neg	neg	neg	neg	neg
poz/vsi	0/16	2/15	13/15	11/14	9/13	3/12	3/12	3/12	2/11	
% poz	0	13,3	86,7	78,6	69,2	25,0	25,0	25,0	18,2	
OF	neg	poz	poz	poz	poz	poz	poz	poz	poz	

† pogin mladic



Slika 12: Delež pozitivnih in negativnih mladic iz skupine II na RNA PRRSV določenih z RT-PCR.

Figure 12: Percentage of PRRSV RNA positive and negative gilts from group II.

4.1.4 Skupina mladic III

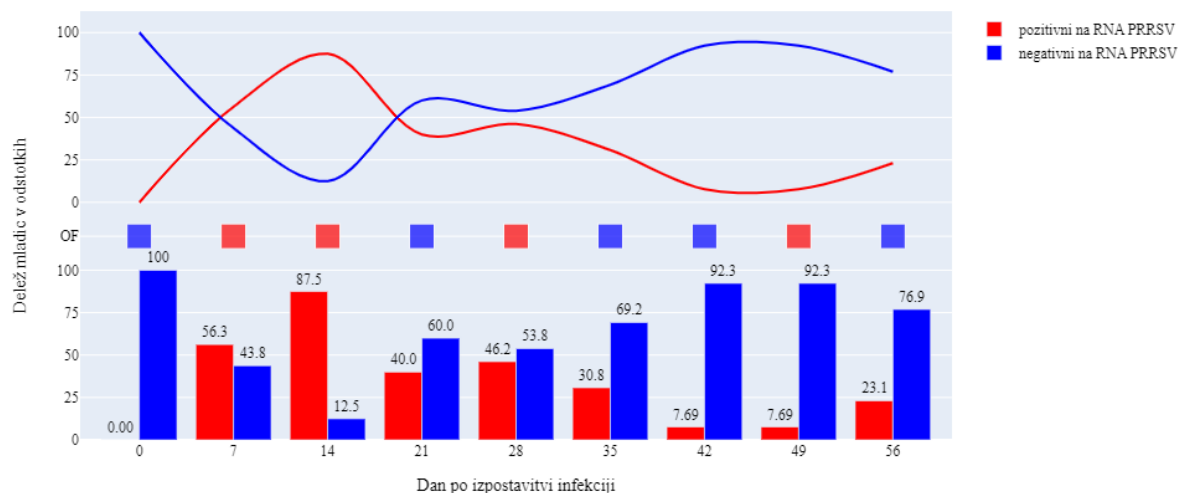
V skupini III smo mladice od dneva uhlevitve (DPI 0) do 21 DPI v boks za žvečenje namestili od 3 do 4 vrvi prepojene z OF mladice iz I in II skupine. V prvem tednu, 7 DPI, smo RNA PRRSV v serumu dokazali pri 62,5 % mladic, oziroma pri 10 od 16 mladic. V serumu smo pri največ mladice virusno RNA dokazali 14 DPI, pri 87,5 %, oziroma pri 14 od 16 mladic. Do 14 DPI smo že pri vsaki mladici vsaj enkrat uspeli dokazati RNA PRRSV v serumu. Opazno je bilo izrazito nihanje pri detekciji virusne RNA v vzorcih OF. V 5 od 9 vzorcev OF virusne RNA nismo dokazali, na primer tudi ne 21 DPI, ko je bila PRRSV RNA pri 40 % mladic v serumu. Pri 4 od 13 mladic, je bila viremija enofazna, pri vseh ostalih je bila dvofazna. V času našega poskusa so poginile 3 mladice. Rezultati po tednih so prikazani v Tabeli 6 in na Sliki 13.

Tabela 6: Rezultati preiskav individualnih vzorcev serumov in skupnega vzorca OF na prisotnost RNA PRRS z RT-PCR v skupini III. Pozitivni rezultati so obarvani rdeče.

Table 6: Results of sera and OF testing for PRRSV RNA with RT-PCR in group III. Positive results are coloured red.

	DNI PO INFEKCIJI									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	
ŠTEVILKA MLADICE (SERUM)	1	neg	poz	poz	neg	poz	neg	neg	neg	neg
	2	neg	neg	poz	neg	neg	poz	neg	neg	poz
	3	neg	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
	4	neg	poz	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg
	5	neg	poz	poz	poz	neg	neg	neg	neg	neg
	6	neg	neg	poz	†	†	†	†	†	†
	7	neg	poz	neg	neg	†	†	†	†	†
	8	neg	neg	poz	neg	poz	poz	neg	neg	neg
	9	neg	poz	poz	neg	neg	poz	neg	neg	neg
	10	neg	poz	poz	poz	neg	poz	neg	neg	neg
	11	neg	poz	poz	neg	poz	neg	neg	neg	neg
	12	neg	neg	poz	poz	neg	neg	neg	neg	neg
	13	neg	poz	poz	poz	poz	neg	neg	neg	poz
	14	neg	neg	poz	poz	†	†	†	†	†
	15	neg	neg	poz	poz	poz	neg	poz	poz	poz
	16	neg	neg	poz	neg	poz	neg	neg	neg	neg
poz/vsi	0/16	10/16	14/16	6/15	6/13	4/13	1/13	1/13	3/13	
% poz	0	62,5	87,5	40,0	46,2	30,8	7,7	7,7	23,1	
OF	neg	poz	poz	neg	poz	neg	neg	poz	neg	

† pogin mladice



Slika 13: Delež pozitivnih in negativnih mladic iz skupine III na RNA PRRSV določenih z RT-PCR.

Figure 13: Percentage of PRRSV RNA positive and negative gilts from group III.

4.1.5 Skupina mladic IV

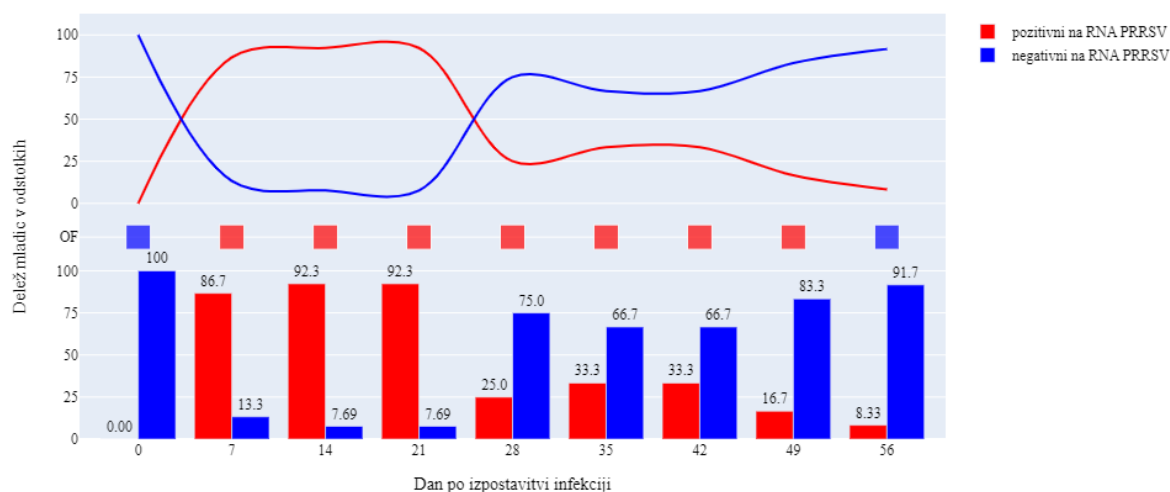
Enako kot v skupini III, smo tudi pri skupini IV od dneva uhlevitve (DPI 0) do 21 DPI mladicam v boks za žvečenje namestili od 3 do 4 vrvi, prepojene z OF mladic iz I in II skupine. Pri skupini IV smo 7 DPI virusno RNA v serumu dokazali pri 86,7 % mladic (13 od 15), kar je največ med vsemi skupinami. Do 14 DPI smo že pri vsaki mladici vsaj enkrat uspeli dokazati virusno RNA PRRSV v serumu, prav tako pa je bil 14 DPI dokazan največji delež mladic, pri katerih smo istočasno v serumu dokazali prisotnost PRRSV RNA, in sicer pri 92,3 % (12 od 13 mladic). PRRSV RNA je bila 56 DPI v serumu prisotna le še pri eni mladici. V vzorcu OF smo tedensko dokazali prisotnost RNA PRRSV, pri zadnjem vzorčenju 56 DPI pa PRRSV RNA nismo več dokazali. Bifazno viremijo smo tekom detekcije RNA PRRSV v serumu opazili pri 9 od 12 mladic. Poginile so 4 mladice. Rezultati po tednih so prikazani v Tabeli 7 in na Sliki 14.

Tabela 7: Rezultati preiskav individualnih vzorcev serumov in skupnega vzorca OF na prisotnost RNA PRRS z RT-PCR v skupini IV. Pozitivni rezultati so obarvani rdeče.

Table 7: Results of sera and OF testing for PRRSV RNA with RT-PCR in group IV. Positive results are coloured red.

	DNI PO INFEKCIJI									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	
ŠTEVILKA MLADICE (SERUM)	1	neg	neg	poz	poz	neg	neg	poz	poz	poz
	2	neg	poz	poz	poz	poz	poz	neg	neg	neg
	3	neg	neg	poz	poz	neg	poz	neg	neg	neg
	4	neg	†	†	†	†	†	†	†	†
	5	neg	poz	poz	poz	neg	neg	poz	neg	neg
	6	neg	poz	poz	poz	neg	neg	neg	neg	neg
	7	neg	poz	†	†	†	†	†	†	†
	8	neg	poz	poz	poz	poz	neg	neg	poz	neg
	9	neg	poz	poz	poz	neg	neg	neg	neg	neg
	10	neg	poz	neg	neg	poz	neg	neg	neg	neg
	11	neg	poz	poz	poz	neg	neg	neg	neg	neg
	12	neg	poz	poz	poz	neg	neg	poz	neg	neg
	13	neg	poz	poz	poz	†	†	†	†	†
	14	neg	poz	†	†	†	†	†	†	†
	15	neg	poz	poz	poz	neg	poz	neg	neg	neg
	16	neg	poz	poz	poz	neg	poz	poz	neg	neg
poz/vsi	0/16	13/15	12/13	12/13	3/12	4/12	4/12	2/12	1/12	
% poz	0	86,7	92,3	92,3	25,0	33,3	33,3	16,7	8,3	
OF	neg	poz	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg	

† pogin mladice



Slika 14: Delež pozitivnih in negativnih mladice iz skupine IV na RNA PRRSV določenih z RT-PCR.

Figure 14: Percentage of PRRSV RNA positive and negative gilts from group IV.

4.1.6 Skupini mladic V in VI

Mladicam iz skupin V in VI smo v bokse namestili bombažne vrvi, prepojene z OF prašičev iz skupin od I do IV, pri katerih smo dokazali PRRSV. Razen vrvi, mladice niso imele stika s PRRSV okuženimi prašiči ali kužnino.

Individualnih preiskav seruma z metodo RT-PCR nismo izvedli, ker z indirektno ELISA specifičnih protiteles proti PRRSV v serumu nismo dokazali, razen pri mladici številka 7 iz skupine VI. Pri tej mladici v individualnem vzorcu nismo uspeli dokazati RNA PRRSV. Na prisotnost RNA PRRSV smo preiskali vse skupinske vzorce OF in vsi so bili negativni, zato vseh individualnih vzorcev seruma nismo preiskali na prisotnost RNA PRRSV.

4.1.7 RT-PCR v realnem času za vzorce OF iz vrvi uporabljenih za prekuževanje mladic

Z metodo RT-PCR v realnem času smo ugotavljali prisotnost RNA PRRSV v vzorcih OF iz kontaminiranih vrvi, ki smo jih uporabili za aklimatizacijo mladic iz skupin V in VI. V tabeli 8 so prikazani rezultati iz dveh različnih laboratorijev z dvema različnima komercialnima diagnostičnima kompletoma reagentov.

Tabela 8: Vrednosti Ct vzorcev OF iz vrvi za aklimatizacijo mladic z metodo qRT-PCR s komercialnim kompletom diagnostičnih reagentov proizvajalca Virotype (Qiagen, Nemčija) (sonda FAM) ter s komercialnim kompletom diagnostičnih reagentov proizvajalca Vetmax (Thermo Fischer Scientific, ZDA) (Sonda HEX). Vzorce s Ct < 37 smo opredelili kot pozitivne.

Table 8: Ct values of samples tested with qRT-PCR Virotype (Qiagen, Germany) commercial kit (FAM probe) or with Vetmax (Thermo Fischer Scientific, ZDA) commercial kit (HEX probe). Ct values under 37 are deemed positive.

		DNI PO INFEKCIJI				
SKUPINA MLADIC (OF)		7	14	21	28	pool
VIROTYPE	I	28,22	27,28	nt	nt	31,57
	II	27,97	27,62	nt	nt	30,62
	III	nt	32,59	27,79	nt	32,62
	IV	nt	28,91	nt	33,96	29,91
VETMAX	I	31,02	30,58	33,17	nt	nt
	II	40	32,01	39,39	nt	nt
	III	nt	37,1	nt	nt	nt
	IV	nt	nt	nt	nt	nt

nt = ni testirano

4.1.8 Določanje nukleotidnega zaporedja dela genoma PRRSV

Iz vsake skupine mladic, od I do IV, vključno s preliminarno skupino, smo enemu skupinskemu vzorcu OF z metodo po Sangerju določili nukleotidno zaporedja dela genoma. Pomnoženi produkti so bili dolgi 291 bp. Po primerjavi dobljenih zaporedij z objavljenimi

zaporedji v genski banki GenBank smo potrdili, da zaporedja pripadajo PRRSV-1 in med podtipi 1, ki so najznačilnejši za zahodno in srednjeevropsko regijo. Izolati so se med seboj razlikovali v enem ali dveh nt parih na področju dolžine sekvence, kar pomeni od 99,3- do 99,7-odstotno identičnost.

4.2 DOKAZOVANJE SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI PRRSV

4.2.1 Preliminarna skupina mladic

V preliminarni skupini mladic smo z ELISA dokazali pojav specifičnih protiteles 14 DPI, ko je bilo pozitivnih 80 % mladic. Pri vseh mladicah smo 21 DPI dokazali specifična protitelesa, ki so nato vztrajala skozi celoten poskus z izjemo pri eni mladici, pri kateri 42 DPI nismo več dokazali specifičnih protiteles. Pri skupinskih vzorcih OF smo že na dan 0 ugotovili prisotnost specifičnih protiteles. Vrednosti S/P za vse mladice iz preliminarne skupine so prikazane v Tabeli 9.

Tabela 9: S/P vrednosti individualnih vzorcev seruma in njihova povprečna vrednost ter S/P vrednosti skupinskih vzorcev OF v preliminarni skupini mladic. Pozitivni rezultati so obarvani rdeče.

Table 9: S/P ratio of individual serum samples, their mean value and and S/P values of group OF samples of preliminary group. Positive results are coloured red.

		DNI PO INFEKCIJI							
		0	7	14	21	28	35	42	49
ŠTEVILKA MLADICE (SERUM)	1	0,02	0,25	0,08	2,31	2,47	2,60	2,62	2,58
	2	0,09	0,20	2,20	1,82	2,77	2,67	3,00	2,55
	3	0,38	0,04	2,61	2,58	2,34	2,62	-0,12	2,02
	4	0,05	0,00	1,84	1,31	2,88	2,66	3,15	2,54
	5	0,04	0,10	2,32	2,39	2,85	2,88	2,81	2,11
	6	0,08	0,23	0,41	2,09	2,36	3,22	2,85	2,09
	7	0,07	0,07	1,54	2,72	2,66	2,38	2,03	2,45
	8	0,16	0,12	1,90	2,80	3,05	2,64	2,50	2,57
	9	0,27	0,14	2,82	2,50	2,83	2,80	2,64	2,45
	10	-0,02	0,21	0,33	2,74	2,73	3,00	2,50	1,68
poz/vsi		0/10	0/10	8/10	10/10	10/10	10/10	9/10	10/10
% poz		0	0	80,0	100	100	100	90	100
$\overline{S/P}$ serum		0,11	0,14	1,60	2,33	2,69	2,75	2,40	2,30
S/P OF		0,52	0,98	3,03	4,74	4,28	5,31	4,23	2,93

4.2.2 Skupini mladic I in II

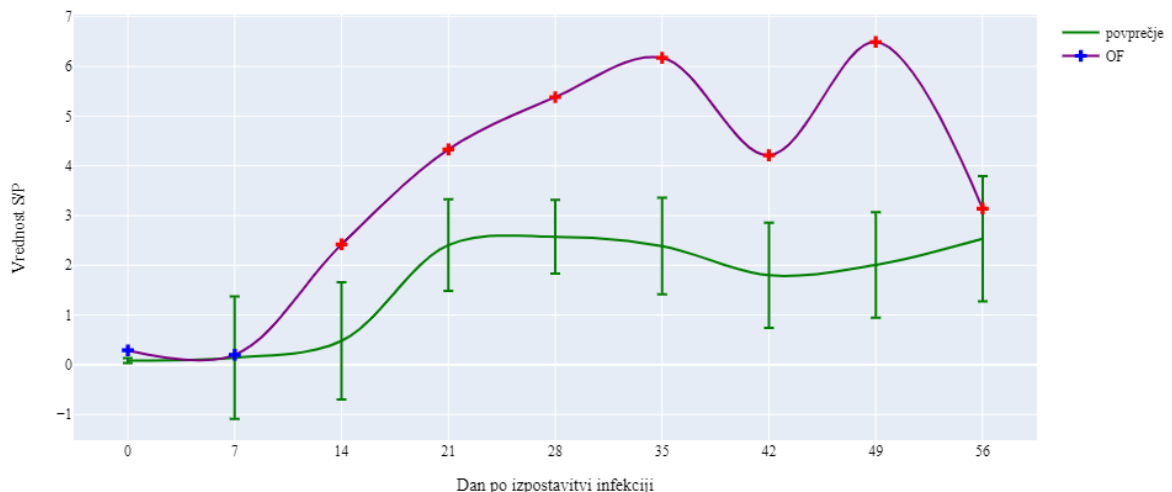
V skupini I smo 7 DPI pri mladici številka 5 dokazali specifična protitelesa. Glede na vrednost S/P 14 DPI smo pri 26,7 % mladic (4 od 15 mladic) dokazali prisotnost specifičnih protiteles v serumu. Pri mladci št. 14 smo specifična protitelesa dokazali šele 35 DPI. Zadnji dan poskusa smo pri vseh 15. mladicah dokazali specifična protitelesa proti PRRSV. V OF smo potrdili prisotnost specifičnih protiteles od 14 DPI dalje. Vse vrednosti S/P za mladice v skupini I so prikazane v Tabeli 10 in na Sliki 15.

Tabela 10: Vrednosti S/P pri individualnih vzorcih seruma ter pri skupinskih vzorcih OF v skupini mladice I. Pozitivni rezultati so obarvani rdeče.

Table 10: S/P ratio of individual serum samples, their mean value and S/P values of group OF samples of group I. Positive results are coloured red.

	DNI PO INFEKCIJI									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	
ŠTEVILKA MLADICE (SERUM)	1	0,15	†	†	†	†	†	†	†	†
	2	0,08	0,26	0,06	2,24	2,87	2,43	1,07	2,47	3,45
	3	-0,13	0,01	-0,03	2,45	2,69	2,64	2,00	2,14	2,53
	4	0,15	0,19	0,35	1,79	2,55	2,12	0,61	2,03	2,14
	5	0,35	0,43	1,93	2,78	2,17	1,76	1,30	1,85	1,78
	6	0,14	0,03	-0,01	2,34	2,46	2,19	1,85	1,29	1,86
	7	-0,14	0,04	2,38	3,21	2,52	2,01	1,88	2,34	1,73
	8	-0,19	0,04	1,30	2,39	2,76	2,25	2,49	1,80	2,74
	9	0,34	0,20	0,17	2,82	3,22	3,02	2,47	2,61	3,06
	10	0,17	0,21	0,12	2,91	3,00	2,21	1,70	1,58	2,30
	11	-0,08	-0,01	0,03	2,57	3,03	2,68	1,73	2,22	2,92
	12	0,05	0,20	0,07	2,30	2,87	2,53	1,73	1,82	3,27
	13	0,22	0,22	0,25	2,74	2,75	2,68	2,43	2,42	3,24
	14	0,10	0,03	0,03	0,05	0,00	2,13	1,62	1,49	2,21
	15	0,02	0,05	0,01	2,98	3,01	2,73	2,45	1,48	3,10
	16	0,12	0,22	0,56	2,53	2,68	2,40	1,66	2,56	1,69
poz/vsi	0/16	1/15	4/15	14/15	14/15	15/15	15/15	15/15	15/15	
% poz	0	6,7	26,7	93,3	93,3	100	100	100	100	
$\overline{S/P}$ serum	0,08	0,14	0,48	2,41	2,57	2,39	1,80	2,01	2,53	
S/P OF	0,29	0,20	2,42	4,33	5,38	6,17	4,21	6,49	3,14	

† pogin mladice



Slika 15: Prikaz nivoja protiteles v individualnih vzorcih seruma s standardnimi napakami v primerjavi s skupinskimi vzorci OF v času trajanja poskusa v skupini mladice I.

Figure 15: Presentation of results of serological monitoring of individual sera samples with standard deviations vs OF samples, average per week in group I.

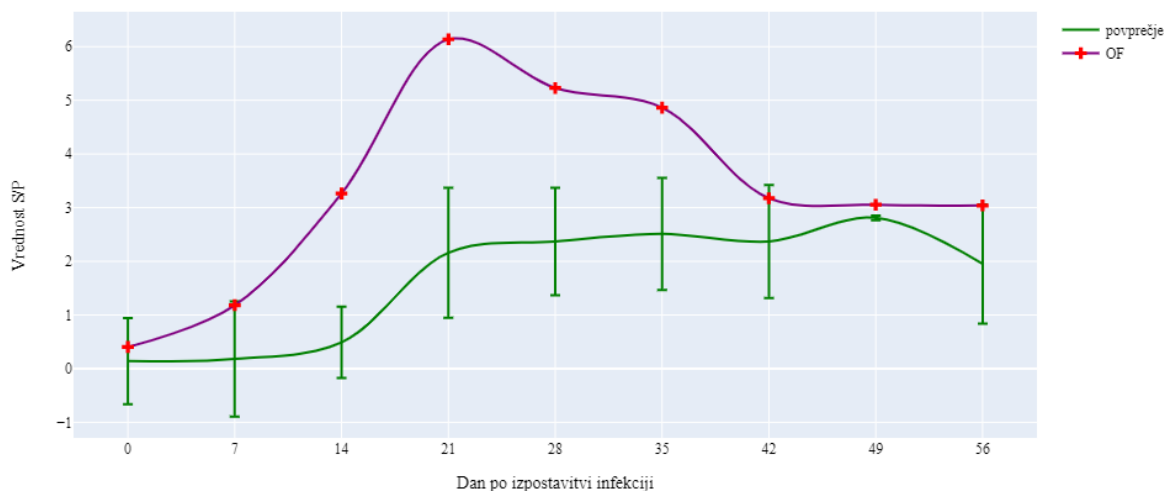
Pri mladiceh iz skupine II smo 7 DPI pri eni mladici (6,7 %) dokazali specifična protitelesa proti PRRSV. Pojav specifičnih protiteles 14 DPI smo pojav specifičnih protiteles v serumu dokazali še pri 26,7 % mladice (4 od 15 mladice). V serumskih vzorcih smo 21 DPI dokazali specifična protitelesa pri vseh živalih v skupini II. V OF je bila že na dan prihoda mladice iz te skupine vrednost S/P nad mejo, ki določa dokaz specifičnih protiteles, kar pa se je nadaljevalo v vseh skupinskih vzorcih OF v trajanju poskusa. Vrednosti S/P za vzorce seruma in OF mladice skupine II so prikazane v Tabeli 11 in na Sliki 16.

Tabela 11: Vrednosti S/P pri individualnih vzorcih seruma ter pri skupinskih vzorcih OF v skupini mladice II. Pozitivni rezultati so obarvani rdeče.

Table 11: S/P ratio of individual serum samples, their mean value and S/P values of group OF samples of group II. Positive results are coloured red.

	DNI PO INFEKCIJI									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	
ŠTEVILKA MLADICE (SERUM)	1	0,35	0,46	0,01	2,60	†	†	†	†	†
	2	-0,01	0,04	0,01	2,45	2,28	2,28	2,46	2,29	1,77
	3	0,08	0,15	0,31	0,66	2,16	†	†	†	†
	4	0,18	0,14	0,20	2,42	2,56	2,53	2,70	2,61	†
	5	0,11	0,37	1,07	1,72	2,45	2,23	2,14	3,32	2,55
	6	0,29	0,42	1,08	2,44	2,44	2,71	2,42	3,52	2,45
	7	0,11	0,23	0,45	1,78	2,42	2,82	2,13	3,00	1,98
	8	-0,14	†	†	†	†	†	†	†	†
	9	0,26	0,11	0,31	1,58	2,91	2,76	2,00	3,06	1,85
	10	0,12	0,03	0,01	2,50	1,34	2,70	2,94	3,23	2,13
	11	0,15	-0,02	0,10	2,58	2,49	2,43	1,88	2,56	1,85
	12	0,05	0,07	0,40	2,44	2,28	2,36	2,69	2,52	1,93
	13	0,20	0,12	0,22	2,20	2,53	2,38	1,97	3,06	1,80
	14	0,24	0,16	0,28	†	†	†	†	†	†
	15	0,17	0,21	2,49	3,05	2,56	2,55	2,52	2,65	1,84
	16	0,10	0,21	0,45	1,85	2,41	2,36	2,58	1,93	1,27
poz/vsi	0/16	1/15	5/15	14/14	13/13	12/12	12/12	12/12	11/11	
% poz	0	6,7	33,3	100	100	100	100	100	100	
$\overline{S/P}$ serum	0,14	0,18	0,49	2,16	2,37	2,51	2,37	2,81	1,95	
S/P OF	0,40	1,18	3,26	6,14	5,23	4,86	3,18	3,05	3,04	

† pogin mladice



Slika 16: Prikaz nivoja protiteles v individualnih vzorcih seruma s standardnimi napakami v primerjavi s skupinskimi vzorci OF v času trajanja poskusa v skupini mladic II.

Figure 16: Presentation of results of serological monitoring of individual sera samples with standard deviations vs OF samples, average per week in group II.

4.2.3 Skupini mladic III in IV

V skupini III in v skupini IV smo poleg naravnega prekuževanja prve 4 tedne mladitvam dodajali kužnino v obliki vrvi, prepojenih z OF prašičev, pri katerih smo dokazali prisotnost RNA PRRSV.

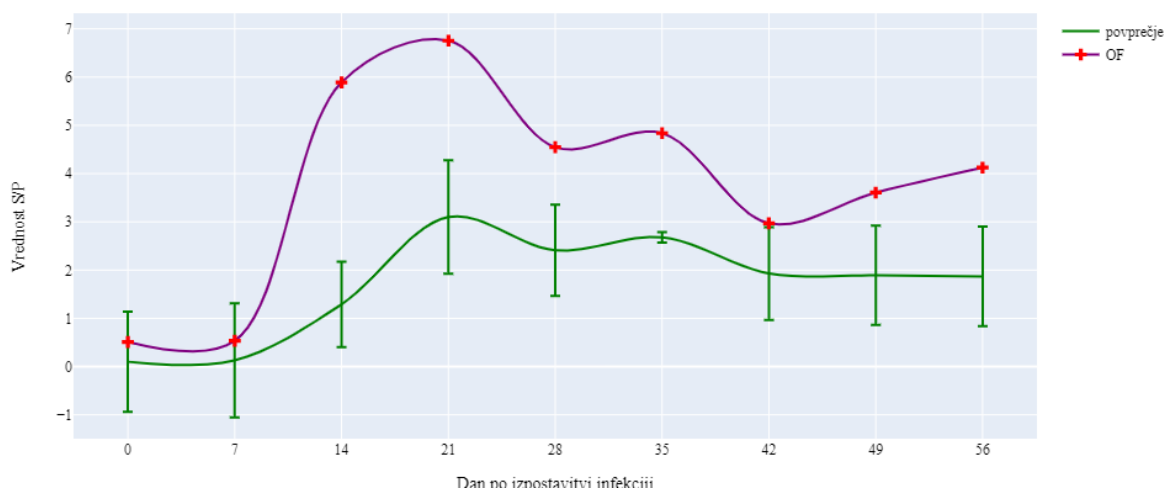
Pri skupini mladic III smo 7 DPI dokazali prisotnost specifičnih protiteles v serumu pri 18,8 % mladic (3 od 16). Pri 62,2% mladic (10 od 15) smo protitelesa v serumu dokazali 14 DPI. Od 21 DPI dalje smo pri vseh mladitvah v skupini dokazovali specifična protitelesa v serumu. Pri preiskavah skupinskih vzorcev OF smo v vseh vzorcih dokazali prisotnost specifičnih protiteles. Vse vrednosti S/P za mladice III so prikazane v Tabeli 12 in na Sliki 17.

Tabela 12: Vrednosti S/P pri individualnih vzorcih seruma ter pri skupinskih vzorcih OF v skupini mladic III. Pozitivni rezultati so obarvani rdeče.

Table 12: S/P ratio of individual serum samples, their mean value and S/P values of group OF samples of group III. Positive results are coloured red.

ŠTEVILKA MLADICE (SERUM)	DNI PO INFEKCIJI									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	
1	0,10	0,38	1,41	3,11	2,46	2,91	2,53	2,43	2,62	
2	0,19	-0,02	0,07	3,12	2,72	2,95	2,05	1,71	1,38	
3	0,40	0,52	2,43	2,87	2,48	2,94	1,97	1,70	1,46	
4	0,09	0,09	2,70	3,58	2,85	3,12	2,16	2,20	1,66	
5	0,24	0,09	1,82	2,97	2,17	2,56	2,04	2,22	2,41	
6	0,12	-0,02	0,34	†	†	†	†	†	†	
7	0,00	0,08	0,27	3,09	†	†	†	†	†	
8	-0,01	0,44	2,18	3,22	2,45	3,13	2,06	1,95	1,63	
9	0,14	0,01	1,82	3,16	1,89	3,07	1,88	1,99	2,08	
10	0,06	0,12	0,46	2,93	2,33	2,26	1,52	1,72	2,06	
11	0,12	-0,06	2,25	2,74	2,16	2,17	1,87	1,74	2,31	
12	0,01	-0,01	0,37	2,99	2,40	2,14	1,55	1,42	1,88	
13	0,01	0,05	0,16	3,66	2,55	2,44	1,65	1,59	1,48	
14	0,08	0,49	2,61	2,95	†	†	†	†	†	
15	0,03	0,00	0,18	2,90	2,64	2,64	2,05	1,94	2,24	
16	0,07	-0,04	1,54	3,20	2,23	2,51	1,81	1,90	1,15	
poz/vsi	0/16	3/16	10/16	15/15	13/13	13/13	13/13	13/13	13/13	
% poz	0	18,8	62,5	100	100	100	100	100	100	
$\overline{S/P}$ serum	0,10	0,13	1,29	3,10	2,41	2,68	1,93	1,89	1,87	
S/P OF	0,51	0,53	5,89	6,76	4,55	4,84	2,97	3,61	4,12	

† pogin mladice



Slika 17: Prikaz nivoja protiteles v individualnih vzorcih seruma s standardnimi napakami v primerjavi s skupinskimi vzorci OF v času trajanja poskusa v skupini mladic III.

Figure 17: Presentation of results of serological monitoring of individual sera samples with standard deviations vs OF samples, average per week in group III.

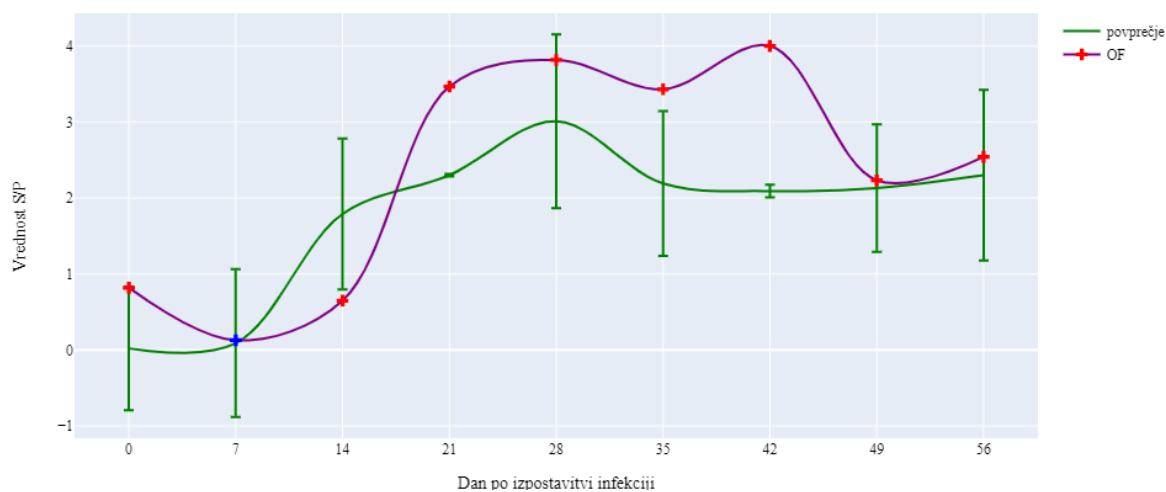
Pri mladicah iz skupine IV smo 14 DPI dokazali prisotnost specifičnih protiteles v serumu pri 92,3% mladic, oziroma pri 12 od 13 mladic. Od 21 DPI dalje pa smo specifična protitelesa v serumu dokazali pri vseh mladicah. V OF smo že na dan 0 ugotovili prisotnost specifičnih protiteles, nato pa 7 DPI specifičnih protiteles v vzorcu OF nismo dokazali. V vseh nadaljnjih preiskanih vzorcih OF smo nato do konca preiskave dokazali prisotnost specifičnih protiteles. Vse vrednosti S/P za mladice skupine IV so prikazane v Tabeli 13 in na Sliki 18.

Tabela 13: Vrednosti S/P pri individualnih vzorcih seruma ter pri skupinskih vzorcih OF v skupini mladic IV. Pozitivni rezultati so obarvani rdeče.

Table 13: S/P ratio of individual serum samples, their mean value and S/P values of group OF samples of group IV. Positive results are coloured red.

	DNI PO INFEKCIJI									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	
ŠTEVILKA MLADICE (SERUM)	1	0,00	0,03	0,30	1,95	2,27	1,56	1,50	1,61	1,69
	2	0,12	0,19	2,68	2,67	2,81	1,76	2,00	2,24	2,39
	3	-0,05	-0,03	0,44	1,87	2,96	1,98	1,80	1,60	2,18
	4	-0,05	†	†	†	†	†	†	†	†
	5	0,03	0,07	2,28	2,64	3,41	2,55	2,54	2,71	2,83
	6	-0,04	-0,01	2,01	1,74	3,07	2,02	1,97	1,86	2,02
	7	0,20	0,20	†	†	†	†	†	†	†
	8	0,04	0,07	0,82	1,94	2,49	2,10	1,64	1,61	1,95
	9	0,03	0,15	2,95	2,74	3,32	2,51	2,47	2,67	1,94
	10	-0,08	-0,01	1,59	2,27	2,63	2,03	1,65	1,36	1,49
	11	-0,07	-0,09	2,92	2,35	3,34	2,33	2,29	2,46	2,61
	12	-0,02	0,12	2,01	2,44	3,24	2,30	2,14	2,29	2,42
	13	-0,01	0,06	1,04	2,00	†	†	†	†	†
	14	0,04	0,47	†	†	†	†	†	†	†
	15	0,10	0,12	3,19	2,40	3,38	2,46	2,35	2,49	2,97
	16	0,00	0,05	0,99	2,95	3,15	2,61	2,68	2,62	3,13
poz/vsi	0/16	1/15	12/13	13/13	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	
% poz	0	6,7	92,3	100	100	100	100	100	100	
$\overline{S/P}$ serum	0,02	0,09	1,79	2,30	3,01	2,19	2,09	2,13	2,30	
S/P OF	0,82	0,13	0,65	3,47	3,82	3,43	4,00	2,23	2,54	

† pogin mladice



Slika 18: Prikaz nivoja protiteles v individualnih vzorcih seruma s standardnimi napakami v primerjavi s skupinskimi vzorci OF v času trajanja poskusa v skupini mladic IV.

Figure 18: Presentation of results of serological monitoring of individual sera samples with standard deviations vs OF samples, average per week in group IV.

4.2.4 Skupini mladic V in VI

Pri skupinah V in VI specifičnih protiteles v vzorcih seruma z izjemo ene mladice nismo dokazali. Pri mladici številka 7 iz skupine VI smo od 7 DPI dalje v serumu dokazali prisotnost specifičnih protiteles, ugotovili smo tudi klinično znamenje, in sicer unilateralni konjunktivitis, ki je vztrajal od drugega do zadnjega vzorčenja. Specifičnih protiteles nismo ugotovili v nobenem skupinskem vzorcu OF. Poskus smo pri vseh skupinah mladic predčasno prekinili, ker tekom poskusa nismo pri nobeni od ostalih živali uspeli dokazati niti protiteles niti virusne RNA PRRSV. Vse vrednosti S/P za mladice iz skupine V, oziroma iz skupine VI, so prikazane v Tabelah 14 in 15.

Tabela 14: Vrednosti S/P pri individualnih vzorcih seruma ter pri skupinskih vzorcih OF v skupini mladic V. Pozitivni rezultati so prikazani rdeče.

Table 14: S/P ratio of individual serum samples, their mean value and S/P values of group OF samples of group V. Positive results are coloured red.

	DNI PO INFEKCIJI							
	0	7	14	21	28	35	42	
ŠTEVILKA MLADICE (SERUM)	1	0,05	0,10	0,05	0,03	0,03	0,08	0,00
	2	0,10	0,12	0,07	0,06	0,02	0,04	-0,02
	3	0,16	0,14	0,05	0,08	0,00	0,04	-0,01
	4	0,10	0,15	0,06	0,05	0,03	0,03	0,01
	5	0,06	0,10	0,07	0,05	0,14	0,11	0,05
	6	0,08	0,07	0,04	0,04	0,03	0,05	0,01
	7	0,10	0,16	0,15	0,09	0,07	0,06	0,07
	8	0,01	0,06	0,04	0,03	0,00	0,01	0,01
	9	0,05	0,09	0,02	0,01	0,03	0,07	0,01
	10	0,10	0,10	0,10	0,08	0,03	0,06	0,01
	11	0,02	0,07	0,06	0,01	0,01	0,00	0,01
	12	0,01	0,04	0,05	0,05	0,09	0,03	0,02
	13	0,00	0,16	0,12	0,10	0,05	0,16	0,05
	14	0,08	0,25	0,21	0,20	0,21	0,24	0,08
	15	0,02	0,06	0,06	0,02	0,03	0,00	0,01
	16	-0,02	0,01	0,00	0,02	0,01	0,03	0,02
$\overline{S/P}$ serum	0,06	0,10	0,07	0,06	0,05	0,06	0,02	
S/P OF	0,31	0,24	0,11	-0,02	0,15	-0,01	0,28	

Tabela 15: Vrednosti S/P pri individualnih vzorcih seruma ter pri skupinskih vzorcih OF v skupini mladic VI. Pozitivni rezultati so prikazani rdeče.

Table 15: S/P ratio of individual serum samples, their mean value and S/P values of group OF samples of group VI. Positive results are coloured red.

	DNI PO INFEKCIJI					
	0	7	14	21	28	
ŠTEVILKA MLADICE (SERUM)	1	-0,01	-0,01	0,05	0,24	0,10
	2	0,01	-0,04	-0,01	0,13	0,05
	3	0,04	0,03	0,00	0,17	0,00
	4	0,00	-0,02	0,04	0,10	-0,01
	5	0,32	0,32	0,27	-0,06	0,18
	6	0,02	0,06	0,03	0,08	0,03
	7	0,15	0,73	0,89	1,15	0,54
	8	0,23	0,19	0,16	0,22	0,06
	9	0,01	0,03	0,07	0,07	0,02
	10	-0,05	0,00	-0,04	-0,02	-0,01
	11	-0,04	-0,04	-0,05	0,01	-0,02
	12	-0,02	-0,02	-0,05	0,00	0,04
	13	0,06	0,01	0,02	0,06	0,11
	14	0,03	-0,01	0,01	0,09	0,07
	15	-0,01	0,02	-0,03	0,01	-0,01
	16	-0,01	-0,01	-0,04	-0,02	-0,05
$\overline{S/P}$ serum	0,05	0,08	0,08	0,14	0,07	
S/P OF	0,177	0,253	0,238	0,205	0,214	

4.3 STATISTIČNA ANALIZA

4.3.1 Statistična analiza rezultatov molekularne diagnostike

Pri analizi rezultatov testa PCR smo ocenjevali razliko med regresijskima koeficientoma A in B, torej med skupinama mladic I in II ter med III in IV; pri skupinah mladic V in VI (regresijski koeficient C) molekularne analize z RT-PCR nismo opravili zaradi neuspele okužbe z virusom (Tabela 16).

Tabela 16: Dvostranska analiza rezultatov PCR preiskav za ugotavljanje prisotnosti RNA PRRSV v individualnih vzorcih seruma.

Table 16: Two-sided analysis of PCR detection of PRRSV RNA in individual serum samples.

DVOSTRANSKA PRIMERJAVA REGRESIJSKIH KOEFIČIENTOV			P- VREDNOST	
	0	A	B	1,0000
DNI PO INFEKCIJI	7	A	B	0,0005*
	14	A	B	0,9974
	21	A	B	0,1878
	28	A	B	0,0318**
	35	A	B	0,4491
	42	A	B	0,8752
	49	A	B	0,5633
	56	A	B	0,9431

* statistično značilna razlika med skupinama mladic A in B 7 DPI

** statistično značilna razlika med skupinama mladic A in B 28 DPI

4.3.2 Statistična analiza rezultatov serologije

4.3.2.1 Individualni vzorci seruma

Analiza poteka detekcije specifičnih protiteles v serumu glede na obravnavano skupino je pokazala, da nanjo značilno vplivata spremenljivki čas in čas v kombinaciji z načinom prekužitve (Tabela 17).

Tabela 17: Vpliv obravnavanih spremenljivk, časa in obravnave (OBR) ter njune interakcije (čas*OBR), na skupino mladic pri detekciji specifičnih protiteles v serumu individualnih živali.

Table 17: Effect of fixed variables, time (slo. *čas*), treatment (slo. *obravnava*; OBR), and their interaction (čas*OBR), on gilt groups on specific antibody detection in individual animals.

VPLIV	P-VREDNOST
Čas	<0.001*
OBR	0.827
Čas*OBR	<0.001*

* Statistično značilen vpliv fiksnih spremenljivk na obravnavano skupino mladic.

Do pojava prisotnosti specifičnih protiteles v individualnih vzorcih seruma je prišlo pri obravnavanih skupinah A in B, pri v skupini C pa le pri eni živali. Zato se je pri obravnavi

podatkov potrebno osredotočiti na razlike med skupinama A in B. Statistično značilne razlike v hitrosti detekcije prvih specifičnih protiteles v serumu po izpostavitvi kužnemu materialu smo dokazali 14 in 21 DPI ter 49 DPI. Več prašičev je razvilo protitelesa pri skupini B, kjer smo za aklimatizacijo poleg naravne metode uporabili še vrvi prepojene z OF prašičev, v katerih smo dokazali prisotnost RNA PRRSV (Tabela 18).

Tabela 18: Dvostranska primerjava med skupinami A, B in C pri ugotavljanju prisotnosti specifičnih protiteles v individualnih vzorcih seruma.

Table 18: Two-sided test comparing gilt groups A, B and C in specific antibody detection in individual serum samples.

ČAS	DVOSTRANSKA ANALIZA		P-VREDNOST
0	A	B	0.6198
0	A	C	0.5718
0	B	C	0.9448
7	A	B	0.6721
7	A	C	0.5341
7	B	C	0.8439
14	A	B	<0.0001*
14	A	C	0.0002
14	B	C	<0.0001
21	A	B	0.0001*
21	A	C	<0.0001
21	B	C	<0.0001
28	A	B	0.0748
28	A	C	<0.0001
28	B	C	<0.0001
35	A	B	0.9780
35	A	C	<0.0001
35	B	C	<0.0001
42	A	B	0.7127
42	A	C	<0.0001
42	B	C	<0.0001
49	A	B	0.0025*
56	A	B	0.0857

* Statistična značilnost razlik med skupinami glede tvorbe specifičnih protiteles v povezavi s spremenljivko »čas«.

4.3.2.2 Skupinski vzorci OF

Glede na vrednosti S/P, statistično značilnih razlik med skupinama mladic A in B, kjer je prišlo do pojava protiteles v OF, ni bilo. Analiza zaznave prisotnosti protiteles v OF glede na obravnavano skupino je pokazala, da tvorbo specifičnih protiteles značilno vplivata spremenljivki čas in čas v kombinaciji z načinom prekužitve. Spremenljivka časa vpliva zelo značilno ($p < 0,001$), prav tako pa tudi spremenljivka časa v kombinaciji z načinom prekužitve skupine ($p = 0,047$) (Tabela 19).

J. Plut: Uporabnost ustne tekočine prašičev v ... diagnostiki PRRS ... pri kontroliranem prekuževanju mladic.
Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2022. Doktorska disertacija

Tabela 19: Vpliv obravnavanih spremenljivk, časa in načina prekužitve (OBR) ter njune interakcije (čas*OBR) na skupino mladic pri tvorbi protiteles v OF.

Table 19: Effect of fixed variables, time (slo. *čas*), treatment (slo. *obravnava*; OBR), and their interaction (čas*OBR), on gilt groups in antibody response in OF.

VPLIV	P-VREDNOST
Čas	<0.001*
OBR	0.926
Čas*OBR	0.047*

* Statistična značilnost posameznih fiksnih spremenljivk ter njune interakcije na obravnavano skupino mladic

5 RAZPRAVA

Ker gre pri PRRS za gospodarsko zelo pomembno bolezen, so ukrepi zoper njo nujni. Če ne moremo izvajati dveh bistvenih biovarnostnih ukrepov, kot sta ločene kategorije prašičev po prostorih in izvajanja sistema AIAO, je naslednji najustreznejši ukrep kontrola bolezn. S kontrolo PRRS dosežemo, da reja z boleznijo živi na način, da so proizvodni rezultati in uvedeni ukrepi biovarnosti finančno sprejemljivi ter akutni izbruhi PRRS čim redkejši (Dee, 1998; Drigo in sod., 2018). Pri kontroli bolezn. so biovarnostni ukrepi v prvi vrsti vezani na nakup novih prašičev ali semena, torej na mladice in plemenske merjasce, ki jih uporabljamo za pripust, odkrivanje bukanja pri svinjah ali za pridobivanje semena direktno na farmi, ki ima dovoljenje za izvajanje te dejavnosti. Kljub temu da je v reji virus prisoten, je pomembno, da so na novo kupljene živali proste PRRSV. Te prašiče nato prekužimo, najbolje s homolognim, hlevskim sevom virusa, in počakamo, da proti PRRSV ustvarijo določeno stopnjo imunske zaščite (Opriessnig in sod., 2007; Štukelj, 2013). Najpomembnejša kategorija prašičev pri kontroli bolezn. so vsekakor mladice, ki jih je treba pred premikom v plemensko čredo s PRRSV prekužiti in aklimatizirati. Na farmi A, kjer je potekal naš poskus, so to dosegli z naravno prekužitvijo, in sicer s kontaktom med kužnimi prašiči in njihovimi izločki. V naši raziskavi smo želeli preveriti, če lahko aklimatizacijo dosežemo tudi z uporabo bombažnih vrvi, prepojenih z OF obolelih prašičev. Vrvi, prepojene z OF obolelih prašičev, smo pri skupinah mladic III in IV uporabljali kot dodatek pri naravni prekužitvi z neposrednim kontaktom z viremičnimi prašiči in njihovimi izločki. Pri skupinah mladic V in VI smo želeli živali okužiti in aklimatizirati le z uporabo vrvi, prepojenih z OF obolelih prašičev, in odstranitvijo ali zmanjševanjem ostalih dejavnikov, ki sicer na farmi vplivajo na proces. Postopek prekuževanja je treba nadzorovati tudi z laboratorijskimi diagnostičnimi preiskavami, da se prepričamo, ali so mladice pred koncem aklimatizacije res izločile PRRSV iz telesa in razvile specifična protitelesa. V našem poskusu smo tedensko preiskovali individualne vzorce seruma in skupinske vzorce OF. Želeli smo dokazati, da lahko tekom aklimatizacije v obeh vzorcih z enako zanesljivostjo dokazujemo prisotnost RNA PRRSV in specifičnih protiteles proti PRRSV.

Potek poskusa pri skupinah mladic od I do VI smo določili na podlagi rezultatov dokazovanja prisotnosti RNA PRRSV in specifičnih protiteles v preliminarni skupini mladic. V tej skupini, ki je vključevala 16 mladic, smo od dneva uhlevitve tedensko ugotavljali prisotnost RNA PRRSV in specifičnih protiteles v individualnih vzorcih seruma, združenih individualnih vzorcih seruma ter v skupinskih vzorcih OF. V preliminarni skupini smo pri mladicah 8 zaporednih tednov, do 49 DPI, vzorčili kri in OF ter v njih dokazovali prisotnost RNA PRRSV in specifičnih protiteles proti PRRSV. Individualne vzorce seruma smo odvzeli le naključnim 10 mladicam od skupno 16 živali. Potrdili smo, da so bili na dan 0 vsi preiskani vzorci negativni. Pri 9 mladicah smo lahko RNA PRRSV iz seruma dokazali že 7 DPI, pri vseh preiskanih mladicah pa smo dokazali prisotnost specifičnih protiteles najkasneje 21 DPI. Na podlagi podatkov iz literature smo predvidevali, da bodo vse mladice do 49 DPI RNA PRRSV eliminirale iz krvi, kar se povezuje s tvorbo NAb od 28 DPI dalje (Loving in sod.,

2015; Lunney in sod., 2016). Na prisotnost RNA PRRSV je bilo 49 DPI pozitivnih 9 od 10 preiskanih individualnih vzorcev seruma. V skupinskem vzorcu OF smo v preliminarni skupini RNA PRRSV dokazali od 7 DPI do 28 DPI, ter 42 DPI. RNA PRRSV nismo dokazali 35 DPI in pa 49 DPI. Zaradi pozitivnega individualnega vzorca seruma 49 DPI pri eni izmed mladic v preliminarni skupini smo se odločili, da v glavnem poskusu obravnavo v skupinah podaljšamo za en teden, do 56 DPI. Poleg tega smo mladice v vseh skupinah glavnega poskusa individualno označili.

V individualnih vzorcih krvi in v skupinskih vzorcih OF na dan uhlevitve z RT-PCR nismo dokazali prisotnosti RNA PRRSV. Pri mladicah iz skupine I smo 7 DPI ugotovili prisotnost RNA PRRSV pri 20 % mladic (3 od 15 mladic), v skupini II pa pri 13,3 % mladic (2 od 15 mladic). Pri skupinah mladic I in II je delež pozitivnih mladic 14 DPI narasel na 93 % (14 od 15 mladic) oziroma na 86,7 % (13 od 15 mladic). Zatem je sčasoma do zadnjega dne poskusa število mladic z dokazano RNA PRRSV počasi upadalo in pri večini RNA PRRSV v krvi nismo več dokazali. Pri skupini I smo 42 DPI RNA PRRSV v krvi dokazali le še pri 20 % mladic (3 od 15 mladic). Pri skupini II je bil že 35 DPI delež mladic z dokazano RNA PRRSV v krvi 25 % (3 od 12 mladic). 56 DPI smo RNA PRRSV v krvi ugotovili pri 2 od 15 mladic 13,33 % mladic (2 od 15 mladic) iz skupine I in pri 18,2 % (2 od 11 mladic) iz skupine II. Pri mladicah iz skupine III in IV smo poleg naravnega kontakta z viremičnimi živalmi za poskus optimizacije naravne prekužitve uporabili še vrvi, prepojene z OF viremičnih živali iz skupin mladic I in II. Pričujoča raziskava kot prva podrobno obravnava možnost uporabe vrvi za prenos okužbe s PRRSV. Namen tovrstnega pospeševanja prenosa PRRSV je predvsem možnost vpeljave dodatne preproste in poceni metode za aklimatizacijo mladic preko naravnega kontakta z viremičnimi prašiči ter njihovimi izločki. Stik s kužnim materialom in količino virusa v postopku je sicer zaenkrat še neopredeljen. Ko so vrvi mladice prežvečile, smo vrvi shranili v čisto plastično embalažo in jih po transportu na temperaturi 4 °C shranili na -20 °C do uporabe za prekuževanje. Neposredno pred uporabo smo vrvi odtalili in jih po opravljenem vzorčenju v skupinah III in IV namestili v boksa. Mladice so jih imele naslednjih 7 dni na voljo za žvečenje. S primerjavo skupin III in IV (za statistično obravnavo smo ju združili v enotno skupino B) ter predhodnih skupin I in II (za statistično obravnavo smo ju združili v enotno skupino A) smo želeli potrditi tretjo hipotezo, da z dodatkom elementa vrvi, prepojenega s kužno OF, pride do hitrejši okužbe mladic. Tretjo hipotezo smo na podlagi rezultatov in ugotovljenih statistično značilnih razlik med skupinama A in B lahko potrdili. Pri skupinah mladic III in IV (statistična skupina B) je bila okužba mladic hitrejša, v serumu smo pri več mladicah dokazali RNA PRRSV že 7 DPI, in sicer pri 56 % mladic iz skupine III ter pri 86 % mladic iz skupine IV, v primerjavi z mladicami iz skupin I (13 %) in II (20 %) ($p < 0,0005$). Prav tako je bila statistično značilna razlika glede števila viremičnih mladic ugotovljena 28 DPI. V skupinah I in II (skupina A) je ta delež znašal 80 %, oziroma 69,2 %, skupno pa 71,4 % v primerjavi s skupinama III in IV, kjer je bila RNA PRRSV dokazana pri 46,2 %, oziroma pri 25 %, kar skupaj znaša 36 % pri skupini B ($p = 0,0318$). 28 DPI je ena od ključnih časovnih prelomnic v poteku okužbe s PRRSV, saj naj bi se od tega dne naprej v krvi začela pojavljati NAb, ki so ključna pri eliminaciji virusa (Loving in sod., 2015). Glede na

naše rezultate lahko sklepamo, da je večji delež mladic z dokazanimi protitelesi iz skupin III in IV, kjer smo jim omogočili takojšen intenziven peroralni stik s kužnino v vrveh. Posledica tega dodatnega elementa pa delno potrjuje četrto hipotezo, da pri mladicah iz skupin III in IV pride do hitrejše eliminacije RNA PRRSV iz krvi zaradi tvorbe specifičnih nevtralizacijskih protiteles. Kljub hitrejši okužbi in eliminaciji RNA PRRSV iz krvi smo v njej pri posameznih mladicah iz skupin III in IV na 56 DPI še vedno lahko dokazali RNA PRRSV, zato četrte hipoteze nismo mogli potrditi popolnoma. Predpostavljali smo namreč, da bo v skupinah mladic III in IV na koncu poskusa delež mladic z dokazano RNA PRRSV v krvi znatno manjši kot v skupinah I in II. Kljub temu da so se tekom celotnega poskusa spremljanja prisotnosti RNA PRRSV in specifičnih protiteles med skupinama pojavljale specifično značilne razlike med obema, je bil 56 DPI delež mladic z RNA PRRSV v krvi primerljiv. Delež mladic, pri katerih smo 56 DPI še dokazali prisotnost RNA PRRSV v krvi, je pri skupinah I in II 15,38-odstoten, pri skupinah III in IV pa 16-odstoten. Na podlagi teh rezultatov sicer ne moremo potrditi, da smo pri mladicah z uporabo vrvi aklimatizacijo dosegli prej, vendar se po drugi strani zavedamo, da z molekularno diagnostiko dokazujemo RNA PRRSV, ki pa se lahko nahaja tudi v fagocitnih celicah in kot takšen ne predstavlja več genoma virulentnega PRRSV. Kljub temu zagovarjamo stališče, da te hipoteze z našim poskusom ni mogoče ne potrditi ne ovreči. Ugotovili smo statistično značilno razliko v številu RNA PRRSV pozitivnih mladic 28 DPI, ko je bilo pri manj živali dokazana RNA PRRSV v skupini B, vendar 56 DPI statistično značilne razlike med skupinama A in B niso bile dokazane. Drugačno dinamiko prekuževanja smo nedvoumno pokazali in potrdili, vendar za končno oceno aklimatizacije ter s tem potrditev ali zavrnitev hipoteze pa bi bilo potrebno laboratorijsko diagnostiko prisotnosti RNA PRRSV spremljati še nekoliko dlje ter na večjem številu živali. S tem bi dobili odgovor, če in kdaj so vse mladice iz skupine zares aklimatizirane, se pravi, da imajo specifična protitelesa in so proste RNA PRRSV.

Na podlagi rezultatov iz literature bi pričakovali, da 56 DPI pri večini mladic RNA PRRSV v serumu ne bomo več dokazali. Christopher-Hennings in sod. (2001) ter Kittawornrat in sod. (2010) so ugotovili, da naj bi pri plemenskih prašičih viremija trajala od 4 do 21 DPI. Batista in sod. (2004) so ugotovili, da mladice RNA PRRSV iz krvi odstranijo do 30 DPI, zato smo domnevali, da bo pri našem poskusu trajanje viremije pri mladicah primerljivo dolgo. V omenjenih raziskavah sicer raziskovalci niso nujno upoštevali vseh dejavnikov, ki vplivajo na detekcijo RNA PRRSV v krvi, predvsem v smislu občutljivosti ali celo specifičnosti molekularne metode, ki je bila uporabljena v posamezni raziskavi. Resda so Batista in sod. (2004) opravili raziskavo v terenskih pogojih, a ravno ti se med rejami, posledično različnimi raziskavami, tudi močno razlikujejo. Tako v njihovi raziskavi v boksu ni bilo nikoli več kot 12 mladic naenkrat, ki bi imele na voljo vsaj 2 m² talne površine boksa na žival. Prav tako vzorčenja niso potekala tedensko, temveč od 30 DPI dalje, na 20 dni. Mladice so bile na začetku poskusa stare 8 tednov, za razliko od naših 12 tednov starih mladic. Pri detekciji RNA PRRSV so tako kot v naši raziskavi uporabljali klasično RT-PCR z detekcijo RNA PRRSV na AGE, uporabili pa so drugačno sondo za detekcijo, kar lahko vpliva na specifičnost vezave na izolirano RNA PRRSV. Odkar imamo na voljo novejšje tehnike za raziskovanje genoma, na

primer WGS, se je močno izboljšalo detajlno poznavanje genoma. To lahko s pridom izkoristimo tudi pri izdelavi bolj specifičnih komplementarnih markerjev za detekcijo določenega segmenta iskanega mikroba. V njihovi raziskavi so, kljub temu da je šlo primarno za terenske pogoje, uporabili znano koncentracijo virusnega izolata za intranazalno okužbo, in sicer $10^{2.4}$ TCID virusnega seva MN 30–100 PRRSV-2. V terenskih pogojih oziroma v primeru naravne prekužitve ni mogoče natančno predvidevati, kdaj natančno se bo posamezna mladica okužila in postala viremična. Zato smo sklepali, da utegne biti čas, do katerega bomo ugotavljali RNA PRRSV v krvi pri mladica h tekom naše raziskave, tudi nekoliko daljši. Islam in sod. (2013) so v terenski raziskavi osmih farm pri prašičih vseh kategorij ugotovili, da je potek viremije pri okužbi prašičev s PRRSV kompleksen in lahko poteka v eni fazi ali pa v več fazah, z vmesnimi obdobji, med katerimi virusa v krvi ni mogoče dokazati. Pri tem v svoji raziskavi niso upoštevali razlik v poteku in dolžini viremije glede na kategorijo prašičev, kar bi bil lahko eden od razlogov za odstopanja med našimi in njihovimi rezultati. Tako so Christopher-Hennings in sod. (2001) v raziskavi ugotovili, da viremija pri sesnih pujskih traja vsaj 42 DPI, medtem ko Reiner in sod. (2010) za štiri tedne stare odstavljenice navajajo tudi do 58 DPI trajajočo viremijo. Yoon in sod. (2006) v svoji raziskavi učinka NAb na eliminacijo viremije navajajo, da tvorba in prisotnost tega tipa protiteles ne pomenita nujno tudi konca viremije, kar so v kasnejši raziskavi potrdili tudi Islam in sod. (2013). Čeprav v naši raziskavi nismo določali razreda specifičnih protiteles, lahko po podatkih iz literature sklepamo, da so bila v krvi prisotna, vendar to ni nujno pomenilo odstranitve RNA PRRSV. Islam in sod. 2013 navajajo možnost pojava persistentne enofazne viremije tudi do 42 DPI. Reiner in sod. (2010) pojav viremije opisujejo celo do 72 DPI pri pasmi piétrain, za katero navajajo, da je bolj dovzetna za persistentno ali dvofazno viremijo. V našem poskusu nobena mladica ni razvila persistentne viremije. Od začetka do konca obdobja spremljanja prisotnosti RNA PRRSV v krvi se je enofazna viremija pojavila pri 21 od 51 (41 %), dvofazna pa pri 29 od 51 (56 %) vseh mladice iz skupine A, ki smo jih spremljali od dne uhlevitve pa do 56 DPI, kar je primerljivo z rezultati Islama in sod. (2013). Pri mladici številka 2 iz skupine III se je pojavila celo trofazna viremija, ki je doslej še niso opisali v nobeni izmed raziskav o poteku viremije. Pri tej živali smo v krvi RNA PRRSV določili kar trikrat, vsakič le za en teden. Ob tem se poraja vprašanje, kolikšna je bila količina RNA PRRSV v krvi in ali je morda razlog za tak prehodni pojav ravno v močni reakciji imunskega sistema, ki RNA PRRSV hitro eliminira iz krvi, ne pa tudi iz celotnega organizma. Natančni razlogi za razlike v dinamiki viremije še niso raziskani. Boddicker in sod. (2012) v svoji raziskavi o kombinaciji vpliva genoma na potek viremije navajajo, da ima genetika gostitelja značilen vpliv na količino virusa v krvi, vendar ne vpliva na pojav dvofazne viremije. Na podlagi tega so domnevali, da je časovni potek bolj odvisen od lastnosti specifičnega seva PRRSV. Reiner in sod. (2012) v svoji raziskavi navajajo, da se lahko bifazna viremija pojavi v dveh primerih, in sicer zaradi ponovnega izbruha primarnega virusa ali zaradi ponovne okužbe od drugih prašičev v reji. Rezultatov omenjene raziskave ne moremo neposredno primerjati z našo raziskavo, ker so Reiner in sod. (2012) opazovali potek in trajanje viremije pri vseh kategorijah prašičev. Potek okužbe s PRRSV pri različnih kategorijah prašičev pa ni nujno primerljiv s potekom pri mladica h. Pomanjkljivost obeh omenjenih raziskav je, da pri ocenjevanju razlogov za pojav

viremije v več fazah niso natančneje preučili imunskega statusa prašičev in njegovega vpliva na patofiziologijo okužbe. Za PRRSV je znano, da se po prenehanju viremije RNA PRRSV še dlje časa ohranja v limfatičnih tkivih (Allende in sod., 2000; Horter in sod., 2002; Fangman in sod., 2007) in pri takem prašiču obstaja tveganje, da bo ob neugodnem imunskem statusu bolezen znova izbruhnila, s tem pa bo postal vir okužbe tudi za ostale prašiče v reji. V novih ciklih pomnoževanja virusa obstaja tudi večja verjetnost za njegove mutacije. Če pride do mutacije, ki povzroči izgubo homologne zaščite proti hlevskemu sevu PRRSV, se lahko zgodi, da bo v določeni populaciji prišlo do novega akutnega kroga bolezn. Določena stopnja heterologne zaščite in imunski spomin sicer povzročita, da so sekundarni izbruhi PRRS običajno manj akutni kot primarni (Cano in sod., 2007a; Das in sod., 2010). V naši raziskavi je imela najdaljšo viremično fazo mladica številka 4 iz skupine II, in sicer 6 zaporednih vzorčenj, od 14 do 49 DPI, ki pa je poginila po predzadnjem vzorčenju (49 DPI). Le še pri mladici številka 2 iz skupine IV je viremija trajala neprekinjeno 28 dni, kar je primerljivo z ugotovitvami raziskav, ki so jih izvajali Christopher-Hennings in sod. (2001) ter Kittawornrat in sod. (2010). Pri vseh ostalih mladiceh je trajala viremija manj kot 28 dni ali pa je potekala v več fazah z intervali, ko v vzorcih nismo dokazali RNA PRRSV. Nekaj mladice v naši raziskavi je poginilo ali je bilo izločenih v času aklimatizacije zaradi pojava določenih kliničnih znamenj ali etičnega vprašanja. Pri tem smo opazili respiratorne težave, značilne za PRRS, katerim so sledile sekundarne sistemske okužbe, domnevno povezane tudi z oslabljenim imunskim sistemom. Če je bilo zdravstveno stanje mladice nepopravljivo, na primer če so mladice trajno obležale zaradi poškodb sklepov in splošne izčrpanosti, so bile evtanazirane po odobritvi veterinarja farme. Le mladica št. 14 iz skupine II je poginila neposredno po odvzemu krvi, pri čemer lahko iz izkušenj trdimo, da je prišlo do raztrganine v. *cava cranialis*.

V skupinskem vzorcu OF smo pri skupinah I in II dokazali RNA PRRSV v obdobju od 7 do 56 DPI, z izjemo vzorca skupine I, 35 DPI. Pri skupini III v OF RNA PRRSV nismo dokazali 21, 35, 42 in 56 DPI, pri skupini IV pa le na dan uhlevitve in 56 DPI. Statistična analiza rezultatov je pokazala, da pri primerjavi obeh vrst vzorcev, individualnih serumov in skupinskih vzorcev OF pri skupinah od I do IV ni statistično značilnih razlik glede zanesljivosti ugotavljanja RNA PRRSV v obeh vzorcih. Iz tega sklepamo, da lahko RNA PRRSV v obeh vrstah vzorcev ugotavljamo z enako verjetnostjo v enakem časovnem obdobju po okužbi, s čimer lahko potrdimo del prvih dveh hipotez, in sicer primerljivost rezultatov med individualnimi vzorci seruma in skupinskimi vzorci OF. V skupinskem vzorcu OF RNA PRRSV kljub temu nismo dokazovali časovno povsem konstantno v primerjavi z analizami individualnih vzorcev seruma. To kaže, da morda PRRSV v zaznavni količini v OF ni vedno prisoten ves čas po okužbi. Wills in sod. (1997a) navajajo, da se virus v OF ohranja do 42 DPI, vendar kaže, da je to obdobje lahko tudi daljše. V naši raziskavi smo pri primerjavi dokazovanja RNA PRRSV pri individualnih vzorcih seruma in skupinskih vzorcih OF ugotovili dve značilnosti. V skupini III smo RNA PRRSV v OF 49 DPI dokazali kljub temu, da smo v istem obdobju le pri 8,3 % mladice ugotovili RNA PRRSV v serumu. V drugem primeru pa pri skupini I v skupinskem vzorcu OF 35 DPI nismo ugotovili RNA PRRSV, kljub

temu da smo jo dokazali pri 60 % mladic v serumu. To napeljuje na zaključek, da se PRRSV po okužbi ne pojavlja konstantno v enako zaznavnih količinah v telesnih tkivih in izločkih. To dejstvo nakazuje, da je za večjo zanesljivost potrditve prisotnosti PRRSV v reji smotrno ugotavljati RNA PRRSV istočasno v individualnih vzorcih seruma in v skupinskih vzorcih OF oziroma da v isti reji vzorčimo in pregledujemo kombinacijo obeh. Individualno vzorčenje krvi vsem živalim je v velikih čredah prašičev praktično nemogoče, zato vzorčimo kri le naključno izbranemu deležu prašičev. Če je delež prašičev z RNA PRRSV v krvi nizek, take prašiče pri individualnem vzorčenju zlahka spregledamo. Naš primer pri skupini mladic III kaže, da kljub temu lahko v skupini, kjer je delež prašičev z dokazano RNA PRRSV v krvi manj kot 10 %, lahko dokažemo RNA PRRSV v skupinskem vzorcu OF. Oba vzorca, tako individualni vzorci seruma kot skupinski vzorci OF, imata torej veliko praktično uporabno vrednost. Individualni vzorci krvi se v praksi izkažejo za uporabne, na primer ob preventivnem ugotavljanju statusa PRRS pri novih prašičih, preden jih naselimo na farmo, kjer PRRSV ni bil nikoli dokazan. Skupinski vzorci OF so zaradi preprostega odvzema zelo uporabni za dokaz uspešnosti aklimatizacije mladic ali za kontrolo učinkovitosti programa izkoreninjenja PRRSV v daljšem časovnem obdobju. Menimo, da je kombinacija preiskav vzorcev krvi in OF nadgradnja laboratorijske diagnostike pri dokazu RNA PRRSV v postopku nadzora in kontrole PRRS. Z uporabo skupinskih vzorcev OF na enostaven način pridemo do vzorcev tako rekoč vseh prašičev v intenzivni reji, čeprav imajo nekoliko slabšo napovedno vrednost pri dokazovanju prisotnosti RNA PRRSV in specifičnih protiteles. Za zanesljiv rezultat je namreč potrebno odvzeti in preiskati mnogo manj vzorcev, kar pa močno zmanjša količino dela in stroške preiskav. Za zmanjšanje stroškov bi lahko poleg kombinacije individualnih in skupinskih vzorcev OF uporabljali še združevanje individualnih vzorcev krvi, vse v okviru priporočil, ki določajo število združljivih vzorcev, s katerim še lahko pričakujemo dovolj zanesljivo dokazovanje iskanega parametra (Batista in sod., 2005; Gerber in sod., 2013). Rovira in sod. (2007) ugotavljajo, da v primeru združevanja 5 individualnih vzorcev krvi, spregledamo le do 6 % okužb, to pomeni, da pri masovnem vzorčenju ta napaka ne predstavlja velikega tveganja za zanesljivost diagnoze.

Pri mladicah v skupinah I in II smo zgodnjo prisotnost specifičnih protiteles v krvi prvič dokazali 7 DPI, in sicer v obeh skupinah pri 1 od 15 mladic (6,67 %). Pri mladici številka 5 iz skupine I smo 7 DPI v krvi dokazali specifična protitelesa kot tudi RNA PRRSV. Pri mladici številka 1 iz skupine II smo prav tako 7 DPI že potrdili prisotnost specifičnih protiteles v krvi, nismo pa dokazali prisotnosti RNA PRRSV. V skupinah mladic III in IV smo zgodnji pojav specifičnih protiteles v krvi dokazali prav tako 7 DPI. V skupini III smo dokazali protitelesa pri 18 % mladic; 3 od 16 mladic), v skupini IV pa pri 6 % mladic (1 od 15 mladic). Loving in sod. (2015) ter Xing in sod. (2017) navajajo, da se prvi specifični IgG proti PRRSV v krvi pojavljajo že od 7 do 9 DPI, oziroma 10 DPI. Zaznaven porast nivoja specifičnih protiteles v krvi posameznih živali je sledil v obeh skupinah 14 DPI. V skupini III smo dokazali protitelesa pri 62 % mladic, v skupini IV pa pri 92 % mladic. Glede na navedbe Loving in sod. (2015) ter Xing in sod. (2017) pojavu specifičnih IgG proti PRRSV, ki so prevladujoč razred protiteles v krvi od 10 DPI, je porast nivoja pričakovan. Statistična analiza rezultatov

mladic med skupinama A (skupini I in II) in B (skupini III in IV), kjer smo uporabili različen način prekuževanja, je pokazala, da med obravnavanima skupinama A in B obstaja statistično značilna razlika ($p < 0,0001$) pri 14 DPI. Prav tako obstaja statistično značilna razlika med obravnavanima skupinama mladice A in B glede na vrednosti S/P 21 DPI ($p < 0,0001$) in 49 DPI ($p = 0,0025$), kljub temu, da smo od 21 DPI dalje že pri vseh mladiceh v opazovanih skupinah dokazali specifična protitelesa, z izjemo mladice številka 4 iz skupine I. Izračunana statistično značilna razlika med skupinama A in B namreč temelji tudi na primerjavi povprečnih vrednosti S/P izračunanih z ELISA. Ker sama vrednost S/P nima neposredne povezave s količino specifičnih protiteles v krvi, ne moremo z gotovostjo trditi, da so v našem primeru ugotovljene razlike dejansko posledica produkcije večjega števila protiteles 21 DPI in 49 DPI. Je pa predvsem 14 DPI videti statistično značilno razliko v številu mladice, kar kaže na različno dinamiko tvorbe specifičnih protiteles pri primerjavi teh dveh skupin. Glede na to opažanje bi bilo mogoče sklepati, da dodaten tesen stik s kužnino povzroči hitrejšo serokonverzijo pri večjem deležu mladice. K temu pripomore tudi dejstvo, da razlika med skupinama I in II ter III in IV v 7 DPI in 14 DPI sovпада tudi s prisotnostjo RNA PRRSV v vzorcih. Večja obremenitev s PRRSV pri večjem deležu mladice iz skupin III in IV bi lahko povzročila hitrejši pojav specifičnih protiteles v njihovi krvi. Dodatni dražljaj, tj. vrvi, prepojene s kužno OF, bi lahko bil zelo pomemben predvsem v specifičnih pogojih v naši raziskavi. Pri naravnem prekuževanju mladice se namreč zanašamo na to, da bodo mladice v hlevih za aklimatizacijo slej kot prej prišle v stik z zadostno količino virusa, ki bo sprožil imunski odziv. Kot smo pokazali z našimi rezultati, se to v velikih hlevih z veliko količino kužnega materiala tudi dejansko zgodi, vendar je časovni potek zelo nepredvidljiv – to je tudi eden izmed razlogov za pojav specifično značilnih razlik med obravnavanima skupinama mladice I in II ter III in IV. Zgolj na rezultatih naše raziskave tega sicer ne moremo z gotovostjo trditi, saj ne vemo natančno, s kakšno količino PRRSV je bila v stiku vsaka mladica, zgolj z ELISA pa tudi ne moremo določiti natančnega nivoja specifičnih protiteles v krvi. Ponuja pa prvotna predpostavka morebitni temelj za nadaljnje raziskave. Tesen peroralni kontakt z veliko količino kužnine bi lahko pripomogel tudi k boljšemu razvoju lokalne pa tudi sistemske imunosti. V ustni votlini, natančneje v sluznici in vseh izločkih se nahaja velika količina specifičnih in nespecifičnih celic imunskega sistema in drugih imunskih mehanizmov, ki omogočajo hitro spoznavanje z virusnimi antigeni in posledično tudi hitrejši razvoj specifične imunosti (Amerongen in Veerman, 2002). Zgolj na podlagi vrednosti S/P ne moremo opredeliti nivoja specifičnih protiteles posameznega razreda in njegovih bioloških značilnosti, na primer kolikšen nivo za nas najbolj zanimivih NAb. Če bi želeli oceniti nivo NAb, bi bilo potrebno izvesti dodatne raziskave, na primer virus nevtralizacijski test. Prisotnost protiteles, ki smo jih dokazali pri mladiceh oziroma S/P vrednost, ki je do neke mere povezana z nivojem specifičnih protiteles, ne vpliva na zmanjšanje števila ugotovljenih primerov RNA PRRSV v serumu 56 DPI. V tej opazovani časovni točki smo pri vseh skupinah zaznali od 1 do 3 mladice, ki RNA PRRSV niso eliminirale iz seruma. Po drugi strani pa tudi pojav protiteles ni edini pogoj za eliminacijo virusa iz krvi, saj lahko tudi pri prašičih, kjer se NAb sploh ne pojavijo, viremija izzveni (Lunney in sod., 2016).

Rezultati molekularnih in seroloških preiskav iz naše raziskave kažejo, da kljub drugačni obravnavi ter razlikami med mladimi na ravni skupine, znotraj skupine same prihaja do odstopanj na ravni individualnih živali, pri katerih je patogeneza PRRSV nekoliko drugačna kot pri večini. Mladica številka 2 iz skupine I in številka 9 iz skupine II smo na primer RNA PRRSV v krvi prvič zaznali šele 21 DPI. Pri mladici številka 14 iz skupine I pa smo prva protitelesa v krvi z ELISA dokazali šele 35 DPI. Taki prašiči predstavljajo potencialno težavo s kliničnega in ekonomskega vidika, saj bi lahko virus aktivno širili po premiku v plemensko čredo in s tem povzročili akutne izbruhe PRRS. To se v praksi pogosto dogaja, sploh če ne izvedemo temeljite individualne in skupinske laboratorijske diagnostike tik pred predstavitvijo mladic v plemensko čredo. Taki prašiči so tudi razlog, da je aklimatizacija v primeru PRRS traja 3 mesece – tudi če virus navidezno eliminiramo iz krvi, ga lahko še vedno bistveno dlje dokažemo v drugih organih in tkivih (Christopher-Hennings in sod., 1995; Christopher-Hennings in sod., 2008, Christianson in sod., 1993a; Swenson in sod., 1994), še posebej dolgo v limfatičnem tkivu, kjer različne raziskave navajajo možnost izolacije RNA PRRSV preko 100 DPI (Allende in sod., 2000; Horter in sod., 2002; Fangman in sod., 2007; Wills in sod., 1997b). Za raziskave, osnovane na za dokazovanje RNA PRRSV v tkivnih vzorcih z RT-PCR, je sicer na mestu dvom o merodajnosti rezultatov, kar se tiče njihove epidemiološke uporabnosti. Na primer v semenu merjasca poročajo o izolaciji virusa sposobnega okužbe do 43 DPI (Swenson in sod., 1994), RNA PRRSV z RT-PCR pa lahko dokažemo do 92 DPI (Christopher-Hennings in sod., 1995). Pri mladicih so Batista in sod. (2004) po aklimatizaciji RNA PRRSV iz bezgavk izolirali še 135 DPI, a nam to ne pove, ali taka mladica še predstavlja epidemiološko tveganje in če bi pri njej lahko prišlo do ponovnega izbruha bolezni. V našem primeru so se posamezne mladice z odstopanjem v smislu poznejše produkcije protiteles pojavljale samo v skupinah I in II, kjer je šlo za naravno aklimatizacijo, brez dodatkov vrvi s kužnino. Z aklimatizacijo vseeno dosežemo, da je večina brijih mladic in po praritvi njihovih sesnih pujskov povsem ali pa vsaj delno zaščitenih pred akutnimi izbruhi PRRS, ki povzroča tudi veliko ekonomsko škodo. Da bi izbruhe PRRS čim bolj učinkovito preprečevali, mora aklimatizacija trajati dovolj dolgo. Ni pa pomembno le trajanje, ampak tudi kvaliteta aklimatizacije na točno določen patogeni mikroorganizem, poleg tega pa k uspešnosti pomembno doprinese tudi splošni imunski status živali. Če je prašič imunološko kompromitiran, kar je v intenzivnih pogojih reje na žalost zaradi velikih zahtev po produktivnosti in revnih rejnih pogojih pogosto, bo ta predstavljal tveganje, da bodo pri njem izbruhnili sekundarna obolenja, ali da bo prišlo do novih akutnih izbruhov latentnih obolenj.

V skupinah V in VI smo želeli mladice, pri katerih PRRSV ni bil dokazan, okužiti in prekužiti samo z uporabo bombažnih vrvi, prepojenih z ustno tekočino viremičnih mladic iz skupin I, II, III, in IV, ki smo jo shranili v času prejšnjih obiskov farme med raziskavo. Praktični pomen takšnega pristopa, torej uporabe vrvi s kužno OF, bi omogočila vsaj teoretična zgodnja, harmonizirana in močna homologna zaščita pred hlevskim sevom PRRSV. Ker prašiči vrvi uporabljajo kot material za igro in zaposlitev z grizenjem ter žvečenjem, bi na ta način zagotovili hiter in neposreden kontakt s PRRSV in s tem pospešili postopek naravne prekužitve in aklimatizacije. V primerjavi s serumizacijo ali cepljenjem ima ta pristop

prednost tudi zaradi manjše manipulacije z individualnimi prašiči, predvsem pa je postopek manj invaziven in cenejši. Mladice so bile uhlevljene v očiščene in razkužene bokse na VF UL v Ljubljani. Izhajale so iz iste farme kot mladice iz ostalih skupin, kjer PRRSV ni bil prisoten. Na dan uhlevitve smo z laboratorijskimi testi potrdili, da pri mladicah ni prisotne RNA PRRSV. Pri izbiri tega načina prekužitve smo se zanašali na rezultate že objavljenih raziskav, ki navajajo, da je PRRSV močno nalezljiv in se zlahka prenaša s farme na farmo s kužnino preko neposrednega kontakta (Dee in sod 2002, Dee in sod 2004a, Dee in sod 2004b, Otake in sod., 2002b, Otake in sod., 2002c, Otake, 2002d, Pitkin in sod., 2009). Prav tako na visoko stopnjo nalezljivosti kažejo raziskave prenosa PRRSV z aerosolom (Otake in sod., 2002a; Trincado in sod., 2004b, Fano in sod., 2005). Virus je po dosedanjih ugotovitvah zelo odporen na temperature pod lediščem (Benfield in sod., 1992) ter okoli ledišča, pri 4 °C je razpolovna življenjska doba 155 ur (Jacobs in sod., 2010). Glede na vse te podatke smo sklepali, da bo po izpostavitvi kužnine preko okuženih vrvi, ki jih prašiči radi žvečijo in grizejo, nedvomno prišlo do okužbe vsaj nekaj, če ne vseh živali v skupini, nato pa tudi do prenosa virusa na vse ostale vrstnice v poskusni skupini.

Pri mladicah iz skupin V in VI do načrtovane okužbe ni prišlo zelo evidentno. Pri skupini V smo uporabili 2 meseca stare vrvi, prepojene z OF mladic, pri katerih smo predhodno dokazali RNA PRRSV. Vrvi so bile v času od odvzema vzorca do ponovne uporabe za prekuževanje zamrznjene na temperaturi -20 °C. Ob sprotne spremljanju morebitne prisotnosti RNA PRRSV z RT-PCR pri živalih v skupini V nismo dokazali. Spričo tega smo poskus pri skupini V prekinili in postopek prekuževanja pri skupini VI prilagodili. Na dan kontakta z vrvmi in tekom prvih 4 tednov poskusa smo poleg zamrznjenih vrvi mladicam priskrbeli še sveže vrvi z OF s farme, kjer je prisoten PRRSV. Sveže odvzeto OF smo v roku 90 min pri temperaturi 4 °C transportirali do hlevov VF UL in jih izobesili mladicam za žvečenje in igro. Isti dan smo v vzorcih OF, odvzetih na farmi dokazali tudi prisotnost RNA PRRSV z metodo RT-PCR. Kljub tej prilagoditvi do zaznavne aktivne okužbe mladic ni prišlo, ne klinično in ne v smislu, da bi v njihovi krvi ali OF dokazali prisotnost RNA PRRSV. Glede na to lahko sklepamo, da do aktivne okužbe z razmnoževanjem PRRSV v telesu ni prišlo. Možni vzroki za neinfektivnost virusa, ali če rečemo drugače, nezmožnost virusa v vrveh, da bi povzročil okužbo in bolezen, so lahko različni in bi jih bilo potrebno temeljiteje raziskati. V OF je poleg virusov tudi cela paleta bakterij, ki izločajo lizocime, ki vplivajo na razgradnjo in s tem inaktivacijo viriona (Chen in sod., 2019). V OF je poleg specifičnih protiteles, tako razreda IgA kot tudi IgG, prisotnih še nekaj različnih molekul z nespecifičnim antimikrobnim delovanjem. Protivirusno delovanje v OF imajo še cistatini, mucini in sekretorni levkocitni proteinazni inhibitorji (SLPI) (Frohm Nilsson in sod. 1999). V OF najdemo vsaj 9 različnih izomerov cistatinov, ki imajo vpliv na mediacijo proteolitične aktivnosti, tako gostiteljevih lastnih kot mikrobnih celic (Blankenvoorde in sod., 1996). Mucini prekrivajo sluznične membrane, poleg ustne votline tudi tiste v respiratornem, urogenitalnem in prebavnem traktu. Morfološko tvorijo hidrofilen viskozen elastičen gel, ki deluje kot fizična prepreka za dostop patogenim mikrobov do spodaj ležečega epitelija. Kljub izredni heterogenosti imajo skupno značilne visoko glikozilirane regije na proteinskih

dimerih. Ti formirajo nekakšne vretenaste žepe, v katere se fizično lovijo mikrobi in pridejo v stik s prvimi celicami nespecifične obrambe na sluznicah (Amerongen in sod., 1987). Molekule SLPI imajo poleg izrazitega antivirusnega delovanja tudi močno antibakterijsko delovanje (McNeely in sod., 1995). Kljub dokazanemu antimikrobenm delovanju vseh omenjenih substanc v OF je direktno ovrednotenje njihovega doprinosa k nevtralizaciji virusov izredno težavno. V določenih specifičnih pogojih in s prisotnostjo nekaterih specifičnih povzročiteljev bolezni (raziskave so bile opravljene predvsem pri posledicah kariesa pri ljudeh) lahko celo pomagajo nekaterim bakterijam pri kolonizaciji ustne votline. Prav tako naj ne bi imelo zamrzovanje oziroma hlajenje negativnega vpliva na preživetje PRRSV, temveč raziskave zagovarjajo nasprotno (Benfield in sod., 1992; Jacobs in sod., 2010). Nadalje gre razloge za neuspešen prenos PRRSV iskati v individualnih lastnostih mladice in pogojih v hlevu. Če primerjamo mladice iz skupin V in VI, so bile te uhlevljene v bistveno boljših pogojih kot mladice iz skupin od I do IV. Kakovost bivanjskih pogojev in količina stresnih dejavnikov lahko zelo vpliva na imunski status in s tem dojemljivost za različne okužbe (Pruett, 2003). Pri obeh skupinah so bile vse preiskave seruma in OF s testoma PCR in ELISA negativne; izjemo je predstavljala mladica številka 7 iz skupine VI, pri kateri smo med 7. in 28 DPI dokazali prisotnost specifičnih protiteles v serumu ($S/P = 0,54-1,15$). Pri njej smo klinično zaznali blag unilateralni kataralni konjunktivitis, ki se je pojavil 3 dni po uhlevitvi in je vztrajal tekom celotnega poskusa. Pri vseh ostalih živalih v skupini v serumu in OF prisotnosti RNA PRRSV in specifičnih protiteles nismo dokazali, kot tudi ne posebnih kliničnih znamenj (normalna telesna temperatura, odsotnost respiratornih motenj, živahnost, ohranjen apetit). Natančnega razloga za pojav specifičnih protiteles pri mladici številka 7 ne moremo določiti brez dodatnih preiskav. Ena od strokovnih razlag je, da smo pri tej mladici prisotnost nizkega nivoja specifičnih protiteles dokazali pri štirih zaporednih vzorčenjih, od 7 do 28 DPI. Kljub temu, da RNA PRRSV v individualnih vzorcih seruma nismo dokazali, morda zaradi zelo nizke začetne količine, bi lahko pri njej po kontaktu s kužnino prišlo do specifičnega imunskega odziva in tvorbo protiteles. Po drugi strani pa lahko špekuliramo, da smo pri izvedbi zaznali ELISA nespecifično reakcijo, glede na dejstvo, da pri svinji razen konjunktivitisa ni bilo prisotnih kliničnih znamenj okužbe. Zoper to dejstvo imamo protiargumente, saj so se v drugih skupinah živali, kjer je uspešno potekla aklimatizacija, prav tako v ELISA pojavili primeri začetnih S/N vrednosti, ki so podobni vrednostim pri serumskih vzorcih mladice št. 7 v VI. Ob tem se je seveda potrebno vprašati, zakaj je prišlo do edine in nizke serokonverzije le pri eni mladici od 16, čeprav so vse žvečile iste vrvi. To zelo jasno ponazori, kako lahko individualne telesne karakteristike vplivajo na izid neke okužbe, pri čemer ne vemo, koliko je bilo virulentnega virusa v vrveh (kontaktna infektivna doza), namenjenih za prekuževanje VI skupine. Če bi na primer samo z uporabo vrvi uspeli izzvati evidentno serokonverzijo, a ne povzročiti klinično zaznavne okužbe, bi bil to idealen primer aklimatizacije mladice. Seveda bi bilo v našem primeru potrebno nivo imunske zaščite še preveriti, na primer tako, da bi taki mladici naknadno inokulirali isti sev virusa in spremljali njen klinični in imunološki status. Vseeno rezultat v VI skupini daje upanje, da bi teoretično aklimatizacijo lahko izvajali le z uporabo vrvi, pri čemer sklepamo,

da bi bile bolj učinkovite vrvi, ki so sveže prepojene z OF, kot tudi, da bi poskus morali izvesti v pogojih enake okoljske obremenitve, kot je le ta na povprečni komercialni farmi.

Zaradi neuspelega poskusa okužbe mladic iz skupin V in VI (ena žival je lahko le raziskovalno in statistično naključje), smo OF iz prepojenih vrvi za prekuževanje dvakrat dodatno poslali na preiskavo z metodo RT-PCR v realnem času, z dvema različnima komercialnima kompletoma reagentov. Leta 2017 smo RNA PRRSV tako dokazali v vseh preiskanih vzorcih OF iz vrvi za prekuževanje mladic iz skupin V in VI (Tabela 7). Vrednosti Ct so se gibale med 27,28 in 33,96 iz česar sklepamo na večjo prisotnost RNA PRRSV. Leta 2019 smo pri 4 od 7 vzorcev dokazali prisotnost RNA PRRSV (57 %), pri čemer je vrednost Ct variirala med 30,58 in 40,00. Vrednost Ct je obratno sorazmerna s količino ugotovljene RNA PRRSV v vzorcu in je bila po dveh letih med opravljenima preiskavama nekoliko manjša, vendar po drugi strani nismo uporabili istih reagentov za dokazovanje RNA PRRSV, zato zgolj iz tega podatka nikakor ne moremo sklepati o količini virusa v vzorcu, sploh pa ne o njegovi sposobnosti okužbe prašiča. Bistvena pomanjkljivost molekularnih metod za detekcijo je namreč odsotnost informacije o sposobnosti samega virusa (virulenci) za okužbo celic, saj z omenjenimi metodami dokazujemo le prisotnost RNA PRRSV, ne pa celotnih virulentnih virionov.

Čeprav sta glede načina prenosa PRRSV parenteralna pot in okužba s semenom merjasca bolj učinkoviti kot je peroralna okužba, smo za naše raziskovalno delo izbrali peroralni način prekuževanja. Glavni razlog temu je, da je odvzem OF in shranjevanje vrvi zelo enostavno in ne zahteva veliko dela z individualnimi prašiči. Hkrati pa smo pričakovali, da bi se v primeru pozitivnih rezultatov praktično povečala uporabnost te metode v terenskih pogojih, saj bi lahko ta način prekuževanja izvajal rejec brez prisotnosti veterinarja ter tako zagotovil aklimatizacijo mladic s homolognim hlevskim sevom virusa. Tak način bi namreč predstavljal prednost v primerjavi z uporabo živih oslabljenih cepiv, kjer je treba prašiče cepiti individualno, zaščita pa večinoma ni homologne narave. Slabost takega pristopa je seveda v nenadzorovanih vplivih na sam potek prekuževanja, od možnosti stika posamezne živali s kužnino in količine PRRSV v kužnini do morebitne prisotnosti drugih potencialno patogeni mikrobi v kužnini, kar lahko vpliva na zdravstveno stanje živali. Magar in Larochelle (2004) navajata, da je za peroralno pot okužbe v 50 % primerov dovolj $10^{5.3}$ TCID virusa v mililitru kužnine. Hermann in sod. (2005) navajajo, da se v oro-nazalnih sekretih prašiča nahaja do $10^{4.3}$ TCID v mililitru kužnine, Frydas in sod. (2015) pa navajajo število 10^{3-4} TCID, a ob dejstvu, da je bilo v brisih žrela od 2- do 3-krat več PRRSV v primerjavi z brisom nosnega pretina, pri čemer sta navedeni vrednosti nekoliko nižji od potrebne infektivne doze, ki jo navajata Magar in Larochelle (2004). Po našem mnenju in kliničnih izkušnjah ne drži nujno, da je okužba z ustno tekočino nemogoča. Srednja vrednost pri infektivni dozi v praksi pove le povprečno število virionov sposobnih okužbe, iz česar sledi, da obstaja v populaciji določen delež živali, ki za uspešno okužbo potrebuje manjšo količino infektivnega virusa od navedene ID₅₀. Se pa seveda na tem mestu postavlja vprašanje uporabljenih metodologij, s katero so različni avtorji definirali število virusnih delčkov, in vprašanje, ali so se sploh ozirali na njihovo sposobnost za okužbo, tj. virulenco. Pri vsem tem se seveda različno upošteva tudi

stanje in učinkovitost telesne obrambe pred okužbo, ki nenazadnje igra glavno vlogo pri razširjanju okužbe s PRRSV.

Dodatno smo pred izvedbo poskusa menili, da bodo prašiči vrvi tudi ovohavali, s čimer bodo, glede na obnašanje prašičev, na vrvi nanesti tudi drug biološki material z PRRSV. V vrveh je tako prisoten na primer feces, urin, nosni izcedek, lahko celo kri. Prašiči se v borbi za prostor in socialni položaj ob igri pogosto tudi grizejo, kar bi morale povečati možnosti za uspešen prenos za okužbo sposobnega virusa. Ob vsem strokovnem razpredanju gre pri raziskavah TCID vendarle za rezultate iz eksperimentalnih okužb, opravljenih pod točno določenimi in kontroliranimi pogoji (Benfield in sod., 2000, Frydas in sod., 2015, Hermann in sod., 2005, Yoon in sod., 1999). Praktično v vseh strokovnih in znanstvenih raziskavah na področju prenosa PRRSV avtorji ugotavljajo, da se virus zlahka prenaša, ne le z neposrednim kontaktom, pač pa tudi s posrednim kontaktom z živalskimi izločki na daljše razdalje preko kontaminiranih predmetov in površin (Dee in sod., 2002). Težko je opredeliti jasen, morda tehničen vzrok, da v našem primeru okužba zgolj z uporabo vrvi ni uspela, saj lahko na okužbo vplivajo različni dejavniki, ki pa jih v zasnovi poskusa nismo predvideli ali jih morda niti ne poznamo. Ena izmed možnosti bi lahko bila, da je ID_{50} med transportom vrvi padel pod nivo, ki zadostuje za uspešno okužbo. Natančno ocenjevanje infekcijskih doz je lahko glede na uporabo standardnih statističnih analiz podvrženo tudi 30 % odstopanju od dejanskega rezultata (Kundi, 1999). Tudi okolje in mikroklimatski pogoji v hlevih za izvajanje poskusov so drugačni, bolj optimalni kot v intenzivni prireji. Med našim poskusom na VF UL smo mladice v skupinah V in VI vsak dan zagotavljali kar se da primerne mikroklimatske pogoje, vključno s temperaturo zraka, relativno vlago in prezračevanjem hleva. Prav tako smo jih krmili ročno, mladice so imele na voljo bistveno več talne površine kot na farmi, poleg omenjenega so imele za igro na voljo slamo, bokse smo dvakrat dnevno temeljito čistili. Vsi ti dejavniki v poskusnem hlevu so bistveno zmanjšali breme patogenov v okolju, torej na površinah in v aerosolu. Uhlevljenim mladice na VF UL smo ves čas poskusa zagotavljali čim boljše pogoje glede dobrobiti in na ta način poskušali čim bolj zmanjšati dejavnike stresa. Tako akutni kot kronični stres negativno vplivata na delovanje imunskega sistema, kar poveča možnosti za razvoj različnih obolenj. Možnosti za širjenje bolezni so v takih pogojih bistveno manjše kot v intenzivnih pogojih rejne. V intenzivni proizvodnji prašičev, kjer je prisoten PRRSV, se nahaja ogromna količina virusa v živalskih izločkih in aerosolu, mladice pa so izpostavljene stresu zaradi predhodnega transporta in združevanja z drugimi živalmi. Pogoji v intenzivnih rejah pogosto izpolnjujejo le minimalne zahteve za zagotovitev sprejemljivih pogojev za rejne živali. Prašičem je tako na voljo omejena talna površina, tla so običajno rešetkasta, prašiči nimajo na voljo primerne materiala za zaposlitev. Vse to povečuje stres pri prašičih.

Pri ugotavljanju prisotnosti protiteles v OF s komercialnim kompletom reagentov smo naleteli na nepričakovano pozitivne rezultate. Pri skupinah I–IV smo z metodama RT-PCR in ELISA namreč potrdili, da v nobenem individualnem vzorcu seruma na dan uhlevitve ni bilo prisotne RNA PRRSV ali protiteles proti PRRSV. V nasprotju s pričakovanji smo pri preiskavi skupinskega vzorca OF mladic iz skupin II, III in IV s testom ELISA za detekcijo specifičnih

protiteles v OF ugotovili prisotnost le-teh. V istih vzorcih OF prisotnosti RNA PRRSV nismo dokazali. Prav tako teh vzorcev nismo jemali na isti dan, tako da tu ne gre iskati razloga za morebitno navzkrižno kontaminacijo. Odsotnost RNA PRRSV v kombinaciji s prisotnostjo protiteles v nekaterih primerih nakazuje, da smo vzorec OF odvzeli korektno, brez navzkrižne kontaminacije. Tekom zbiranja vzorca so vrvi namreč izpostavljene hlevski mikroklimi, ki bi potencialno lahko kontaminirala odvzeto OF. Test je bil glede na kontrole, priložene s strani proizvajalca komercialnega kompleta reagentov, veljaven. Sklepamo, da je bil pozitiven rezultat na prisotnost specifičnih protiteles na dan uhlevitve najverjetneje posledica nespecifične reakcije pri vezavi proteinov na antigene v mikrotitrskih jamicah, vezave konjugata nanje v drugi fazi reakcije indirektnega testa ELISA in končne pozitivne barvne reakcije na podlagi merjenja optične gostote in izračuna S/P razmerja. Meja za pozitiven rezultat je postavljena pri $S/P \geq 0,4$; vrednost izračunanega S/P na dan uhlevitve pri skupini II v skupinskem vzorcu OF je bil natanko 0,4. Ker smo prisotnost protiteles pri skupinah III in IV ugotovili tudi dva tedna kasneje, prav tako v kombinaciji z odsotnostjo RNA PRRSV na dan uhlevitve, in glede na to, da v nobenem individualnem vzorcu seruma na dan uhlevitve nismo ugotovili specifičnih protiteles proti PRRSV, smo se glede domnevne nerazložljive težave obrnili na proizvajalca komercialnega kompleta reagentov s predlogom za rešitev težave. Po navedbah zastopnika se je tudi nekaj drugih uporabnikov obrnilo na podjetje s podobnim problemom, t. i. lažno pozitivnega rezultata. Podjetje je imelo namen ta laboratorijski diagnostični test umakniti iz redne prodaje do optimizacije produkta. Ponudili so nam, da jim lahko pošljemo vzorce, da bodo opravili interne preiskave v svojem laboratoriju in rezultate primerjali še s komercialnim kompletom reagentov konkurenčnega proizvajalca ter z uporabo internih kontrolnih vzorcev. Njihove meritve niso pokazale odstopanj od naših rezultatov, prav tako so dobili primerljive rezultate tudi z uporabo drugega diagnostičnega kompleta reagentov, ki niso predmet te raziskave. Glede na dobljene pozitivne rezultate določanja prisotnosti protiteles na dan 0, ko z metodo PCR prisotnosti RNA PRRSV nismo dokazali, smo lahko le delno potrdili tudi prvi dve postavljeni hipotezi, da lahko v OF z enako zanesljivostjo določamo specifična protitelesa proti PRRSV kot v individualnih vzorcih seruma. Številni avtorji zgodnjih raziskav, ki preučujejo uporabnost OF prašičev pri diagnostiki PRRS, navajajo, da je možnost za kontaminacijo materiala ob odvzemu vzorca izredno majhna (Kittawornrat in sod., 2010; Prickett in sod., 2010; Ramirez in sod., 2012; Gerber in sod., 2013; White in sod., 2014). Lebert in sod. (2019) so se v svoji raziskavi posvetili tudi sami metodologiji priprave in shranjevanju vzorca pred izvedbo diagnostičnih preiskav. Za referenco so se oprli na tri starejše raziskave, ki so se razlikovale glede uporabljenega števila vrtljajev pri centrifugiranju v procesu priprave OF vzorca za ELISA (Ramirez in sod., 2012; Olsen in sod., 2013a; Kittawornrat in sod., 2014). V njihovi raziskavi uporabili hitrost $1.000 \times g$ oziroma $15.000 \times g$ na minuto za 10 minut in ugotovili, da so pri vzorcih z večjim številom obratov na minuto dobili nižje vrednosti Ct, kot pri manjšem številu obratov. Centrifugiranje pri manjšem številu obratov iz OF pomaga odstraniti predvsem mehanske nečistoče, večje število obratov pa odstrani tudi nekatere encime, ki vplivajo na intrinzično razgradnjo virusa oziroma njegove RNA v OF (Gibert in sod., 2017). Ni pa znano, kaj bi lahko bil razlog za lažno pozitivne rezultate pri dokazovanju specifičnih

protiteles v OF, morda je rešitev tudi v dvigu mejne vrednosti, ki predstavlja mejo med pozitivnim in negativnim vzorcem (angl. *cut off value*).

V nekaterih raziskavah omenjajo prav to, da bi bilo v primeru določenih komercialnih ELISA in odčitavanju ter z dodatnimi validacijami mogoče narediti popravek v določanju mejne vrednosti S/P. V primeru mejno pozitivnih rezultatov je mogoče tudi prilagoditi mejno vrednost glede na ocenjeno prevalenco bolezni v primerjavi z rezultati, dobljenimi z nekaterimi drugimi diagnostičnimi metodami za določevanjem specifičnih protiteles. Rezultati raziskav različnih avtorjev na primer za komercialni komplet reagentov navajajo različne stopnje specifičnosti in zanesljivosti. Sapundžič in sod. (2020) navajajo, da ima komercialni komplet reagentov 94,7-odstotno občutljivost in 83-odstotno zanesljivost, medtem ko Biernacka in sod. (2018) navajajo 98,6-odstotno zanesljivost in le 63,64-odstotno specifičnost. Oboje je znatno manj od navedbe proizvajalca, ki zagotavlja 99-odstotno zanesljivost in 97-odstotno specifičnost. Biernacka in sod. (2018) v svoji raziskavi izpostavljajo, da pri rezultatih dokazovanja prisotnosti specifičnih protiteles na rezultat lahko zelo vpliva epidemiološki status prašičev na farmi. Tako na primer so se velika odstopanja pojavljala v rejah s stabilno plemensko čredo, kjer PRRSV v krvi ni bilo več mogoče dokazati in v rejah, kjer so redili le starejše pitance, ki so PRRSV že preboleli tekom pitanja. Avtorji zato svetujejo, da je ob dokazovanju specifičnih protiteles vedno upoštevati tudi epidemiološke podatke o rejah, klinični status prašičev, serološko diagnostiko pa naj se uporablja v kombinaciji z metodo RT-PCR za vzoredno detekcijo RNA PRRSV v odvzetih vzorcih. Na primeru primerjave 4 različnih komercialnih ELISA za dokazovanje specifičnih protiteles proti parazitu trosovcu *Mycoplasma gondii* so Felin in sod. (2017) ugotavljali specifičnost in občutljivost glede na korelacijo z metodo modificirane aglutinacije (MAT). Eden od proizvajalcev kompleta reagentov je tudi dvignil mejno vrednost za pozitiven rezultat in na ta način povečal specifičnost testa ob nespremenjeni občutljivosti. Z obširnejšo primerjalno raziskavo bi lahko podobno dosegli tudi pri dokazovanju specifičnih protiteles proti PRRSV. Pomanjkljivost raziskave, ki jo izpostavljajo Felin in sod. (2017), je, da je bila izvedena na vzorcih, pridobljenih na terenu, natančneje v klavnici in ni zajemala natančne količine protiteles v vzorcih, v povezavi z rezultatom oziroma z mejo detekcije. Xing in sod. (2005) so modificirali ELISA z neposrednim razredčevanjem vzorca na mikrotitrski plošči za dokaz specifičnih IgG proti virusu japonskega encefalitisa in tako obstoječemu testu poleg kvalitativne dodali še kvantitativno komponento. Glede na dokaz specifičnih protiteles v OF so Henao-Diaz in sod. (2020) preučevali ravno problematiko pomanjkljive specifičnosti testa za določanje specifičnih protiteles proti PRRSV v OF prašičev. Izpostavili so problem, primerljiv našemu. Priporočena mejna vrednost za dokaz protiteles je po navodilih proizvajalca postavljena pri S/P večjem ali enakem od 0,4, s predvideno specifičnostjo metode večje ali enako 97 %. Henao-Diaz in sod. (2020) so preiskali 596 vzorcev OF prašičev cepljenih proti PRRS v terenskih pogojih, 1574 vzorcev s farm prostih PRRSV in 1380 vzorcev s farm neznanega statusa glede PRRSV. Ugotovili so, da se pri spremembi višine mejne vrednosti S/P specifičnost testa izboljša s predvidenih 97 % na 99,2 %. Na ta način se je dvajsetim rejam s predhodno neznanim statusom glede prisotnosti PRRSV po določitvi

nove mejne vrednosti spremenil status iz pozitivnega v negativnega. Avtorji članka navajajo, da na merjenje optične gostote in izračun S/P za določitev prisotnosti protiteles nezanemarljivo vplivajo menedžment in rejni pogoji. Slednji naj bi imeli vpliv na količino primesi v vzorcu, vendar bi bilo treba tezo, da ima to vpliv na odčitavanje vrednosti OD zelo natančno preveriti. Glede na to, da proizvajalec komercialnega kompleta ELISA uporabljenega v tej raziskavi ne navaja, kateri razred Ig zaznavamo s konjugatom, bi morda lahko diskutirali tudi o porastu nivoja IgA v OF zaradi stresa. Ta fenomen je namreč opisan in preučen pri ljudeh in živalih (Tsujita in Morimoto, 1999; Jarillo-Luna in sod., 2007; Muneta in sod., 2010). Do primerljivih zaključkov so prišli Craft in sod. (2020), ki so uporabljali ELISA istega proizvajalca, s prilagojeno mejno vrednostjo za pozitiven rezultat $S/P \geq 0,8$. Določili so, da ob jemanju OF iz vsaj 6 naključnih boksov na farmah, kjer je prisoten PRRSV, test doseže tudi do 100-odstotno specifičnost. Avtorji predlagajo nadaljnje preizkušanje in modifikacijo obstoječega diagnostičnega kompleta reagentov za ugotavljanje protiteles proti PRRSV v OF prašičev s prilagoditvijo mejne vrednosti S/P. Raziskavi Henao-Diaz in sod. (2020) ter Croft in sod. (2020) bi lahko služila tudi kot pojasnilo nejasnosti glede ugotovljenih pozitivnih rezultatov na prisotnost protiteles v OF na dan uhlevitve in 7 DPI v preliminarni skupini ($S/P_{DPI 0} = 0,52$), skupini II ($S/P_{DPI 0} = 0,4$ in $S/P_{DPI 7} = 1,18$), skupini III ($S/P_{DPI 0} = 0,54$, $S/P_{DPI 7} = 0,53$), in skupini IV ($S/P_{DPI 0} = 0,82$). Za uveljavitev predpostavke o dvigu vrednosti S/P kot meje za pozitivno interpretacijo rezultata so vsekakor potrebne natančne in obširne študije in validacija testa v konsenzu in sodelovanju s proizvajalcem diagnostičnega kompleta, če gre za komercialno dostopen komplet reagentov. Poleg tega se je treba zavedati, da z dvigom meje detekcije potencialno dobimo večje število lažno negativnih rezultatov. To z epidemiološkega stališča pri ekonomsko tako pomembni bolezni, kot je PRRS, nikakor ni zaželeno. Če problem predstavljajo morebitne primesi v vzorcu in ne specifičnost vezave antigen-protitelo-konjugat v ELISA, je treba več pozornosti posvetiti optimizaciji in standardizaciji obdelave vzorca pred samo izvedbo diagnostike. Če bi po vzoru Henao-Diaz in sod. (2020) za mejo, nad katero se rezultat označi kot pozitiven, določili $\{S/P = 1,0\}$, bi bili negativni vsi vzorci OF pred 14 DPI, razen pri skupini mladic II, 7 DPI ($S/P = 1,18$). Če bi se upoštevalo, da je meja za potrditev prisotnosti protiteles vrednost S/P večja ali enaka 0,8, pa bi kot pozitiven ocenili še rezultat vzorca iz skupine IV ($S/P_{DPI 0} = 0,82$). Da bi na primer to predpostavko o dvigu S/P za mejo detekcije uporabili tudi v praksi, bi morali na podlagi preskusa metode na vzorcih s točno določeno količino protiteles in znano kemijsko strukturo ter s preiskavo velikega števila kliničnih vzorcev z neznano vsebnostjo protiteles in neznanih primesi ustvariti umeritveno krivuljo ter določiti morebitni popravek formule za izračun končnega rezultata.

6 SKLEPI

H1: Skupinski vzorec ustne tekočine mladic iz enega boksa je primerljiv z individualnimi vzorci seruma istih mladic za laboratorijski dokaz RNA PRRSV in protiteles proti PRRSV. – **delno potrjena hipoteza**

- Pri analizi primerjave individualnih vzorcev seruma in skupinskih vzorcev OF nismo ugotovili statistično značilnih razlik, v obeh vzorcih lahko virus in protitelesa v preiskovanem časovnem obdobju do 56 DPI dokažemo s primerljivo verjetnostjo; kljub temu se je med vzorcema pojavilo odstopanje glede konsistentnosti detekcije v OF skozi celotno obdobje spremljanja prekuževanja in aklimatizacije.
- Zanesljivost komercialno dostopnih kompletov reagentov za določanje prisotnosti specifičnih protiteles v OF je vprašljiva. Ugotovili smo pozitivne reakcije na prisotnost specifičnih protiteles proti PRRSV v vzorcih OF, pri mladicah iz skupin II, III in IV, na dan uhlevitve, še preden so prišle v neposreden kontakt s PRRSV

H2: Po kontroliranem umetnem prekuževanju prašičev s PRRSV lahko RNA PRRSV in specifična protitelesa v ustni tekočini prašičev zaznamo in dokažemo približno v enakem časovnem intervalu, kot v njihovem krvnem serumu – **delno potrjena hipoteza**

- Pri primerjavi različnih načinov prekuževanja in aklimatizacije mladic pri analizi rezultatov glede prisotnosti RNA PRRSV in protiteles v individualnih vzorcih seruma in skupinskih vzorcih OF ni bilo zaznati specifično značilnih razlik med obema vrstama vzorcev v povezavi s časom po okužbi in načinom obravnave (metodo aklimatizacije) posamezne skupine mladic.
- Zaradi enakega razloga vprašljive zanesljivosti komercialnih kompletov reagentov za detekcijo specifičnih protiteles v OF lahko hipotezo potrdimo le delno.

H3: Mladice se z žvečenjem bombažnih vrvi, prepojenih z ustno tekočino PRRSV viremičnih prašičev, hitreje kontrolirano umetno okužijo s PRRSV, pri čemer je njihov sistemski imunski odziv močnejši in učinkovitejši, kar vodi v hitrejšo serokonverzijo – **potrjena hipoteza**

- Pri različnih načinih prekuževanja mladic smo ugotovili pomembne statistično značilne razlike med skupinama mladic I in II (skupina A) ter III in IV (skupina B).
- Pri skupinah mladic III in IV, kjer smo kot dodatek za prekuževanje uporabili vrvi, prepojene z OF viremičnih prašičev, so se mladice začele prekuževati hitreje, hitreje pa so se začela tvoriti tudi specifična protitelesa.
- Pri skupinah mladic III in IV smo prav tako ugotovili statistično značilno razliko 28 DPI, in sicer je bilo v primerjavi s skupinama I in II v tej skupini bistveno manj viremičnih mladic.

H4: Aklimatizacijo mladic na bolezen, ki so bile izpostavljene vrvem, prepojenih z ustno tekočino PRRSV viremičnih živali, dosežemo prej kot s prekužitvijo po naravni poti – **hipoteze ni mogoče nedvoumno potrditi**

- Pri nobeni skupini uspešno okuženih mladic (skupine I–IV) niso vse živali do zadnjega dne poskusa (56 DPI) uspešno eliminirale virusne RNA, bodisi iz seruma bodisi iz OF.
- Pri vseh mladica h smo ugotovili serokonverzijo, najkasneje 35 DPI.
- Pri skoraj polovici vseh okuženih mladic je viremija potekala intermitentno, bifazno.
- Poskus prekuževanja naivnih mladic v kontroliranih pogojih z znanimi spremenljivkami, zgolj z uporabo vrvi, prepojenih z OF PRRS pozitivnih prašičev (skupini mladic V in VI), je bil neuspešen.
- Pri nobeni izmed mladic iz skupin V in VI nismo uspeli določiti virusne RNA po izpostavitvi kužnini v vrvem.
- Pri eni mladici smo z ELISA ugotovili prisotnost specifičnih protiteles proti PRRSV.

7 POVZETEK

Prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom (PRRS) povzroča istoimenski virus (PRRSV). Gre za gospodarsko eno izmed najbolj pomembnih bolezni v intenzivni prašičereji in brez izvajanja ukrepov proti PRRS reja prašičev dolgoročno ne more doseči finančno donosne proizvodnje prašičev. Eden izmed možnih ukrepov proti PRRS je kontrola bolezni, pri kateri so najpomembnejša kategorija nadomestne mladice, s katerimi nadomestimo iz reje izločene plemenske svinje. Mladice, ki morajo biti potrjeno proste PRRSV, je treba pred uhlevitvijo v plemensko čredo na farmi s potrjenim PRRS, aklimatizirati. To pomeni, da te mladice prekužimo, najbolje s homolognim hlevskim sevom PRRSV, in na ta način poskrbimo, da mladice bolezen prebolijo in proti povzročitelju ustvarijo čim boljšo imunost. Ko aklimatizirane mladice prestavimo v plemensko čredo, tako izzvana imunost preprečuje akutne izbruhe PRRS in njegove negativne klinične in gospodarske posledice v reji. Pri kontroli bolezni so pomembne laboratorijske metode za ugotavljanje RNA PRRSV in specifičnih protiteles, saj na podlagi detekcije le-teh v bioloških vzorcih ugotavljamo uspešnost aklimatizacije. Kot vzorec se najpogosteje uporabljajo vzorci krvi oziroma seruma. Ker je vzorčenje seruma velikemu številu prašičev naporno, zamudno in stresno za prašiče, preiskava velikega števila vzorcev pa draga, se v diagnostiki PRRS vedno pogosteje poslužujemo skupinskih vzorcev ustne tekočine (angl. *oral fluid*; OF) prašičev, v katerih lahko zaradi svojih lastnosti prav tako uspešno dokazujemo RNA PRRSV in specifična protitelesa.

V našem delu smo spremljali naravno prekužitev in aklimatizacijo mladic na PRRSV pri šestih različnih skupinah mladic. Za prekuževanje pa smo uporabili različne načine, jih primerjali med seboj z ugotavljanjem RNA PRRSV in specifičnih protiteles proti PRRSV v individualnih vzorcih seruma in skupinskih vzorcih OF. V vsaki skupini je bilo 16 mladic, katerim smo tedensko, 9 tednov zapored, odvzeli prej omenjene vzorce seruma in OF. V vseh vzorcih smo dokazovali prisotnost RNA PRRSV z metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) in prisotnost specifičnih protiteles z encimsko imunskim testom (ELISA). Prve 4 skupine mladic (I–IV) so v prostore za aklimatizacijo na farmi, kjer je dokazano prisoten PRRSV prispele pri starosti 12 tednov, s farme, kjer PRRS niso nikoli dokazali. Pri skupinah mladic I in II (skupina A) smo za prekuževanje uporabljali le izpostavitve prašičem okuženih s PRRSV in njihovim izločkom z naravnim kontaktom. Pri skupinah III in IV (skupina B) smo poleg naravnega kontakta z okuženimi prašiči in njihovimi izločki uporabili še bombažne vrvi, prepojene z OF s PRRSV okuženih mladic iz skupin I in II. Pri skupinah V in VI (skupina C) pa smo neokužene mladice namestili v razkužene hleve in želeli prekužitev in aklimatizacijo doseči zgolj z uporabo vrvi, prepojenih z OF, ki je vsebovala hlevski sev PRRSV. Takoj po uhlevitvi smo z obema metodama potrdili, da na dan uhlevitve pri nobeni mladici ni bilo mogoče dokazati ne RNA PRRSV ne specifičnih protiteles. Ob primerjavi vzorcev skupin A in B smo ugotovili, da se pri skupini B, kjer smo za prekuževanje poleg izpostavitve PRRSV v hlevu uporabili še s PRRSV kontaminirane vrvi, večji delež mladic okuži s PRRSV 7 DPI. Nasprotno pa je 28 DPI pri

skupini B delež mladice z dokazano RNA PRRSV statistično značilno manjši, torej je pri mladice iz skupine B RNA PRRSV prej padla pod zaznavno raven detekcije. Pri detekciji specifičnih protiteles smo ugotovili, da je mogoče pri skupini B 14 in 21 DPI mogoče v primerjavi s skupino A dokazati specifična protitelesa pri statistično značilno večjem deležu mladice in s povprečno višjo vrednostjo S/P. S tem smo potrdili, da lahko z dodatkom vrvi, prepojenih z OF s PRRSV okuženih prašičev, ki jih mladice žvečijo, prej zagotovimo tesen kontakt s PRRSV in na ta način prej izzovemo okužbo in tudi tvorbo specifičnih protiteles. Pri primerjavi rezultatov dokazovanja RNA PRRSV v individualnih vzorcih seruma in skupinskih vzorcih OF nismo ugotovili specifično značilnih razlik, torej sta oba vzorca primerna za dokazovanje RNA PRRSV. Kljub prej izzvani okužbi in hitrejši tvorbi specifičnih protiteles pri mladice v skupini B smo pri obeh skupinah zadnji dan vzorčenja, 56 DPI, lahko pri posameznih mladice še ugotovili prisotno RNA PRRSV. Pri dokazovanju specifičnih protiteles v OF smo z uporabo komercialnih kompletov reagentov pri skupinah mladice II, III in IV ugotovili pozitivno reakcijo na prisotnost protiteles že na dan uhlevitve, čeprav RNA PRRSV pri teh mladice nismo dokazali. Zaradi nespecifičnih rezultatov je medtem proizvajalec komercialnega kompleta reagentov izdelek za detekcijo specifičnih protiteles v OF prašičev umaknil iz redne prodaje. Pri skupini C le z uporabo bombažnih vrvi, prepojenih z OF prašičev z dokazano prisotno RNA PRRSV, aktivne okužbe nismo uspeli izzvati. Pri nobenem prašiču iz skupine C namreč nismo po uporabi teh vrvi uspeli iz nobenega vzorca izolirati RNA PRRSV. Prav tako nismo dokazali prisotnosti specifičnih protiteles pri mladice iz teh skupin, z izjemo mladice številka 7 iz skupine VI. Pri tej mladici smo v individualnem vzorcu seruma potrdili pozitivno reakcijo na prisotnost specifičnih protiteles od 7 DPI do 28 DPI.

S pridobljenimi in analiziranimi rezultati ter nadaljnjimi raziskavami na tem področju želimo izboljšati in poenostaviti kontrolo PRRS. Dokazali smo, da OF prašičev ni uporabna le kot vzorec za detekcijo RNA PRRSV, ampak da bi bilo OF mogoče uporabiti tudi v druge namene, kot na primer v našem delu, in sicer za prekužitev in aklimatizacijo oziroma pospešitev aklimatizacije. Na tem področju je z dodatnimi raziskavami še veliko prostora za izboljšave. Prav tako so dodatne raziskave in izboljšave potrebne pri uporabi OF za detekcijo specifičnih protiteles proti PRRSV, pri detekciji katerih smo ob uporabi dostopnih komercialnih kompletov za detekcijo naleteli na neželene težave. Zgolj z uporabo OF prašičev s potrjeno prisotnostjo RNA PRRSV nismo uspeli okužiti zdravih mladice v naši raziskavi, kar je v nasprotju s poročanju večine znanstvenih raziskav o prenosu PRRSV v populaciji domačih prašičev.

8 SUMMARY

Swine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is caused by the virus of the same nomenclature (PRRSV). Economically, it is one of the most important diseases in intensive pig farming, and without the implementation of measures against the PRRS, pig breeding cannot be financially profitable in the long run. One of the measures against PRRS is disease control; the most important category there are replacement gilts used to replace culled breeding sows. Replacement gilts must be PRRSV-free before entering the PRRS-positive farm and must be acclimatized before being placed in a breeding herd, meaning these gilts must be infected, preferably with a homologous farm-strain of PRRSV. After infection, gilts create the immunity against farm strain of PRRSV. After acclimatization, when gilts are transferred to the breeding herd, their immunity prevents them from acute outbreaks of PRRS and its negative consequences in breeding herd, both clinical and economical. In disease control, laboratory methods for the detection of PRRSV RNA and specific antibodies are important, as the success of acclimatization is determined based on detection of PRRSV RNA and specific antibodies in biological samples. Blood or sera samples are most commonly used in PRRS diagnostics. Blood sampling of large numbers of pigs is difficult, time-consuming, and stressful for pigs, and testing large numbers of samples is also expensive. Therefore, in PRRS diagnostics, group samples of oral fluid (OF) from pigs are increasingly being used for detection of PRRSV RNA and specific antibodies.

In our research, we monitored control measure of natural exposure and acclimatization of gilts for PRRSV, in six different groups. Different methods were used for exposure to PRRSV, which were then compared regarding detectability of PRRSV RNA and specific antibodies against PRRSV in individual serum samples and group OF samples. Each group consisted of 16 replacement gilts. Once a week, 9 weeks in a row, individual sera and OF samples were collected. All obtained samples were tested for presence of PRRSV RNA with reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) and for presence of specific antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The first 4 groups of 12-week-old gilts (I–IV), undergo acclimatization at the PRRS-positive farm. Replacement gilts arrived from the PRRS-negative farm. In groups I and II (group A), natural exposure to PRRSV-infected pigs and their excrements was used for infection and acclimatization of the gilts. In groups III and IV (group B), we also used cotton ropes soaked in OF from PRRSV infected piglets from groups I and II, in addition to natural exposure to infected pigs and their excrements. In groups V and VI (group C), PRRS-negative pigs were in housed to disinfected barns. We wanted to infect and acclimatize these gilts using only ropes soaked with OF, which contained the farm strain of PRRSV. Immediately after in-housing gilts to the clean and disinfected facilities, we confirmed that neither RNA PRRSV nor specific antibodies could be detected at the day of arrival. When comparing samples from groups A and B, we found that in group B (where ropes soaked with OF from PRRS-positive pigs were used) a larger proportion of gilts got infected with PRRSV 7 DPI. In contrast, 28 DPI, the proportion of pigs with confirmed presence of RNA PRRSV was significantly lower, in gilts from group B RNA PRRSV

compared to gilts from group A. When detecting specific antibodies, specific antibodies could be detected in groups B 14 and 21 DPI, at a statistically significantly higher proportion of pigs and with an average higher S/P value, compared to group A. This finding confirmed that by adding ropes soaked with OF of PRRSV-infected pigs, close contact with PRRSV is ensured and infection can be provoked earlier, which results in formation of specific antibodies. When comparing the results of PRRSV RNA detection in individual serum samples and group OF samples, no statistically significant differences were detected, therefore both samples are appropriate for PRRSV RNA detection. Despite the previously induced infection and faster formation of specific antibodies in gilts from group B we were able to detect the presence of RNA PRRSV in individual blood samples on the last day of sampling, 56 DPI, in both groups. When detecting specific antibodies in OF, we used commercial kits. In groups II, III and IV we discovered a positive reaction for presence of antibodies on the day of in-housing, although no PRRSV RNA was detected in these pigs. Due to non-specific results, the manufacturer of the commercial kit meanwhile withdrew the product for the detection of specific antibodies in OF pigs from the list of regular products. In group C, we were unable to induce active infection only by use only cotton ropes soaked in OF from PRRS-positive pigs. We were not able to isolate PRRSV RNA from any of the tested samples in group C after using these ropes. We were also unable to demonstrate the presence of specific antibodies in gilts from these groups, except for gilt number 7 from group VI, in which specific antibodies were detected from 7 DPI to 28 DPI in individual sera samples.

With obtained and analysed samples and results from this study and further research in this field, we aim to improve and simplify the measure of PRRS control. We proved that the pig OF is not only useful as a sample for the detection of PRRSV RNA, but it could also be used for other purposes, such as infection, and acclimatization or acceleration of the acclimatization. There is still a lot of margins for improvement in this area with additional research. Additional research and improvements are also needed in the use of OF for the detection of specific antibodies against PRRSV, where we encountered troubleshooting using available commercial detection kits. With the use of pig OF with confirmed presence of RNA PRRSV alone, we failed in infecting healthy gilts in our study, contrary to most scientific studies on the transmission of PRRSV in the domestic pig population.

9 ZAHVALE

Najprej se želim zahvaliti mentorici dr. Marini Štukelj in somentorici dr. Urški Jamnikar-Ciglencečki za strokovno podporo in modre nasvete. Predvsem, da nista obupali nad mano, tudi takrat ko sem že metal puško v koruzo.

Zahvaliti se želim še vsem članom komisije, prof. dr. Tadeju Malovrhu, prof. dr. Petru Hostniku in izr. prof. dr. Špeli Malovrh. Posebno prof. Malovrh je izredno detajlno pregledal poglavje o imunologiji. S svojimi strokovnimi in tudi kakšnim življenjskim nasvetom je bil zaključek naloge zelo prijeten.

Izdatna zahvala gre Petru Njegovcu, dr. vet. med., ki je v dogovoru z našimi največjimi rejami prašičev sploh omogočil izvedbo poskusa in poskrbel, da so mi bila njihova vrata vedno odprta. Na terenu pa je bil najboljši pomočnik in včasih tudi učitelj, naš tehnik Jože Ilc. Ne gre pa pozabiti niti nekaterih študentov, ki so se za pomoč pri vzorčenju odrekli svojemu prostemu času.

Za pregled poglavja o patologiji gre posebna zahvala tudi Kristini Tekavec in doc. dr. Tanji Švara.

Zahvalil bi se tudi Stephenu Hennartu in podjetju Indical ter prof. dr. Ivanu Toplaku, ki so mi brezplačno omogočili izvedbo nekaterih nenačrtovanih diagnostičnih preiskav.

Za statistično analizo rezultatov je poskrbel dr. Marek Brabec, za lekturo pa Katarina Vrtovec.

Za pregled referenc se lepo zahvaljujem mag. Brigiti Greccs-Smole.

Posebna zahvala pa gre tudi:

- vsem sodelavcem in članom Društva podiplomskih študentov in podpornikov,
- vsem sodelavcem in sodelavkam na Inštitutu,
- vsem prijateljem in kolegom,
- še posebej pa doc. dr. Aleksandri Vergles-Rataj, ker brez njenega priporočila me danes ne bi bilo v tej situaciji!

Na koncu pa še najboljši in največji navijači: moja punca Teja, whippet Tabasco in naše 3 male degujke, ki so mi krajšali urice in delali družbo na kavču.

10 LITERATURA

Ait-Ali T, Wilson AD, Westcott DG, et al. Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated swine alveolar macrophages. *Viral Immunol* 2007; 20(1): 105–18. DOI: 10.1089/vim.2006.0078

Alba A, Morrison RE, Cheeran A, Rovira A, Alvarez J, Perez AM. OptisampleTM: open web-based application to optimize sampling strategies for active surveillance activities at the herd level illustrated using porcine respiratory reproductive syndrome (PRRS). *PLoS One* 2017; 12(7): e0176863 DOI: 10.1371/journal.pone.0176863

Albina E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Vet Microbiol* 1997; 55(1/4): 309–16. DOI: 10.1016/S0378-1135(96)01322-3.

Albina E, Carrat C, Charley B. Interferon- α response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Interferon Cytokine Res* 1998; 18(7): 485–90. DOI: 10.1089/jir.1998.18.485

Albina E, Leforban Y, Baron T, et al. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory virus. In: *Proceedings of International Symposium on Swine Infertility and Respiratory Syndrome (SIRS, PRRS, PEARS)*. Convention. Minnesota : University, College of Veterinary Medicine, 1992: 24.

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 to 1998. *Vet Microbiol* 2000; 77(1/2): 43–57.

Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, Meehan B, Ellis J, Krakowka S. Immunostimulation, PCV-2 [porcine circovirus] and PMWS [porcine wasting syndrome]. *Vet Rec* 2000; 147(6): 170–1.

Allende R, Laegreid WW, Kutish GF, Galeota JA, Wills RW, Osorio FA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol* 2000; 74(22): 10834–7. DOI: 10.1128/JVI.74.22.10834-10837.2000

Allende R, Lewis TL, Lu Z, et al. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol* 1999; 80: 307–15. DOI: 10.1099/0022-1317-80-2-307

Alonso C, Murtaugh MP, Dee SA, Davies PR. Epidemiological study of air filtration systems for preventing PRRSV infection in large sow herds. *Prev Vet Med* 2013; 112(1/2): 109–17. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.06.001

Amerongen N, Oderkerk CH, Driessen AA. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res* 1987; 21(4): 297–309. DOI: 10.1159/000261033

Amerongen AN, Veerman EC. Saliva—the defender of the oral cavity. *Oral Dis* 2002; 8(1): 12–22.

Arruda AG, Friendship R, Carpenter J, Greer A, Poljak Z. Evaluation of control strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in swine breeding herds using a discrete event agent-based model. *PLoS One* 2016; 11(11): e0166596. DOI: 10.1371/journal.pone.0166596

Arruda AG, Friendship R, Carpenter J, Hand K, Ojkic D, Poljak Z. Investigation of the occurrence of porcine reproductive and respiratory virus in swine herds participating in an area regional control and elimination project in Ontario, Canada. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64(1): 89–100. DOI: 10.1111/tbed.12343

Arruda AG, Poljak Z, Friendship R, Carpenter J, Hand K. Descriptive analysis and spatial epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) for swine sites participating in area regional control and elimination programs from 3 regions of Ontario. *Can J Vet Res* 2015; 79(4): 268–78.

Arruda AG, Sanhueza J, Corzo C, Vilalta C. Assessment of area spread of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in three clusters of swine farms. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65(5): 1282–9. DOI: 10.1111/tbed.12875.

Arruda AG, Tousignant S, Sanhueza J, et al. Aerosol detection and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): what is the evidence, and what are the knowledge gaps? *Viruses* 2019; 11(8): 712. DOI: 10.3390/v11080712

Aygan A. Nucleic acid extraction from clinical specimens for PCR applications. *Turk J Biol* 2006; 30(2): 107–20.

Baron T, Albina E, Leforban Y, et al. Report on the first outbreaks of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France. Diagnosis and viral isolation. *Ann Rech Vet* 1992; 23: 161–6.

Batista L. Porcine reproductive and respiratory syndrome diagnostics in the breeding herd. Back to the basic. *J Swine Health Prod* 2005; 13: 96–8.

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 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.

Bautista EM, Goyal SM, Yoon IJ, Joo HS, Collins JE. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5(2): 163–5. DOI: 10.1177/104063879300500204

Behrens EM, Canna SW, Slade K, et al. Repeated TLR9 stimulation results in macrophage activation syndrome-like disease in mice. *J Clin Invest* 2011; 121(6): 2264–77. DOI: 10.1172/JCI43157

Beltran-Alcrudo D, Lubroth J, Njeumi F, Pinto J, Depner K. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *FAO EMPRES. Focus on* 2007; (2): 1–5.

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(2): 127–33. DOI: 10.1177/104063879200400202

Benfield DA, Nelson C, Steffen M, Rowland RRR. Transmission of PRRS by artificial insemination using extended semen seeded with different concentrations of PRRSV. In: 31st Annual meeting of the American Association of Swine Practicioners: proceedings. Indianapolis, 2000: 405–8.

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.

Beyer J, Fichtner D, Schirrmeier H, Polster U, Weiland E, Wege H. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): kinetics of infection in lymphatic organs and lung. *J Vet Med B* 2000; 47: 9–25. DOI: 10.1046/j.1439-0450.2000.00305.x

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.

Biernacka K, Podgórska K, Tyszka A, Stadejek T. Comparison of six commercial ELISAs for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in field serum samples. *Research in veterinary science* 2018; 121: 40–5. DOI: 10.1016/j.rvsc.2018.10.005

Blankenvoorde MF, Henskens YM, Van't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Inhibition of the growth and cysteine proteinase activity of *Porphyromonas gingivalis* by human salivary cystatin S and chicken cystatin. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 1996; 377: 847–50.

Bloemraad M, de Kluijver EP, Petersen A, Burkhardt GE, Wensvoort G. Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs. *Vet Microbiol* 1994; 42(4): 361–71. DOI: 10.1016/0378-1135(94)90067-1

Boddicker N, Waide EH, Rowland RR, et al. Evidence for a major QTL associated with host response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus challenge. *J Anim Sci* 2012; 90(6): 1733–46. DOI: 10.2527/jas.2011-4464

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. DOI: 10.1016/0378-1135(94)90122-8

Bøtner A, Strandbygaard B, Sørensen KJ, et al. Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet Rec* 1997; 141(19): 497–9. DOI: 10.1136/vr.141.19.497

Brisson-Noel A, Nguyen S, Aznar C, et al. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* 1991; 338(8763): 364–6. DOI: 10.1016/0140-6736(91)90492-8

Brito B, Dee S, Wayne S, Alvarez J, Perez A. Genetic diversity of PRRS virus collected from air samples in four different regions of concentrated swine production during a high incidence season. *Viruses* 2014; 6(11): 4424–36. DOI: 10.3390/v6114424.

Brockmeier SL, Halbur PG, Thacker EL. Porcine respiratory disease complex. In: Brogden KA, Guthmiller JM, eds. *Polymicrobial diseases*. Washington : ASM Press, 2002: 231–58.

Brockmeier SL, Loving CL, Palmer MV, et al. Comparison of Asian porcine high fever disease isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to United States isolates for their ability to cause disease and secondary bacterial infection in swine. *Vet Microbiol* 2017; 203: 6–17. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.02.003

Brockmeier SL, Palmer MV, Bolin SR. Effects of intranasal inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Bordetella bronchiseptica*, or a combination of both organisms in pigs. *Am J Vet Res* 2000; 61(8): 892–9. DOI: 10.2460/ajvr.2000.61.892

Brookes VJ, Hernández-Jover M, Holyoake P, Ward MP. Industry opinion on the likely routes of introduction of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome into Australia from south-east Asia. *Aust Vet J* 2015; 93(1/2): 13–9. DOI: 10.1111/avj.12284

Brown E, Lawson S, Welbon C, et al. Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV types I and II. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16(5): 628–35. DOI: 10.1128/CVI.00483-08

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 Practitioner: proceedings. Orlando : AASV, 2007: 65–8.

Buck GE, O'Hara LC, Summersgill JT. Rapid, simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for polymerase chain reaction. *J Clin Microb* 1992; 30(5): 1331–4. DOI: 10.1128/jcm.30.5.1331-1334.1992

Butler JE, Lager KM, Golde W, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic. *Immunol Res* 2014; 59(1/3): 81–108.

Calzada-Nova G, Husmann RJ, Schnitzlein WM, Zuckermann FA. Effect of the host cell line on the vaccine efficacy of an attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 148(1/2): 116–25. DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.05.008

Canadian Swine Health Board. National swine farm-level biosecurity standard. Ontario, 2010: 10–1.

Cancel-Tirado SM, Evans RB, Yoon KJ. Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102(3): 249–62.

Canelli E, Catella A, Borghetti P, et al. Phenotypic characterization of a highly pathogenic Italian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) type 1 subtype 1 isolate in experimentally infected pigs. *Vet Microbiol* 2017; 210: 124–33. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.09.002

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. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.03.031

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. DOI: 10.2460/ajvr.68.5.565

Cao J, Li B, Fang L, Chen H, Xiao S. Pathogenesis of nonsuppurative encephalitis caused by highly pathogenic Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest* 2012; 24(4): 767–71. DOI: 10.1177/1040638712445764

Carlsson U, Wallgren P, Renström LH, et al. Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome in Sweden: detection, response and eradication. *Transbound Emerg Dis* 2009; 56(4): 121–31. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2008.01065.x

Carman S, Sanford SE, Dea S. Assessment of seropositivity to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine herds in Ontario: 1978 to 1982. *Can Vet J* 1995; 36(12): 776–7.

Cavanagh D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 1997; 142(3): 629–33.

Charentantanakul W. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine: immunogenicity, efficacy and safety aspects. *World J Virol* 2012; 1(1): 23–30. DOI: 10.5501/wjv.v1.i1.23

Chang HW, Jeng CR, Liu JJ, et al. Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha. *Vet Microbiol* 2005; 108(3/4): 167–77. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.03.010

Chen X, Ma R, Yang Y, Jiao N, Zhang R. Viral regulation on bacterial community impacted by lysis-lysogeny switch: a microcosm experiment in eutrophic coastal waters. *Front Microbiol* 2019: 1763. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01763

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. DOI: 10.1177/104063871102300208

Chen J, Wang H, Bai J, et al. Generation of pigs resistant to highly pathogenic-porcine reproductive and respiratory syndrome virus through gene editing of CD163. *Int J Biol Sci* 2019; 15(2): 481–92. DOI: 10.7150/ijbs.25862.

Chen H, Wurm T, Britton P, Brooks G, Hiscox JA. Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell. *J Virol* 2002; 76(10): 5233–50. DOI: 10.1128/JVI.76.10.5233-5250.2002

Chen N, Ye M, Huang Y, et al. Identification of two porcine reproductive and respiratory syndrome virus variants sharing high genomic homology but with distinct virulence. *Viruses* 2019; 11(9): 875. DOI: 10.3390/v11090875

Chen HT, Zhang J, Sun DH, et al. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol Methods* 2008; 53(2): 266–8. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.07.006

Cheon DS, Chae C, Lee YS. Detection of nucleic acids of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of naturally infected piglets as determined by in situ hybridization. *J Comp Pathol* 1997; 117: 157–63. DOI: 10.1016/S0021-9975(97)80032-1

Cho JG, Dee SA, Deen J, et al. Evaluation of the effects of animal age, concurrent bacterial infection, and pathogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on virus concentration in pigs. *Am J Vet Res* 2006; 67(3): 489–93. DOI: 10.2460/ajvr.67.3.489

Cho JG, Deen J, Dee SA. Influence of isolate pathogenicity on the aerosol transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res* 2007; 71: 23–7.

Choi C, Chae C. Expression of tumour necrosis factor- α is associated with apoptosis in lungs of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Res Vet Sci* 2002; 72(1): 45–9. DOI: 10.1053/rvsc.2001.0519

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 fetuses. *Can J Vet Res* 1993; 57: 262–8.

Christopher-Hennings J. The pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) in the boar. *Vet Res* 2000; 31: 57–8. DOI: 10.1051/vetres:2000012

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. DOI: 10.1177/104063870101300207

Christopher-Hennings J, Nelson EA, Althouse GC, Lunney J. Comparative antiviral and proviral factors in semen and vaccines for preventing viral dissemination from the male reproductive tract and semen. *Anim Health Res Rev* 2008; 9: 59–69. DOI: 10.1017/S1466252307001387

Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, et al. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest* 1995; 7(4): 456–64. DOI: 10.1177/104063879500700406

Christopher-Hennings J, Nelson EA, Nelson JK, Benfield DA. Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. *Am J Vet Res* 1997; 58(1): 40–5.

Chung WB, Chan WH, Chaung HC, Lien Y, Wu CC, Huang YL. Real-time PCR for quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus

type 2 in naturally-infected and challenged pigs. *J Virol Methods* 2005; 124(1/2): 11–9. DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.10.003

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.

Clark G, Stockinger H, Balderas R, et al. Nomenclature of CD molecules from the Tenth Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshop. *Clin Transl Immunol* 2016; 5(1): e57. DOI: 10.1038/cti.2015.38

Collins J, Dee S, Halbur P, et al. Laboratory diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J Swine Health Prod* 1996; 4(1): 33–5.

Corbellini LG, Schwermer H, Presi P, Thür B, Stärk KD, Reist M. Analysis of national serological surveys for the documentation of freedom from porcine reproductive and respiratory syndrome in Switzerland. *Vet Microbiol* 2006; 118(3/4): 267–73. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.07.018

Corzo CA, Mondaca E, Wayne S, et al. Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 2010; 154(1/2): 185–92. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.08.016

Costers S, Lefebvre DJ, Delputte PL, Nauwynck HJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages. *Arch Virol* 2008; 153(8): 1453–65. DOI: 10.1007/s00705-008-0135-5

Croft E, Blackwell T, Zimmerman J. Field application of a commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) oral fluid antibody enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Can Vet J* 2020; 61(4): 420–3.

Cutler TD, Kittawornrat A, Hoff SJ, Wang C, Zimmerman JJ. Infectious dose (ID₅₀) of PRRSV isolate MN-184 for young pigs via aerosol exposure. In: *Proceedings of the Conference of Research Workers in Animal Diseases*. Chicago, Illinois, 2009: 140, Abstract 139.

Cutler TD, Wang C, Hoff SJ, Kittawornrat A, Zimmerman JJ. Median infectious dose (ID₅₀) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate MN-184 via aerosol exposure. *Vet Microbiol* 2011; 151(3/4): 229–37. DOI:10.1016/j.vetmic.2011.03.003

Das PB, Dinh PX, Ansari IH, de Lima M, Osorio FA, Pattnaik AK. The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163. *J Virol* 2010; 84: 1731–40. DOI: 10.1128/JVI.01774-09

De Abin MF, Spronk G, Wagner M, Fitzsimmons M, Abrahante JE, Murtaugh MP. Comparative infection efficiency of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field

isolates on MA104 cells and porcine alveolar macrophages. *Can J Vet Res* 2009; 73(3): 200–4.

de Jong MP, Cromwijk W, Van't Veld P. The new pig disease: epidemiology and losses in the Netherlands. In: Report of the First EC Seminar on the "new" pig disease: Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Brussels : European Commission, 1991: 9–19.

de Paz X, Vega D, Duran CO, Angulo. PRRS prevalence in Europe: perception of the pig veterinary practitioners. In: 7th European Symposium of Porcine Health Management. Nantes, 2015: 45.

Decorte I, Van Campe W, Mostin L, Cay AB, De Regge N. Diagnosis of the Lelystad strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in individually housed pigs: comparison between serum and oral fluid samples for viral nucleic acid and antibody detection. *J Vet Diagn Invest* 2015; 27(1): 47–54. DOI: 10.1177/1040638714561252

Dee SA. Gilt development and PRRS: a model program for the U.S. swine industry. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1997; 19(9): S228–32, S237.

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. A protocol to define breeding herd stability and classify farms according to PRRS status to identify potential intervention strategies: a summary of 200 farms. In: 29th Annual meeting of the American Association of Swine Practitioners: proceedings. Des Moines, Iowa, 1998: 409–11.

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.

Dee SA, Deen J, Rossow KD, et al. 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, 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. DOI: 10.1136/vr.156.16.501

Dee SA, Deen J, Otake S, Pijoan C. An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs. *Can J Vet Res* 2004; 68: 128–33.

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. DOI: 10.1136/vr.135.1.6

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

Dee SA, Joo HS, Polson DD, et al. Evaluation of the effects of nursery depopulation on the persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and the productivity of 34 farms. *Vet Rec* 1997;140(10): 247–8. DOI: 10.1136/vr.140.10.247

Dee S, Otake S, Deen J. Use of a production region model to assess the efficacy of various air filtration systems for preventing airborne transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*: results from a 2-year study. *Virus Res* 2010a; 154(1/2): 177–84. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.07.022

Dee SA, Schurrer JA, Moon RD, Fano E, Trincado C, Pijoan C. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under field conditions during a putative increase in the fly population. *J Swine Health Prod* 2004; 12(5): 242–5.

Dee S, Spronk G, Reicks D, Ruen P, Deen J. Further assessment of air filtration for preventing PRRSV infection in large breeding pig herds. *Vet Rec* 2010b; 167(25): 976–7. DOI:10.1136/vr.c6788

Dee SA, Torremorell M, Rossow K, Mahlum C, Otake S, Faaberg K. Identification of genetically diverse sequences (ORF 5) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a swine herd. *Can J Vet Res* 2001; 65(4): 254–60.

DeFazio LG, Stansel RM, Griffith JD, Chu G. Synapsis of DNA ends by DNA dependent protein kinase. *EMBO J* 2002; 21: 3192–200.

Desrosiers R. Epidemiology, diagnosis and control of swine diseases. In: *Proceedings of the 35th Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioner*. Des Moines, 2004: 1–30.

Desrosiers R . Indirect transmission of the PRRS virus (Part 3). *Int Piglett* 2007; 27: 1–2.

Desrosiers R. Transmission of swine pathogens: different means, different needs. *Anim Health Res Rev* 2011; 12(1): 1–13. DOI: 10.1017/S1466252310000204

Delrue I, Van Gorp H, Van Doorselaere J, Delputte PL, Nauwynck HJ. Susceptible cell lines for the production of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by stable

transfection of sialoadhesin and CD163. *BMC biotechnology* 2010; 10(1): 48. DOI: 10.1186/1472-6750-10-48

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 virus infection. *J Vet Diagn Invest* 2012; 24(2): 344–8. DOI: 10.1177/1040638711435804

Didierlaurent A, Goulding J, Hussell T. The impact of successive infections on the lung microenvironment. *Immunology* 2007; 122(4): 457–65. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02729.x

Dokland T. The structural biology of PRRSV. *Virus Res* 2010; 154(1/2): 86–97. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.07.029

Donadeu M, Arias M, Agüero M, Romero LJ, Christianson WT. Using polymerase chain reaction to obtain PRRSV-free piglets from endemically infected herds. *J Swine Health Prod* 1999; 7(6): 255–61.

Drew TW. A review of evidence for immunosuppression due to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Res* 2000; 31: 27–39. DOI: 10.1051/vetres:2000055

Dreyer WJ, Bennett JC. The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1965; 54: 864–9.

Drigo M, Giacomini E, Lazzaro M, et al. Comparative evaluation of immune responses of swine in PRRS-stable and unstable herds. *Vet Immunol Immunopathol* 2018; 200: 32–9. DOI: 10.1016/j.vetimm.2018.04.007

Du T, Nan Y, Xiao S, Zhao Q, Zhou EM. Antiviral strategies against PRRSV infection. *Trends Microbiol* 2017; 25(12): 968–79. DOI: 10.1016/j.tim.2017.06.001

Duan X, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch Virol* 1997; 142: 2483–97. DOI: 10.1007/s007050050256

Dwivedi V, Manickam C, Binjawadagi B, Linhares D, Murtaugh MP, Renukaradhya GJ. Evaluation of immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs during early stage of infection under farm conditions. *Viol J* 2012; 9(1): e45. DOI: 10.1186/1743-422X-9-45

Dwivedi V, Manickam C, Patterson R, Dodson K, Weeman M, Renukaradhya GJ. Intranasal delivery of whole cell lysate of *Mycobacterium tuberculosis* induces protective immune responses to a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine in pigs. *Vaccine* 2011; 29(23): 4067–76. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.03.005

Eisenach KD, Sifford MD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1160–3. DOI: 10.1164/ajrccm/144.5.1160

Epperson B, Holler L. An abortion storm and sow mortality syndrome. In: Proceedings of the 28th Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners. Quebec, Canada, 1997: 479–84.

Fablet C, Renson P, Eono F, et al. Maternally-derived antibodies (MDAs) impair piglets' humoral and cellular immune responses to vaccination against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Vet Microbiol* 2016; 192: 175–80. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.07.014

Fablet C, Renson P, Pol F, et al. Oral fluid versus blood sampling in group-housed sows and finishing pigs: feasibility and performance of antibody detection for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol* 2017; 204: 25–34. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.04.001

Fahle GA, Fischer SH. Comparison of six commercial DNA extraction kits for recovery of cytomegalovirus DNA from spiked human specimens. *J Clin Microbiol* 2000; 38(10): 3860–3. DOI: 10.1128/JCM.38.10.3860-3863.2000

Fangman TJ, Kleiboeker SB, Coleman M. Tonsillar crypt exudate to evaluate shedding and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus after inoculation with live field virus or vaccination with modified live virus vaccine. *J Swine Health Prod* 2007; 15(4): 219–23.

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

Fano E, Pijoan C, Dee S. Evaluation of the aerosol transmission of a mixed infection of *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Rec* 2005b; 157: 105–8. DOI: 10.1136/vr.157.4.105

Feitsma H, Grooten HJ, Schie FW, Colenbrander B. The effect of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) on sperm production. In: Proceedings of the 12th International Congress of Animal Reproduction. The Hague, The Netherlands : ICAR, 1992: 1710–2.

Felin E, Näreaho A, Fredriksson-Ahomaa M. Comparison of commercial ELISA tests for the detection of *Toxoplasma* antibodies in the meat juice of naturally infected pigs. *Vet Parasitol* 2017; 238: 30–4. DOI: 10.1016/j.vetpar.2017.03.012

Ferlazzo G, Ruggeri J, Boniotti MB, et al. In vitro cytokine responses to virulent PRRS virus strains. *Front Vet Sci* 2020; 7: e335. DOI: 10.3389/fvets.2020.00335

França LT, Carrilho E, Kist TB. A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys* 2002; 35(2): 169–200. DOI: 10.1017/S0033583502003797

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

Frohm Nilsson M, Sandstedt B, Sørensen O, Weber G, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect Immun* 1999; 67(5): 2561–6.

Frössling J, Ågren EC, Eliasson-Selling L, Lewerin SS. Probability of freedom from disease after the first detection and eradication of PRRS in Sweden: scenario-tree modelling of the surveillance system. *Prev Vet Med* 2009; 91(2/4): 137–45. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2009.05.012

Frydas IS, Nauwynck HJ. Replication characteristics of eight virulent and two attenuated genotype 1 and 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strains in nasal mucosa explants. *Vet Microbiol* 2016; 182: 156–62. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.11.016

Frydas IS, Trus I, Kvisgaard LK, et al. Different clinical, virological, serological and tissue tropism outcomes of two new and one old Belgian type 1 subtype 1 porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) isolates. *Vet Res* 2015; 46(1): e37. DOI: 10.1186/s13567-015-0166-3

Gagnon CA, Lachapelle G, Langelier Y, Massie B, Dea S. Adenoviral-expressed GP 5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. *Arch Virol* 2003; 148(5): 951–72. DOI: 10.1007/s00705-002-0943-y

Gantier MP, Williams BR. The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18(5/6): 363–71. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2007.06.016

Garcia-Morante B, Friedrich R, Kaiser T, Kraft C, Bridger P, Noguera M. Gilt vaccination with a mixed administration of a PRRS MLV and a PPV1 subunit vaccine protects against heterologous PRRSV1 infection and prevents detrimental effects on piglet performance. *Viruses* 2020; 12(8): 789. DOI: 10.3390/v12080789

García-Nicolás O, Baumann A, Vielle NJ, et al. Virulence and genotype-associated infectivity of interferon-treated macrophages by porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Virus Res* 2014; 179: 204–11. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.08.009

Gerber PF, Giménez-Lirola LG, Halbur PG, Zhou L, Meng XJ, Opriessnig T. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and fluorescent microbead immunoassays for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boars. *Journal of virological methods* 2014; 197: 63–6. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.12.001

Gerber PF, O'Neill K, Owolodun O, et al. Comparison of commercial real-time reverse transcription-PCR assays for reliable, early, and rapid detection of heterologous strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected or noninfected boars by use of different sample types. *J Clin Microbiol* 2013; 51(2): 547–56. DOI: 10.1128/JCM.02685-12

Gerner W, Käser T, Saalmüller A. Porcine T lymphocytes and NK cells: an update. *Dev Comp Immunol* 2009; 33(3): 310–20. DOI: 10.1016/j.dci.2008.06.003

Gibert E, Martín-Valls G, Mateu E. Comparison of protocols for the analysis of type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR using oral fluids. *J Virol Methods* 2017; 243: 190–5. DOI: 10.1016/j.jviromet.2017.02.010

Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, et al. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyribonucleosinic: polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2006; 103(22): 8459–64. DOI: 10.1073/pnas.0603082103

Goldberg TL, Lowe JF, Milburn SM, Firkins LD. Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection. *Virology* 2003; 317(2): 197–207. DOI: 10.1016/j.virol.2003.07.009

Gómez-Laguna J, Salguero FJ, De Marco MF, Pallares FJ, Bernabe A, Carrasco L. Changes in lymphocyte subsets and cytokines during European porcine reproductive and respiratory syndrome: increased expression of IL-12 and IL-10 and proliferation of CD4⁺ CD8^{high}. *Viral Immunol* 2009; 22(4): 261–71. DOI: 10.1089/vim.2009.0003

Gómez-Laguna J, Salguero FJ, Fernández de Marco M, et al. Type 2 Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection mediated apoptosis in B-and T-cell areas in lymphoid organs of experimentally infected pigs. *Transbound Emerg Dis* 2013; 60(3): 273–8. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2012.01338.x

Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, Snijder EJ. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res* 2006; 117: 17–37. DOI: 10.1016/j.virusres.2006.01.017

Griffin HG, Griffin AM. DNA sequencing. *Appl Biochem Biotechnol* 1993; 38(1): 147–59. DOI: 10.1007/BF02916418

Grøntvedt CA, Sjurseth SK, Er C. The surveillance programme for specific viral infections in swine herds in Norway 2015. In: Surveillance programmes for terrestrial and aquatic animals in Norway 2016. Annual report 2015. Oslo : Norwegian Veterinary Institute, 2016.

Grosse-Beilage E, Grosse-Beilage T. Epidemiological investigations into PEARS in Germany: influence on reproduction. In: Proceedings of the 12th International Pig Veterinary Society Congress. The Hague, 1992: 125.

Guo B, Lager KM, Henningson JN, et al. Experimental infection of United States swine with a Chinese highly pathogenic strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 2013; 435(2): 372–84. DOI: 10.1016/j.virol.2012.09.013

Halbur PG, Bush E. Update on abortion storms and sow mortality. *J Swine Health Prod* 1997; 5(2): 73.

Halbur PG, Miller LD, Paul PS, Meng XJ, Huffman EL, Andrews JJ. Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum deprived pigs. *Vet Pathol* 1995; 32: 200–4. DOI: 10.1177/030098589503200218

Halbur PG, Paul PS, Frey ML, et al. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet Pathol* 1995; 32(6): 648–60. DOI: 10.1177/030098589503200606

Halbur PG, Paul PS, Meng XJ, Lum MA, Andrews JJ, Rathje JA. Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8: 11–20. DOI: 10.1177/104063879600800103

Han J, Wang Y, Faaberg KS. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 2006; 122(1/2): 175–82. DOI: 10.1016/j.virusres.2006.06.003

Han J, Zhou L, Ge X, Guo X, Yang H. Pathogenesis and control of the Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 2017; 209: 30–47. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.02.020

Harding JCS, Ladinig A, Novakovic P, et al. Novel insights into host responses and reproductive pathophysiology of porcine reproductive and respiratory syndrome caused by PRRSV-2. *Vet Microbiol* 2017; 209: 114–23. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.02.019.

Harding JD, Keller RA. Single-molecule detection as an approach to rapid DNA sequencing. *Trends Biotechnol* 1992; 10: 55–7. DOI: 10.1016/0167-7799(92)90170-Z

He Y, Wang G, Liu Y, et al. Characterization of thymus atrophy in piglets infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 2012; 160(3/4): 455–62. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.05.040

Henao-Diaz A, Zhang M, Giménez-Lirola L, et al. Adapting a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) oral fluid antibody ELISA to routine surveillance. *Prev Vet Med* 2020; 188: e105250. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2020.105250.

Hermann JR, Muñoz-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(1/2): 7–16. DOI:10.1016/j.vetmic.2005.06.012

Hill H. Overview and history of mystery swine disease (swine infertility/respiratory syndrome). In: *Proceedings of mystery swine disease committee meeting*. Madison : Livestock Conservation Institute, 1990: 29–31.

Holtkamp DJ, Yeske PE, Polson DD, Melody JL, Philips RC. A prospective study evaluating duration of swine breeding herd PRRS virus-free status and its relationship with measured risk. *Prev Vet Med* 2010; 96(3/4): 186–93. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2010.06.016

Holtkamp DJ, Polson DD, Torremorell M, et al. Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status. *J Swine Heal Prod* 2011; 19(1): 44–56.

Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Zimmerman JJ, et al. Economic analysis of PRRS virus elimination from a herd. *Iowa State Univ Anim Ind Rep* 2012; 9(1): e[1–7]. DOI: 10.31274/ans_air-180814-74

Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Heal Prod* 2013; 21: 72–84. DOI: 10.31274/ans_air-180814-28

Hooper CC, Van Alstine WG, Stevenson GW, Kanitz CL. Mice and rats (laboratory and feral) are not a reservoir for PRRS virus. *J Vet Diagn Invest* 1994; 6(1): 13–5. DOI: 10.1177/104063879400600103

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. DOI: 10.1136/vr.131.7.140

Horter DC, Pogranichniy RM, Chang CC, Evans RB, Yoon KJ, Zimmerman JJ. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Microbiol* 2002; 86(3): 213–28. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00013-5

Houben S, Van Reeth K, Pensaert MB. Pattern of infection with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus on swine farms in Belgium. *Zentralbl Veterinarmed B* 1995; 42(4): 209–15. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1995.tb00704.x

Hozumi N, Tonegawa S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976; 73(10): 3628–32.

Hu SP, Zhang Z, Liu YG, et al. Pathogenicity and distribution of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *Transbound Emerg Dis* 2013; 60(4): 351–9. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2012.01354.x

ICTV. Master Species List 2019.v1. <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl> (dostop 13. 3. 2022)

Innis MA, Gelfand DH. Optimization of PCRs. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego : Academic Press, 2012: 3–12.

Islam ZU, Bishop SC, Savill NJ, et al. Quantitative analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viremia profiles from experimental infection: a statistical modelling approach. *PloS One* 2013; 8(12): e83567. DOI: 10.1371/journal.pone.0083567

Jacobs AC, Hermann JR, Muñoz-Zanzi C, et al. Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus at ambient temperatures. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22(2): 257–60. DOI: 10.1177/104063871002200216

Johnson W, Roof M, Vaughn E, Christopher-Hennings J, Johnson CR, Murtaugh MP. Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102(3): 233–47. DOI: 10.1016/j.vetimm.2004.09.010

Jusa ER, Inaba Y, Kouno M, et al. Slow-reacting and complement-requiring neutralizing antibody in swine infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Med Sci* 1996; 58(8): 749–53. DOI: 10.1292/jvms.58.749

Kapur V, Elam MR, Pawlovich TM, Murtaugh MP. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. *J Gen Virol* 1996; 77(6): 1271–6. DOI: 10.1099/0022-1317-77-6-1271

Karniychuk UU, De Spiegelaere W, Nauwynck HJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection is associated with an increased number of Sn-positive and CD8-positive cells in the maternal-fetal interface. *Virus Res* 2013; 176: 285–91. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.05.005

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: e30. DOI: 10.1186/1746-6148-6-30

Kedkovid R, Sirisereewan C, Thanawongnuwech R. Major swine viral diseases: an Asian perspective after the African swine fever introduction. *Porcine Health Manag* 2020; 6: e20. DOI: 10.1186/s40813-020-00159-x

Keffaber KK. Reproductive failure of unknown etiology. *Am Assoc Swine Pract Newsl* 1989; 1: 1–9.

Keffaber KK, Stevenson G, Van Alstine W, et al. SIRS virus infection in nursery/grower pigs. *Am Assoc Swine Pract Newsl* 1992; 4(4): 38–40.

Kim TS, Benfield DA, Rowland RR. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced cell death exhibits features consistent with a nontypical form of apoptosis. *Virus Res* 2002; 85(2): 133–40. DOI: 10.1016/S0168-1702(02)00029-1

Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS, Frey ML. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol* 1993; 133(3/4): 477–83. DOI: 10.1007/BF01313785

Kimman TG, Cornelissen LA, Moormann RJ, Rebel JMJ, Stockhofe-Zurwieden N. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine* 2009; 27: 3704–18. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.04.022

King AM, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam : Elsevier, 2012: 798.

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. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.07.025

Kittawornrat A, Panyasing Y, Goodell C, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) surveillance using pre-weaning oral fluid samples detects circulation of wild-type PRRSV. *Vet Microbiol* 2014; 168(2): 331–9. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.11.035

Kittawornrat A, Prickett J, Wang C, et al. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diagn Invest* 2012a; 24(2): 262–9. DOI: 10.1177/1040638711435679

Kittawornrat A, Wang C, Anderson G, et al. Ring test evaluation of the repeatability and reproducibility of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus oral fluid antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diagn Invest* 2012b; 24(6): 1057–63. DOI: 10.1177/1040638712457929

Kleiboeker SB, Schommer SK, Lee SM, Watkins S, Chittick W, Polson D. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17(2): 165–70. DOI: 10.1177/104063870501700211

Klinge KL, Vaughn EM, Roof MB, Bautista EM, Murtaugh MP. Age-dependent resistance to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. *Virology* 2009; 6(1): e177. DOI: 10.1186/1743-422X-6-177

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256(5517): 495–7. DOI: 10.1038/256495a0

Kono Y, Kanno T, Shimizu M, et al. Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs. *J Vet Med Sci* 1996; 58(10): 941–6. DOI: 10.1292/jvms.58.10_941

Koltes JE, Fritz-Waters E, Eisley CJ, et al. Identification of a putative quantitative trait nucleotide in guanylate binding protein 5 for host response to PRRS virus infection. *BMC genomics* 2015; 16(1): e412. DOI: 10.1186/s12864-015-1635-9

Koyama S, Ishii KJ, Coban C, Akira S. Innate immune response to viral infection. *Cytokine* 2008; 43(3): 336–41. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.07.009

Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem cells* 2001; 19(5): 378–87. DOI: 10.1634/stemcells.19-5-378

Kroll J, Piontkowski M, Kraft C, Coll T, Gomez-Duran O. Initial vaccination and revaccination with type I PRRS 94881 MLV reduces viral load and infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Porcine Health Manag* 2018; 4(1): 23. DOI: 10.1186/s40813-018-0096-3

Kuby J. *Immunology*. New York : WH Freeman, 1997: 664.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016; 33: 1870–4. DOI: 10.1093/molbev/msw054

Kundi M. One-hit models for virus inactivation studies. *Antiviral Res* 1999; 41, 145–52. DOI: 10.1016/S0166-3542(99)00008-X

Kwok SH, Mack DH, Mullis KB, et al. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *J Virol* 1987; 61(5): 1690–4. DOI: 10.1128/jvi.61.5.1690-1694.1987

Labarque G, Van Gucht S, Nauwynck H, Van Reeth K, Pensaert M. Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines. *Vet Res* 2003; 34(3): 249–60. DOI: 10.1051/vetres:2003001

Ladinig A, Detmer SE, Clarke K, et al. Pathogenicity of three type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains in experimentally inoculated pregnant gilts. *Virus Res* 2015; 203: 24–35. DOI: 10.1016/j.virusres.2015.03.005

Ladinig A, Wilkinson J, Ashley C, et al. Variation in fetal outcome, viral load and ORF5 sequence mutations in a large scale study of phenotypic responses to late gestation exposure to type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS One* 2014; 9(4): e96104. DOI: 10.1371/journal.pone.0096104

Langenhorst RJ, Lawson S, Kittawornrat A, et al. Development of a fluorescent microsphere immunoassay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using oral fluid samples as an alternative to serum-based assays. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19(2): 180–9. DOI: 10.1128/CVI.05372-11

Lager KM, Halbur PG. Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8(3): 275–82. DOI: 10.1177/104063879600800301

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. DOI: 10.1016/S0378-1135(97)00159-4

Lalonde C, Provost C, Gagnon CA. Whole-genome sequencing of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus from field clinical samples improves the genomic surveillance of the virus. *J Clin Microbiol* 2020; 58(11): e00097–20. DOI: 10.1128/JCM.00097-20.

Larochelle R, D'Allaire S, Magar R. Molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Québec. *Virus Res* 2003; 96: 3–14. DOI: 10.1016/S0168-1702(03)00168-0

Larochelle R, Mardassi H, Dea S, Magar R. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8(1): 3–10. DOI: 10.1177/104063879600800102

Lauring AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog* 2020; 6: e1001005. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001005

Le Potier MF, Blanquefort P, Morvan E, Albina E. Results of a control programme for the porcine reproductive and respiratory syndrome in the French 'Pays de la Loire' region. *Vet Microbiol* 1997; 55(1/4): 355–60. DOI: 10.1016/S0378-1135(96)01318-1

Lebech AM, Hansen KL. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late Lyme neuroborreliosis by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30(7): 1646–53. DOI: 10.1128/jcm.30.7.1646-1653.1992

Lebret A, Boulbria G, Berton P, et al. Monitoring PRRSV-1 in suckling piglets in an endemic herd using reverse transcriptase quantitative real time polymerase chain reaction: comparison

of the rate of detection in serum and oral fluid samples and evaluation of pooling. *Porcine Health Manag* 2019; 5(1): e8. DOI: 10.1186/s40813-019-0115-z

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. DOI: 10.1007/s11262-009-0433-3

Lee CK, Rao DT, Gertner R, Gimeno R, Frey AB, Levy DE. Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function. *J Immunol* 2000; 165(7): 3571–7. DOI: 10.4049/jimmunol.165.7.3571

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, 2011: 12–3.

Li X, Galliher-Beckley A, Wang L, Nietfeld J, Feng W, Shi J. Comparison of immune responses in pigs infected with Chinese highly pathogenic PRRS virus strain HV and North American strain NADC-20. *Open Virol J* 2017a; 11: e73–82. DOI: 10.2174/1874357901711010073

Li Y, Wang X, Bo K, et al. Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China. *Vet J* 2007; 174(3): 577–84. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.07.032

Li Y, Wang G, Liu Y, et al. Identification of apoptotic cells in the thymus of piglets infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 2014b; 189: 29–33. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.04.011

Li J, Wang S, Li C, Wang C, et al. Secondary *Haemophilus parasuis* infection enhances highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) infection-mediated inflammatory responses. *Vet Microbiol* 2017b; 204: 35–42. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.03.035

Li L, Zhao Q, Ge X, et al. Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus exhibits more extensive tissue tropism for pigs. *Virol J* 2012; 9(1): 203. DOI: 10.1186/1743-422X-9-203

Linhares DC, Cano JP, Wetzell T, Nerem J, Torremorell M, Dee SA. Effect of modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) vaccine on the shedding of wild-type virus from an infected population of growing pigs. *Vaccine* 2012a; 30(2): 407–13. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.10.075

Linhares DC, Torremorell M, Joo HS, Morrison RB. Infectivity of PRRS virus in pig manure at different temperatures. *Vet Microbiol* 2012; 160(1/2): 23–8. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.05.009

Linhares DC, Cano JP, Torremorell M, Morrison RB. Comparison of time to PRRSv-stability and production losses between two exposure programs to control PRRSv in sow herds. *Prev Vet Med* 2014; 116(1/2): 111–9. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2014.05.010

Linhares DC, Johnson C, Morrison RB. Economic analysis of vaccination strategies for PRRS control. *PloS One* 2015; 10(12): e0144265. DOI: 10.1371/journal.pone.0144265

Lopez WA, Angulo J, Zimmerman JJ, Linhares DC. Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids. *J Swine Health Prod* 2018; 26(3): 146–50.

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(3): 269–75. DOI: 10.1128/CVI.00304-06

Lopez OJ, Osorio FA. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102(3): 155–63. DOI: 10.1016/j.vetimm.2004.09.005

Lopez-Fuertes L, Campos E, Domenech N, Ezquerro A, Castro JM, Domínguez J, Alonso F. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF- α production in infected macrophages. *Virus Res* 2000; 69(1): 41–6. DOI: 10.1016/S0168-1702(00)00172-6

Loula T. Mystery pig disease. *Agri-practice* 1991; 12(1): 23–34.

Loving CL, Osorio FA, Murtaugh MP, Zuckermann FA. Innate and adaptive immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2015; 167(1/2): 1–4. DOI: 10.1016/j.vetimm.2015.07.003

Lunney JK, Benfield DA, Rowland RR. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Res* 2010; 154(1/2): 1–6. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.10.009

Lunney JK, Chen H. Genetic control of host resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Virus Res* 2010; 154(1/2): 161–9. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.08.004

Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: pathogenesis and interaction with immune system. *Annu Rev Anim Biosci* 2016; 4: 129–54. DOI: 10.1146/annurev-animal-022114-111025

Lunney JK, Steibel JP, Reecy J, et al. Probing genetic control of swine responses to PRRSV infection: current progress of the PRRS host genetics consortium. *BMC Proc* 2011; 5(Suppl. 4): eS30.

MacLachlan NJ, Dubovi EJ. Fenner's veterinary virology. 5th ed. London : Elsevier, 2017: 463–76.

Magar R, Laroche 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(4): 259–66.

Magar R, Laroche R, Robinson Y, Dubuc C. Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloidal gold. *Can J Vet Res* 1993; 57: 300–4.

Malgarin CM, Nosach R, Novakovic P, et al. Classification of fetal resilience to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) based on temporal viral load in late gestation maternal tissues and fetuses. *Virus Res* 2019; 260: 151–62. DOI: 10.1016/j.virusres.2018.12.002

Mardassi H, Massie B, Dea S. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 1996; 221(1): 98–112. DOI: 10.1006/viro.1996.0356

Martelli P. What do we know after 30 years living with PRRS? In: *Leipziger Blaue Hefte*: 9. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 3. Leipzig, 2017: 68–72.

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. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.12.050

Martelli P, Cordioli P, Fallacara F, Terreni M, Cavirani S. Genetic diversity (ORF5) of PRRSV isolates from a herd with sams. In: *Proceedings of the 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*. Rome, Italy, 2003: 56–7.

Martín-Valls GE, Hidalgo M, Cano E, Mateu E. Testing of umbilical cords by real time PCR is suitable for assessing vertical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under field conditions. *Vet J* 2018; 234: 27–9. DOI: 10.1016/j.tvjl.2018.01.008

Mateu E, Diaz I. The challenge of PRRS immunity. *Vet J* 2008; 177: 345–51. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.05.022

Max EE, Fugmann S. Immunoglobulins: Molecular Genetics. In: Paul WE, ed. *Fundamental immunology*. 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012: 151–83.

McCaw MB. McRebel PRRS: management procedures for PRRS control in large herd numbers. In: *Allen D Lemman Swine Conference: proceedings*. St. Paul : University of Minnesota, 1995, Volume 22: 161–2.

McCaw MB. 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 MB. Effect of reducing crossfostering at birth on piglet mortality and performance during an acute outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Swine Health and Prod* 2000; 8(1): 15–21.

McHeyzer-Williams M. B-Lymphocyte Responses. In: Paul WE, ed. *Fundamental immunology*. 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012: 261–79.

McNeely TB, Dealy M, Dripps DJ, Orenstein JM, Eisenberg SP, Wahl SM. Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *J Clin Investig* 1995; 96(1): 456–64.

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. DOI: 10.1016/S0042-6822(03)00009-6

Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of " atypical" PRRS. *Am J Vet Res* 1998; 59(12): 1540–4.

Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC, Clouser DF. Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Microbiol* 2003; 93(1): 25–38. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00426-1

Meredith MJ. Names for the disease. In: *Porcine reproductive and respiratory syndrome*. 7th ed. Cambridge : Pig Disease Information Centre, University of Cambridge, 1993: 4–9.

Meuer SC, Fitzgerald KA, Hussey RE, Hodgdon JC, Schlossman SF, Reinherz EL. Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. Relationship to the T3 molecular complex. *J Exp Med* 1983; 157: 705–19.

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(1): 62–72. DOI: 10.1006/viro.1993.1008

Miller LC, Fox JM. Apoptosis and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102(3): 131–42. DOI: 10.1016/j.vetimm.2004.09.004

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* 2008; 20(6): 735–43. DOI: 10.1177/104063870802000604

Molina-Barrios R, Luevano-Adame J, Henao-Díaz YA, et al. Collared peccary (Pecari tajacu) are susceptible to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Transbound Emerg Dis* 2018; 65(6): 1712–9. DOI: 10.1111/tbed.12944

Møller HJ, Aerts H, Grønbæk H, et al. Soluble CD163: a marker molecule for monocyte/macrophage activity in disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 62(7): 29–3. DOI: 10.1080/003655102762377466

More S, Bøtner A, Butterworth A, et al. Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *EFSA Journal* 2017; 15(7): 4949. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4949

Moore C. Clinical presentation of mystery swine disease in growing pig. *Proc Mystery Swine Dis Comm Meet Livest Conserv Inst Denver, CO* 1990: 173–5.

Morgan SB, Frossard JP, Pallares F, et al. Pathology and virus distribution in the lung and lymphoid tissues of pigs experimentally inoculated with three distinct Type 1 PRRS virus isolates of varying pathogenicity. *Transbound Emerg Dis* 2014; 63: 285–95. DOI: 10.1111/tbed.12272

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, Madsen KS. The occurrence of PRRS in Denmark. *Am Assoc Swine Pract Newsl* 1992; 4: 48–52.

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. DOI: 10.1016/S0167-5877(01)00260-4

Mulupuri P, Zimmerman JJ, Hermann J, et al. Antigen-specific B-cell responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Virol* 2008; 82(1): 358–70. DOI: 10.1128/JVI.01023-07

Muneta Y, Yoshikawa T, Minagawa Y, Shibahara T, Maeda R, Omata Y. Salivary IgA as a useful non-invasive marker for restraint stress in pigs. *J Vet Med Sci* 2010; 72(10) 1295–300. DOI: 10.1292/jvms.10-0009

Murtaugh MP, Stadejek T, Abrahante JE, Lam TY, Leung CC. The ever expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 2010; 154: 18–30. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.08.015

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. DOI: 10.1089/088282402320914485

Nathues H, Alarcon P, Rushton J, et al. Cost of porcine reproductive and respiratory syndrome virus at individual farm level: an economic disease model. *Prev Vet Med* 2017; 142: 16–29. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2017.04.006

Nathues C, Perler L, Bruhn S, et al. An outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Switzerland following import of boar semen. *Transbound Emerg Dis* 2016; 63, e251–e61. DOI: 10.1111/tbed.12262

Nathues C, Zimmerli U, Hauser R, Nathues H, Grosse Beilage E, Schüpbach-Regula G. Risk assessment of the introduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus via boar semen into Switzerland as an example of a PRRSV-free country. *Transbound Emerg Dis* 2014; 61(6): 546–54. DOI:10.1111/tbed.12059

Nauwynck HJ, Duan X, Favoreel HW, Van Oostveldt P, Pensaert MB. Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *Journal of General Virology* 1999; 80(2): 297–305. DOI: 10.1099/0022-1317-80-2-297

Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, et al. Coordinated and distinct roles for IFN- $\alpha\beta$, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* 2002; 169(8): 4279–87. DOI: 10.4049/jimmunol.169.8.4279

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. DOI: 10.1016/S0378-1135(96)01334-X

Nieuwenhuis N, Duinhof TF, van Nes A. Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. *Vet Rec* 2012; 170(9): 225. DOI: 10.1136/vr.100101

Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol* 1999; 73: 270–80. DOI: 10.1128/JVI.73.1.270-280.1999

Nokireki T. PRRS-literature review. *Suomen Eläinlääkärilehti* 2010; 116(6): 339–43.

Novakovic P, Harding JC, Al-Dissi AN, Ladinig A, Detmer SE. Pathologic evaluation of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection at the maternal fetal interface of late gestation pregnant gilts. *PLoS One* 2016; 11: e0151198. DOI: 10.1371/journal.pone.0151198

Novakovic P, Harding JC, Al-Dissi AN, Detmer SE. Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection increases apoptosis at the maternal-fetal interface in late gestation pregnant gilts. *PLoS One* 2017; 12(3): e0173360. DOI: 10.1371/journal.pone.0173360

Ochert AS, Boulter AW, Birnbaum W, Johnson NW, Teo CG. Inhibitory effect of salivary fluids on PCR: potency and removal. *PCR methods and applications*. 1994; 3(6): 365–8.

Ohlinger VF, Pesch S, Bischoff C. History, occurrence, dynamics and current status of PRRS in Europe. *Vet Res* 2000; 31(1): 86–7. DOI: 10.1051/vetres:2000037

OIE. Porcine reproductive and respiratory virus. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Paris : World Organisation for Animal Health, 2018: Chapter 3.8.6: 1571–93.

Oleksiewicz MB, Bøtner A, Normann P. Semen from boars infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) contains antibodies against structural as well as nonstructural viral proteins. *Vet Microbiol* 2001; 81(2): 109–25. DOI: 10.1016/S0378-1135(01)00341-8

Olsen C, Karriker L, Wang C, et al. Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *Vet J* 2013a; 198(1): 158–63. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.06.014

Olsen C, Wang C, Christopher-Hennings J, et al. Probability of detecting Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection using pen-based swine oral fluid specimens as a function of within-pen prevalence. *J Vet Diagn Invest* 2013b; 25(3): 328–35. DOI: 10.1177/1040638713481471

Opriessnig T, Halbur PG, Yoon KJ, et al. Comparison of molecular and biological characteristics of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (ingelvac PRRS MLV), the parent strain of the vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and two recent field isolates of PRRSV. *J Virol* 2002; 76(23): 11837–44. DOI: 10.1128/JVI.76.23.11837-11844.2002

Opriessnig T, Pallaré 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(5): 246–53.

Opriessnig 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. *Clin Vaccine Immunol*. 2007; 14(12): 1572–7. DOI: 10.1128/CVI.00332-07

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(9): 4241–50. DOI: 10.1128/JVI.76.9.4241-4250.2002

Otake S, Dee S, 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(3/4): 198–208. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.03.028

Otake S, Dee SA, Jacobson L, Torremorell M, Pijoan C. Evaluation of aerosol transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under controlled field conditions. *Vet Rec* 2002a; 150: 804–8. DOI: 10.1136/vr.150.26.804

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* 2002b; 10(2): 59–65.

Otake S, Dee SA, Rossow KD, et al. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by needles. *Vet Rec* 2002c; 150(4): 114–5.

Otake S, Dee SA, Rossow KD, Moon RD, Pijoan C. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). *Can J Vet Res* 2002d; 66(3): 191.

Otake S, Dee SA, Moon RD, et al. Survival of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies. *Can J Vet Res* 2003; 67(3): 198–203.

Owen WJ, Uhlenhopp EK, Hill HT, Frey ML, Eernisse KA, Zimmerman J. Tracking SIRS in the 1980s: preliminary analysis of the Iowa NAHMS swine serum bank. In: *Proceedings of Annual Meeting of Livestock Conservation Institute*, 1992: 243–4.

Pahl HL, Baeuerle PA. Expression of influenza virus hemagglutinin activates transcription factor NF-kappa B. *J Virol* 1995; 69(3): 1480–4.

Palzer A, Eddicks M, Zoels S, et al. Field evaluation of the efficacy, compatibility and serologic profiling of a combined vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome and *Haemophilus parasuis* in nursery pigs. *Prev Vet Med* 2015; 119(3/4): 134–40. DOI: 10.1128/jvi.69.3.1480-1484.1995

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(3): 320–3.

Paton DJ, Brown IH, Done S, Scott AC, Edwards S. Laboratory investigations of "Blue eared pig disease" in Great Britain. In: *The new pig diseases. Porcine reproductive and respiratory syndrome: a report on the seminar held in Brussels on 4–5 November 1991 and organized by the European Commission*. Brussels : EC, 1991: 36.

Pedersen K, Miller RS, Mustante AR, White TS, Freye II JD, Gidlewski T. Antibody evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus detected in sera collected from feral swine (*Sus scrofa*) across the United States. *J Swine Health Prod* 2018; 26: 41–4.

Phoo-ngurn P, Kiataramkul C, Chamchod F. Modeling the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a swine population: transmission dynamics, immunity information, and optimal control strategies. *Adv Differ Equ* 2019; 2019(1): e432. DOI: 10.1186/s13662-019-2351-6

Pilla DM, Hagar JA, Haldar AK, et al. Guanylate binding proteins promote caspase-11-dependent pyroptosis in response to cytoplasmic LPS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(16): 6046–51. DOI: 10.1073/pnas.1321700111

Pirtle EC, Beran GW. Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the presence of fomites commonly found on farms. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 208(3): 390–2.

Pitkin A, Deen J, Dee S. Further assessment of fomites and personnel as vehicles for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res* 2009; 73(4): 298–302.

Pitkin A, Otake S, Dee S. Biosecurity protocols for the prevention of spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Minneapolis : Swine Disease Eradication Center, University of Minnesota College of Veterinary Medicine, 2011: 1–17 http://www.aasv.org/aasv/VIRUS_PRRS_BiosecurityManual.pdf.

Plana Duran J, Vayreda M, Vilarrasa J, Bastons M, Porquet L, Urniza A. PEARS ("mystery swine disease") - summary of the work conducted by our group. *Am Assoc Swine Pract Newsl* 1992; 4: 16–8.

Plut J, Jamnikar-Ciglencečki U, Štukelj M. Molecular detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus 2 and hepatitis E virus in oral fluid compared to their detection in faeces and serum. *BMC Vet Res* 2020; 16: e164. DOI: 10.1186/s12917-020-02378-4

Pol JM, van Dijk JE, Wensvoort G, Terpstra C. Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). *Vet Q* 1991; 13: 137–43. DOI: 10.1080/01652176.1991.9694298

Pol JM, Wagenaar F, Reus JE. Comparative morphogenesis of three PRRS virus strains. *Vet Microbiol* 1997; 55(1/4): 203–8. DOI: 10.1016/S0378-1135(96)01329-6

Polo J, Campbell JM, Crenshaw J, et al. Half-life of porcine antibodies absorbed from a colostrum supplement containing porcine immunoglobulins. *J Anim Sci* 2012; 90(Suppl. 4): 308–10. DOI: 10.2527/jas.53716

Prather RS, Rowland RR, Ewen C, et al. An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol* 2013; 87(17): 9538–46. DOI: 10.1128/JVI.00177-13

Pruett SB. Stress and the immune system. *Pathophysiology* 2003; 9(3): 133–53. DOI: 10.1016/S0928-4680(03)00003-8

Pesente P, Rebonato V, Sandri G, Giovanardi D, Ruffoni LS, Torriani S. Phylogenetic analysis of ORF5 and 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(3/4): 214–24. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.11.061

Pravilnik o boleznih živali. *Ur List RS* 2010; 20(24): 3206–15.

Prickett JR, Cutler S, Kinyon JM, et al. Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and antibody in swine oral fluid. *J Swine Health Production* 2010; 18(4): 187–95.

Prickett JR, Kim W, Simer R, Yoon KJ, Zimmerman J. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J Swine Health Prod* 2008; 16(2): 86–91.

Prickett JR, Zimmerman JJ. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Anim Health Res Rev* 2010; 11: 207–16. DOI: 10.1017/S1466252310000010

Prieto C, Sanchez R, Martín-Rillo S, et al. Exposure of gilts in early gestation to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Rec* 1996a; 138(22): 536–9. DOI: 10.1136/vr.138.22.536

Prieto C, Suarez P, Bautista JM, et al. Semen changes in boars after experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Theriogenology* 1996b; 45(2): 383–95. DOI: 10.1016/0093-691X(95)00375-1

Prieto C, Suarez P, Martín-Rillo S, Simarro I, Solana A, Castro JM. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on development of porcine fertilizedova in vitro. *Theriogenology* 1996c; 46(4): 687–93. DOI: 10.1016/0093-691X(96)00220-8

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. DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.01.005

Provost C, Jia JJ, Music N, et al. Identification of a new cell line permissive to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and replication which is phenotypically distinct from MARC-145 cell line. *Virology* 2012; 9(1): 267. DOI: 10.1186/1743-422X-9-267

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* 2005; 36: 33–6.

Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(10): 741–50. DOI: 10.1038/nri1886

Rajkhowa TK, Jagan Mohanarao G, Gogoi A, Hauhnar L, Isaac L. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from the first outbreak of India shows close relationship with the highly pathogenic variant of China. *Vet Q* 2015; 35(4): 186–93. DOI: 10.1080/01652176.2015.1066043

Ramirez A, Wang C, Prickett JR, et al JJ. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev Vet Med* 2012; 104: 292–300. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2011.11.008

Rawal G, Rademacher C, Linhares D. Comparison of productivity losses between swine breeding herds adopting killed or attenuated PRRS virus vaccination protocols following PRRS outbreaks. Ames : Iowa State University, Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine Publications, 2020: 1–14.

Reiner G, Willems H, Pesch S, Ohlinger V. Variation in resistance to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Pietrain and Miniature pigs. *J Anim Breed Genet* 2010; 127: 100–6. DOI: 10.1111/j.1439-0388.2009.00818.x

Renken C, Nathues C, Swam H, et al. Application of an economic calculator to determine the cost of porcine reproductive and respiratory syndrome at farm-level in 21 pig herds in Germany. *Porcine Health Manag* 2021; 7(1): e3. DOI: 10.1186/s40813-020-00183-x

Renson P, Rose N, Le Dimna M, et al. Dynamic changes in bronchoalveolar macrophages and cytokines during infection of pigs with a highly or low pathogenic genotype 1 PRRSV strain. *Vet Res* 2017; 48(1): e15. DOI: 10.1186/s13567-017-0420-y

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. DOI: 10.1089/vim.2010.0051

Reotutar R. Swine reproductive failure syndrome mystifies scientists. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 425–8.

Rio DC. Reverse transcription-polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Protoc* 2014; 2014(11): 1207–16. DOI: 10.1101/pdb.prot080887

Ristow LE, Lage AP, Perez Jr AA, Mosqueira PD, Reis MA. Serological survey of PRRS (Porcine reproductive and respiratory syndrome) in the state of Minas Gerais, Brazil. In: IPVS 2008. Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress. Durban, South Africa, 2008: 22–6.

Robertson IB. Transmission of blue-eared pig disease. *Vet Rec* 1992; 130: 478–9.

Robinson SR, Li J, Nelson EA, Murtaugh MP. Broadly neutralizing antibodies against the rapidly evolving porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 2015; 203: 56–65. DOI: 10.1016/j.virusres.2015.03.016

Robinson SR, Rahe MC, Gray DK, Martins KV, Murtaugh MP. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus neutralizing antibodies provide *in vivo* cross-protection to PRRSV1 and PRRSV2 viral challenge. *Virus Res* 2018; 248: 13–23. DOI: 10.1016/j.virusres.2018.01.015

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 Wilde Dis* 2012; 48(1): 131–7. DOI: 10.7589/0090-3558-48.1.131

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. DOI: 10.1177/104063879400600102

Rossow KD, Shivers JL, Yeske P, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs characterised by marked neurovirulence. *Vet Rec* 1999; 144(16): 444–8. DOI: 10.1136/vr.144.16.444

Rosendal T, Dewey C, Friendship R, Wootton S, Young B, Poljak Z. Spatial and temporal patterns of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) genotypes in Ontario, Canada, 2004-2007. *BMC Vet Res* 2014; 10: e83. DOI:10.1186/1746-6148-10-83

Rosenfeld P, Turner PV, MacInnes JI, Nagy É, Yoo D. Evaluation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in laboratory rodents. *Can J Vet Res* 2009; 73: 313–8.

Rotolo ML, Giménez-Lirola L, Ji J, et al. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-specific IgM-IgA in oral fluid samples reveals PRRSV infection in the presence of maternal antibody. *Vet Microbiol* 2018; 214: 13–20. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.11.011

Rotolo ML, Sun Y, Wang C, et al. Sampling guidelines for oral fluid-based surveys of group-housed animals. *Vet Microbiol* 2017; 209: 20–9. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.02.004

Rovira A, Clement T, Christopher-Hennings J, et al. Evaluation of the sensitivity of reverse-transcription polymerase chain reaction to detect porcine reproductive and respiratory syndrome virus on individual and pooled samples from boars. *J Vet Diagn Investig* 2007; 19(5): 502–9. DOI: 10.1177/104063870701900507

Rovira A, Abrahante J, Murtaugh M, Claudia MZ. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Investig* 2009; 21(3): 350–4. DOI: 10.1177/104063870902100308

Rowland RR, Schneider P, Fang Y, Wootton S, Yoo D, Benfield DA. Peptide domains involved in the localization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus. *Virology* 2003; 316(1): 135–45. DOI: 10.1016/S0042-6822(03)00482-3

Rowland RR, Yoo D. Nucleolar-cytoplasmic shuttling of PRRSV nucleocapsid protein: a simple case of molecular mimicry or the complex regulation by nuclear import, nucleolar localization and nuclear export signal sequences. *Virus Res* 2003; 95(1/2): 23–33. DOI: 10.1016/S0168-1702(03)00161-8

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.

Saito. Mechanisms of T-Lymphocyte Signaling and Activation. In: Paul WE, ed. *Fundamental immunology*. 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012: 306–54.

Saiyed ZM, Telang SD, Ramchand CN. Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine. *BioMagn Res Technol* 2003; 1(1): e2. DOI: 10.1186/1477-044X-1-2

Sang Y, Rowland RR, Blecha F. Interaction between innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Anim Health Res Rev* 2011; 12: 149–67. DOI: 10.1017/S1466252311000144

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74(12): 5463–7. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463

Sapundžić ZZ, Ninković M, Milovanović B, Glišić D, Milićević V, Kureljušić B. Comparison of performances between three commercial ELISA kits for detection of antibodies against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PPRSV) in swine sera samples. *Archives of Veterinary Medicine* 2020; 13(2): 77–86.

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.

Schindler C, Darnell Jr JE. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 1995; 64(1): 621–52. DOI: 10.1146/annurev.bi.64.070195.003201

Schroeder HW, Wald D, Greenspan NS. Immunoglobulins: Structure and function. In: Paul WE, ed. *Fundamental immunology*. 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012: 130–51.

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. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.04.043

Shera EB, Seitzinger NK, Davis LM, Keller RA, Soper SA. Detection of single fluorescent molecules. *Chem Phys Lett* 1990; 174(6): 553–7. DOI: 10.1016/0009-2614(90)85485-U

Shi M, Lam TT, Hon CC, et al. Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus Res* 2010; 154(1/2): 7–17. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.08.014

Shin JH, Kang YB, Kim YJ, et al. Sero-epidemiological studies on porcine reproductive and respiratory syndrome in Korea: 1. Detection of indirect fluorescent antibodies. *RDA J Agric Sci* 1993; 35((2): 572–6.

Silva-Campa E, Flores-Mendoza L, Reséndiz M, et al. Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 2009; 387(2): 373–9. DOI: 10.1016/j.virol.2009.02.033

Sinn LJ, Klingler E, Lamp B, et al. Emergence of a virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) 1 strain in Lower Austria. *Porcine Health Manag* 2016; 2(1): e28. DOI: 10.1186/s40813-016-0044-z;

Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986; 321(6071): 674–9. DOI: 10.1038/321674a0

Smith K, Diggle MA, Clarke SC. Comparison of commercial DNA extraction kits for extraction of bacterial genomic DNA from whole-blood samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6): 2440–3. DOI: 10.1128/JCM.41.6.2440-2443.2003

Snijder EJ, Meulenber JJ. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* 1998; 79(5): 961–79.

Solano GI, Segalés J, Collins JE, Molitor TW, Pijoan C. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) interaction with *Haemophilus parasuis*. *Vet Microbiol* 1997; 55(1/4): 247–57. DOI: 10.1016/S0378-1135(96)01325-9

Sørensen KJ, Strandbygaard B, Bøtner A, Madsen ES, Nielsen J, Have P. Blocking ELISA's for the distinction between antibodies against European and American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 1998; 60(2/4): 169–77. DOI: 10.1016/S0378-1135(98)00159-X

Spagnuolo-Weaver M, Walker IW, et al. The reverse transcription polymerase chain reaction for the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome: comparison with virus isolation and serology. *Vet Microbiol* 1998; 62(3) :207–15. DOI: 10.1016/S0378-1135(98)00212-0

SPF Sundhedsstyringen. Rules for health control in Blue SPF herds. In: Blue SPF Folder, SPF-SuS 2016: 4–5.

Spronk G, Otake S, Dee S. Prevention of PRRSV infection in large breeding herds using air filtration. *Vet Rec* 2010; 166(24): 758–9. DOI:10.1136/vr.b4848

Sritharan V, Barker Jr RH. A simple method for diagnosing *M. tuberculosis* infection in clinical samples using PCR. *Mol Cell Probes* 1991; 5(5): 385–95. DOI: 10.1016/S0890-8508(06)80011-3

Srivastava M, Pollard HB. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J* 1999;13(14): 1911–22.

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. DOI: 10.1099/vir.0.81782-0

Stadejek T, Stankevicius A, Murtaugh MP, Oleksiewicz MB. Molecular evolution of PRRSV in Europe: current state of play. *Vet Microbiol* 2013; 165: 21–8. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.02.029

Stankevičius A, Buitkuvienė J, Deltuvytienė J, et al. Five years seroprevalence study of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Lithuanian pig and wild boar populations. *Bull Vet Inst Pulawy* 2014; 58(3): 379–83. DOI: 10.2478/bvip-2014-0059

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.

Suleman M, Novakovic P, Malgarin CM, Detmer SE, Harding JC, MacPhee DJ. Spatiotemporal immunofluorescent evaluation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus transmission across the maternal-fetal interface. *Pathog Dis* 2018; 76(5): fty060. DOI: 10.1093/femspd/fty060

Sun Y, Han M, Kim C, Calvert JG, Yoo D. Interplay between interferon-mediated innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viruses* 2012; 4(4): 424–46. DOI: 10.3390/v4040424

Sur JH, Doster AR, 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: 9170–9. DOI: 10.1128/jvi.71.12.9170-9179.1997

Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, et al. Artificial insemination of gilts with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus-contaminated semen. *J Swine Health Prod* 1994a; 2(6): 19–23.

Swenson SL, Hill HT, Zimmerman J, et al. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J Am Vet Med Assoc* 1994b; 204(12): 1943–8.

Štukelj M. Ukrepi ob pojavu prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma. In: Zbornik podiplomskega izpopolnjevanja. Ptuj, 10. feb. 2012. Ljubljana : Veterinarska zbornica, Sekcija zasebnih veterinarjev praktikov, 2012: 37–8.

Štukelj M, Valenčak Z. Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with serumization, natural exposure and vaccination on six pig farms in Slovenia. *Contemp Agric* 2012; 61(172): 75–83.

Štukelj M. Eliminacija prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma z naravno prekužitvijo, serumizacijo in vakcinacijo. Ljubljana : UL Veterinarska fakulteta, 2013. Doktorska disertacija.

Štukelj M, Golinar Oven I. Biovarnostni ukrepi za preprečevanje vnosa in širjenja prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma. In: Štukelj M, Golinar Oven I, Toplak I, eds. Celovite rešitve sistemov rej prašičev z namenom izboljšanja konkurenčnosti slovenske prašičereje. Izobraževanje v okviru Ciljnega raziskovalnega projekta V4-1111. Ljubljana : UL Veterinarska fakulteta, 2014: 5–10.

Štukelj M, Plut J, Toplak I. Serum inoculation as a possibility for elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) from a farrow-to-finish pig farm. *Acta Vet Hung* 2015; 63(3): 389–99. DOI: 10.1556/004.2015.037

Tang Julian W. The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *J R Soc Interface* 2009; 6: 737–6. DOI: 10.1098/rsif.2009.0227.focus

Taylor DJ. Pig diseases. 8th ed. Glasgow : Taylor D.J., 2006: 60–8.

Terpstra C, Wensvoort G, Pol JMA. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *Vet Q* 1991; 13: 131–6. DOI: 10.1080/01652176.1991.9694297

Terpstra C, Wensvoort G, van Leengoed LAMG. Persistence of Lelystad virus in herds affected by porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. In: Proceedings of the 12th International Pig Veterinary Society. The Hague, 1992: Vol. 1, 118.

Thacker EL, Halbur PG, Ross RF, Thanawongnuwech R, Thacker BJ. Mycoplasma hyopneumoniae potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *Journal of clinical microbiology* 1999; 37(3): 620–7. DOI: 10.1128/JCM.37.3.620-627.1999

Thacker EL, Thacker BJ, Young TF, Halbur PG. Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by Mycoplasma hyopneumoniae. *Vaccine* 2000; 18(13): 1244–52. DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00395-3

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(3): 334–7. DOI: 10.1177/104063879700900323

Thanawongnuwech R, Halbur PG, Thacker EL. The role of pulmonary intravascular macrophages in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Anim Health Res Rev* 2000; 1(2): 95–102. DOI: 10.1017/S1466252300000086

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* 2004; 11(5): 901–8. DOI: 10.1128/CDLI.11.5.901-908.2004

Thanawongnuwech R, Thacker EL. Interleukin-10, interleukin-12, and interferon- γ levels in the respiratory tract following Mycoplasma hyopneumoniae and PRRSV infection in pigs. *Viral Immunol* 2003; 16(3): 357–67. DOI: 10.1089/088282403322396154

Tian D, Wei Z, Zevenhoven-Dobbe JC, et al. Arterivirus minor envelope proteins are a major determinant of viral tropism in cell culture. *J Virol* 2012; 86(7): 3701–12. DOI: 10.1128/JVI.06836-11

Tian K, Yu X, Zhao T, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS One* 2007; 2: e526. DOI: 10.1371/journal.pone.0000526

Tijms MA, Van Der Meer Y, Snijder EJ. Nuclear localization of non-structural protein 1 and nucleocapsid protein of equine arteritis virus. *J Gen Virol* 2002; 83(4): 795–800. DOI: 10.1099/0022-1317-83-4-795

Toma B, Vaillancourt JP, Dufour B, et al. Dictionary of veterinary epidemiology. Ames : Iowa State University Press, 1991: 56, 83, 90.

Toplak I. Molekularna epidemiologija sevov virusa prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma (PRRS) v Sloveniji [online]. Ljubljana : Veterinarska fakulteta, 2015: 17–8. <http://www3.vf.uni-lj.si/PortalGenerator/document.aspx?ID=132&Action=2&UserID=0&SessionID=265952&NavigationID=637>. (dostop 16. 3. 2022)

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. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.09.019

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. DOI: 10.1.1.553.619

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. Evaluation of virus PRRS outbreaks in negative herds. In: 18th International Pig Veterinary Society Congress: proceedings. Hamburg : IPVS, 2004: Vol 1, 103.

Torrents Gil D. Development and implementation of a monitoring system for PRRSV status classification and study of the PRRSV stability on production parameters in Spanish breeding herds. Ames : Iowa State University, 2019. Doctoral dissertation.

Torrison J, Vannier P, Albina E, et al. Incidence and clinical effect of PRRS virus in gilts on commercial swine farms. In: Proceedings of the 13th International Pig Veterinary Society Congress. Bangkok, 1994: 511.

Trevisan G, Jablonski E, Angulo J, Lopez WA, Linhares DC. Use of processing fluid samples for longitudinal monitoring of PRRS virus in herds undergoing virus elimination. *Porcine Health Manag* 2019; 5(1): e18. DOI:10.1186/s40813-019-0125-x.

Trincado C, Dee SA, Jacobson L, Otake S, Rossow K, Pijoan C. Evaluation of the role of mallard ducks as vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Rec* 2004a; 154: 233–7. DOI: 10.1136/vr.154.8.233

Trincado C, Dee SA, Jacobson L, Otake S, Rossow K, Pijoan C. Attempts to transmit porcine reproductive and respiratory syndrome virus by aerosols under controlled field conditions. *Vet Rec* 2004b; 154: 294–7. DOI: 10.1136/vr.154.10.294

Trus I, Bonckaert C, van der Meulen K, Nauwynck HJ. Efficacy of an attenuated European subtype 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs upon challenge with the East European subtype 3 PRRSV strain Lena. *Vaccine* 2014; 32: 2995–3003. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.03.077

Trus I, Frydas IS, Reddy VR, et al. Immunity raised by recent European subtype 1 PRRSV strains allows better replication of East European subtype 3 PRRSV strain Lena than that raised by an older strain. *Vet Res* 2016; 47: e15. DOI: 10.1186/s13567-015-0292-y

Tsai CJ, Leland JC, Harding AS. Isolation and purification of RNA. In: Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Westfall MV, eds. *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. 3rd edition. Boca Raton: CRC Press, 2011: 167–87.

Tsujita S, Morimoto K. Secretory IgA in saliva can be a useful stress marker. *Environ Health Prev Med* 1999; 4(1): 1–8. DOI: 10.1007/BF02931243

Odredba o izvajanju sistematičnega spremljanja stanja bolezni in cepljenj živali v letu 2012. Ur List RS 2011; 21(105): 14204–9. https://www.uradni-list.si/_pdf/2011/Ur/u2011105.pdf (23. 11. 2021)

Valicek L, Psikal I, Smid B, Rodak L, Kubalikova R, Kosinova E. Isolation and identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures. *Vet Med* 1997; 42(10): 281–7.

Van Alstine WG, Kanitz CL, Stevenson GW. Time and temperature survivability of PRRS virus in serum and tissues. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5(4): 621–2. DOI: 10.1177/104063879300500421

Van Alstine WG, Popielarczyk M, Albrechts SR. Effect of formalin fixation on the immunohistochemical detection of PRRS virus antigen in experimentally and naturally infected pigs. *J Vet Diagn Invest* 2002; 14(6): 504–7. DOI: 10.1177/104063870201400611

Van Breedam W, Delputte PL, Van Gorp H, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J Gen Virol* 2010a; 91(7): 1659–67. DOI: 10.1099/vir.0.020503-0

Van Breedam W, Van Gorp H, Zhang JQ, Crocker PR, Delputte PL, Nauwynck HJ. The M/GP 5 glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLoS Pathog* 2010b; 6(1): e1000730. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000730

van der Zee A, Peeters M, de Jong C, et al. Qiagen DNA extraction kits for sample preparation for Legionella PCR are not suitable for diagnostic purposes. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3): e1126. DOI: 10.1128/jcm.40.3.1128.2002

Van Gorp H, Van Breedam W, Delputte PL, Nauwynck HJ. Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 2008; 89(12): 2943–53. DOI: 10.1099/vir.0.2008/005009-0

Van Reeth K, Labarque G, Nauwynck H, Pensaert M. Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res Vet Sci* 1999; 67(1): 47–52. DOI: 10.1053/rvsc.1998.0277

Van Reeth K, Nauwynck H, Pensaert M. Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Vet Microbiol* 1996; 48(3/4): 325–35. DOI: 10.1016/0378-1135(95)00145-X

Varewyck H. The epidemiology of PRRS in Belgium. In: *The new pig disease. Porcine reproductive and respiratory syndrome: a report on the seminar held in Brussels on 4–5 November 1991 and organized by the European Commission.* Brussels : EC, 1991: 22.

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. DOI: 10.2460/javma.232.10.1530

Venteo A, Rebollo B, Sarraseca J, Rodriguez MJ, Sanz A. A novel double recognition enzyme-linked immunosorbent assay based on the nucleocapsid protein for early detection of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Virol Methods* 2012; 181(1): 109–13. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.01.024

Wang G, He Y, Tu Y, et al. Comparative analysis of apoptotic changes in peripheral immune organs and lungs following experimental infection of piglets with highly pathogenic and classical porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virol J* 2014; 11(1): e2. DOI: 10.1186/1743-422X-11-2

Wang G, Li L, Yu Y, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and induction of apoptosis in bone marrow cells of infected piglets. *J Gen Virol* 2016; 97(6): 1356–61. DOI: 10.1099/jgv.0.000454

Wang X, Marthaler D, Rovira A, Rossow S, Murtaugh MP. Emergence of a virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vaccinated herds in the United States. *Virus Res* 2015a; 210: 34–41. DOI: 10.1016/j.virusres.2015.07.004

Wang H, Shen L, Chen J, et al. Deletion of CD163 Exon 7 Confers Resistance to Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Viruses on Pigs. *Int J Biol Sci* 2019; 15(9): 1993–2005. DOI: 10.7150/ijbs.34269.

Wang G, Yu Y, Tu Y, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection induced apoptosis and autophagy in thymi of infected piglets. *PLoS One* 2015;10(6): e0128292. DOI: 10.1371/journal.pone.0128292

Wei Z, Zhang J, Zhuang J, Sun Z, Gao F, Yuan S. Immunization of pigs with a type 2 modified live PRRSV vaccine prevents the development of a deadly long lasting hyperpyrexia in a challenge study with highly pathogenic PRRSV JX143. *Vaccine* 2013; 31(16): 2062–6. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.02.012

Welch SK, Calvert JG. A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection. *Virus Res* 2010; 154(1/2): 98–103. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.07.018

Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, et al. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q* 1991;13(3):121–30. DOI: 10.1080/01652176.1991.9694296

Wensvoort G, de Kluyver EP, Pol JM, 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. DOI: 10.1016/0378-1135(92)90046-V

Wensvoort G, Meulenbergh JJ, Murtaugh M, et al. The porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Biotechnol Newsl* 1993; 3: 113–20.

Wernike K, Bonilauri P, Dauber M, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: interlaboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction detection methods. *J Vet Diagn Invest* 2012a; 24(5): 855–66. DOI: 10.1177/1040638712452724

Wernike K, Hoffmann B, Dauber M, Lange E, Schirrmeier H, Beer M. Detection and typing of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus by multiplex real-time rt-PCR. *PLoS One* 2012b; 7(6): e38251. DOI: 10.1371/journal.pone.0038251

White MEC. The clinical signs and symptoms of blue-eared pig disease (PRRS). *Pig Vet J* 1992a; 28: 62–8.

White MEC. PRRS-clinical update. *Pig Vet J* 1992b; 29: 179–87.

White D, Rotolo M, Olsen C, et al. Recommendations for pen-based oral-fluid collection in growing pigs. *J Swine Health Prod* 2014; 22(3): 138–41.

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 Clin Microbiol* 2003; 41: 58–62. DOI: 10.1128/JCM.41.1.58-62.2003

Wills RW, Gray JT, Fedorka-Cray PJ, Yoon KJ, Ladely S, Zimmerman JJ. Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and *Salmonella*

choleraesuis in swine. *Vet Microbiol* 2000a; 71(3/4): 177–92. DOI: 10.1016/S0378-1135(99)00175-3

Wills RW, Osorio FA, Doster AR. Susceptibility of selected non-swine species to infection with PRRS virus. In: 31st Annual meeting of the American Association of Swine Practitioner: proceedings. Indianapolis, 2000b: 411–3.

Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon K, et al. Porcine reproductive and respiratory virus: routes of excretion. *Vet Microbiol* 1997a; 57: 69–81. DOI: 10.1016/S0378-1135(97)00079-5

Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet Microbiol* 1997b; 55: 231–40. DOI: 10.1016/S0378-1135(96)01337-5

Woonwong Y, Kedkovid R, Arunorat J, et al. Oral fluid samples used for PRRSV acclimatization program and sow performance monitoring in endemic PRRS-positive farms. *Trop Anim Health Prod* 2018; 50: 291–8. DOI 10.1007/s11250-017-1428-z.

Wongyanin P, Buranapraditkun S, Chokeshai-Usaha K, Thanawonguwech R, Suradhat S. Induction of inducible CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Immunol Immunopath* 2010; 133(2/4): 170–82. DOI: 10.1016/j.vetimm.2009.07.012

Xing T, Yu X, Zhang J, et al. Review for porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Agric Sci Tech* 2017; 18(1): 147–150.

Xinglin J, Huanchun C, Xiang W, Changming Q. Quantitative and qualitative study of enzyme-linked immunosorbent assay to detect IgG against Japanese encephalitis virus in swine sera. *Vet Res Communic* 2005; 29(2): 159–69. DOI: 10.1023/B:VERC.0000047485.85866.6e

Xu M, Wang S, Li L, et al. Secondary infection with *Streptococcus suis* serotype 7 increases the virulence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *Virol J* 2010; 7(1): e184. DOI: 10.1186/1743-422X-7-184

Yaeger MJ, Prieve T, Collins J, Christopher-Hennings J, Nelson E, Benfield D. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *J Swine Health Prod* 1993; 1(5): 7–9.

Yanagi Y, Yoshikai Y, Leggett K, Clark SP, Aleksander I, Mak TW. A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature*. 1984; 308(5955): 145–9.

Yoo D, Wootton SK, Li G, Song C, Rowland RR. Colocalization and interaction of the porcine arterivirus nucleocapsid protein with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J Virol* 2003; 77: 12173–83. DOI: 10.1128/JVI.77.22.12173-12183.2003

Yoon KJ, Chang CC, Zimmerman JJ, Harmon K. Genetic and antigenic stability of PRRS virus in pigs: field and experimental perspectives. *Adv Exp Med Biol* 2001; 494: 25–30. DOI: 10.1007/978-1-4615-1325-4_3

Yoon IJ, Freese WR, Cho SH in sod. Seroprevalence of indirect fluorescent antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in selected swine herds. In: *Proceedings Conference Research Workers Animal Pis* 1992: 51.

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.

Yoza B, Arakaki A, Maruyama K, Takeyama H, Matsunaga T. Fully automated DNA extraction from blood using magnetic particles modified with a hyperbranched polyamidoamine dendrimer. *J Biosci Bioeng* 2003; 95(1): 21–6. DOI: 10.1016/S1389-1723(03)80143-3

Yu F, Yan Y, Shi M, et al. Phylogenetics, genomic recombination, and NSP2 polymorphic patterns of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China and the United States in 2014–2018. *J Virol* 2020; 94(6): e01813–19. DOI: 10.1128/JVI.01813-19

Zhang Q, Yoo D. PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Vet Microbiol* 2015; 177(3/4): 229–41. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.04.002

Zhang J, Zheng Y, Xia XQ, et al. High-throughput whole genome sequencing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from cell culture materials and clinical specimens using next-generation sequencing technology. *J Vet Diagn Invest* 2017; 29(1): 41–50. DOI: 10.1177/1040638716673404

Zhou YJ, Hao XF, Tian ZJ, et al. Highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China. *Transbound Emerg Dis* 2008; 55(3/4): 152–64. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2008.01020.x

Zhou L, Yang H. Porcine reproductive and respiratory syndrome in China. *Virus Res* 2010; 154: 31–7. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.07.016

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. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.04.013

Zimmerman JJ, Dee SA, Holtkamp DJ, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (Porcine Arteriviruses). In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, et al., eds. *Diseases of swine*. 11th ed. Ames: Wiley & Sons, 2019: 685–708.

Zimmerman JJ, Yoon KJ, Pirtle EC, Wills RW, Sanderson TJ, McGinley MJ. Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species. *Vet Microbiol* 1997a; 55(1/4): 329–36. DOI: 10.1016/S0378-1135(96)01320-X

Zimmerman JJ, Yoon KJ, Wills RW, Swenson SL. General overview of PRRSV: a perspective from the United States. *Vet Microbiol* 1997b; 55: 187–96. DOI: 10.1016/S0378-1135(96)01330-2