

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΚΟΡΟΝΑΪΟΣ ΤΟΥ ΣΚΥΛΟΥ
(Canine Corona Virus, CCoV).
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ
ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ**

Ντάφης Α. Βασίλειος

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ξυλούρη Ε. Αν. Καθηγήτρια

Θεοδωρόπουλος Γ. Αν. Καθηγητής

Παπαναστασοπούλου Μ. Επ. Καθηγήτρια

Αθήνα, Μάιος 2010

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΟΡΟΝΑΪΟΣ ΤΟΥ ΣΚΥΛΟΥ
(Canine Corona Virus, CCoV).
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ
ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ

Ντάφης Α. Βασίλειος

Εξεταστική Επιτροπή:

Θεοδωρόπουλος Γ. Αν. Καθηγητής
Μενεγάτος Ι. Καθηγητής
Μπουρτζή-Χατζοπούλου Ε. Καθηγήτρια
Ξυλούρη Ε. Αν. Καθηγήτρια
Οικονομόπουλος Ι. Επ. Καθηγητής
Παπαναστασοπούλου Μ. Επ. Καθηγήτρια
Ράλλης Τ. Καθηγητής

Αθήνα, Μάιος 2010

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εισηγήτρια και Αν. Καθηγήτρια κα Ξυλούρη Ε. για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη που μου παρείχε σε κάθε στάδιο της μελέτης, χωρίς την οποία θα ήταν αδύνατη η πραγματοποίησή της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής κα Παπαναστασοπούλου Μ., Επ. Καθηγήτρια και κ. Θεοδωρόπουλο Γ., Αν. Καθηγητή, για την ουσιαστική καθοδήγηση και τα πολύτιμα τους σχόλια.. Επιπλέον, ευχαριστίες εκφράζονται στα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής κ. Μενεγάτο Ι., Καθηγητή, κ. Ράλλη Τ., Καθηγητή, κα Χατζοπούλου Ε., Καθηγήτρια και κ. Οικονομόπουλο Ι., Επ. Καθηγητή, για τον χρόνο που αφιέρωσαν και τις ουσιαστικές τους υποδείξεις.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, το Κοινωφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Ωνάσης για την χορήγηση υποτροφίας για την εκπόνηση της εν λόγω διδακτορικής διατριβής, καθώς και την φαρμακευτική εταιρία Pfizer.

Νιώθω επίσης, την ανάγκη να ευχαριστήσω τον κ. Buonavoglia C. Καθηγητή της Κτηνιατρικής σχολής του Μπάρι και όλα τα μέλη του εργαστηρίου του, για την εκπαίδευση και την στήριξη που μου παρείχαν. Ευχαριστίες εκφράζονται στην κα Σωτηράκογλου Κ., Επ. Καθηγήτρια για την σημαντική της βοήθεια στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και στον κ. Παπαϊωάννου Ν., Αν. Καθηγητή για τις ουσιαστικές του υποδείξεις, σε ότι αφορά τα παθολογοανατομικά ευρήματα της παρούσας μελέτης.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω τους συναδέλφους κτηνιάτρους, τους ιδιοκτήτες καταστημάτων πώλησης ζώων συντροφιάς και τις φιλοζωικές οργανώσεις, για την μεγάλη ανταπόκριση και το ενδιαφέρον που έδειξαν για τη συλλογή των δειγμάτων. Παράλληλα ευχαριστίες εκφράζονται σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων και ιδιαίτερα στον κ. Βαγγελή Θ.

Τέλος, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τους φίλους κτηνιάτρους (Μαρί V., Μπάτζιου Ρ., Θώμας Α., Δανίκα Σ., Μπουντούρη Μ., Φλουράκη Ε., Λιανδρής Ε., Φραγκιαδάκη Ε., Αγαθαγγελίδης Κ.) και φοιτητές στο Γ.Π.Α (Πουλοπούλου Ι., Παναγιωτάκη Ε., Κανδρής Θ., Ανδρεάδου Μ., Τάκα Σ.) που μοιράστηκαν την αγωνία και την χαρά μου και βοήθησαν ουσιαστικά στην πραγματοποίηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Στην οικογένεια μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A/A	Τίτλος	Σελίδα
A	Περίληψη	1
B	Abstract	3
Γ	Θεωρητικό Μέρος	5
1.1	Κοροναϊός του σκύλου	6
1.1.1	Ταξινόμηση	6
1.1.2	Μορφολογία και δομή	8
1.1.3	Φυσικοχημικές ιδιότητες	9
1.1.4	Το γονιδίωμα και οι πρωτεΐνες που αυτό κωδικοποιεί	10
1.1.5	Πολλαπλασιασμός-αντιτύπωση ιού	13
1.1.6	<i>In vitro</i> καλλιέργεια του ιού	15
1.1.7	Γενετική ποικιλομορφία και εξέλιξη	16
1.2	Προσβολή του σκύλου από CCoV	20
1.2.1	Ιστορική αναδρομή	20
1.2.2	Παθογένεια	20
1.2.3	Ανοσολογική απάντηση	22
1.2.4	Κλινικά συμπτώματα	23
1.2.5	Παθολογοανατομικές αλλοιώσεις	23
1.2.6	Επιζωοτιολογία του νοσήματος	24
1.2.6.1	Γεωγραφική κατανομή του ιού και των τύπων του παγκοσμίως	24
1.2.6.2	Μετάδοση και διασπορά	26
1.2.6.3	Μεικτές μολύνσεις	28
1.2.7	Διάγνωση	28
1.2.7.1	Κλινική	28

1.2.7.2	Εργαστηριακή	28
1.2.7.3	Διαφορική	31
1.2.8	Θεραπεία	31
1.2.9	Πρόληψη και έλεγχος	31
1.3	Αποκλίνοντα στελέχη και στελέχη που διαπερνούν τον εντερικό φραγμό	33
Δ	Πειραματικό Μέρος	36
1	Εισαγωγή	37
2	Υλικά και μέθοδοι	38
2.1	Ζώα	38
2.2	Στοιχεία των ζώων	39
2.3	Δείγματα κοπράνων και οργάνων	39
2.4	Εκχύλιση DNA και RNA από κόπρανα και όργανα	39
2.5	Εκκινητές	40
2.6	Στελέχη του CCoV που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αποδοτικότητας των RT-PCRs	41
2.7	Αντίστροφη μεταγραφή – Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τα στελέχη του CCoV	41
2.7.1	Ανίχνευση-Διάγνωση	41
2.7.2	Χαρακτηρισμός του τύπου	42
2.7.3	Διαφοροποίηση των υποτύπων IIa και IIb	43
2.7.4	Διαφοροποίηση του CCoVIIb και του TGEV	44
2.7.5	Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου S του ιού	44
2.7.6	Ενίσχυση των ORF 2, 3, 4, 5, 6 και 7 των στελεχών του CCoV που διαπερνούν	45

	τον εντερικό φραγμό	
2.7.7	Επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού του στελεχούς THr/85/08	46
2.8	Αντίστροφη μεταγραφή - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση του CCoV και το χαρακτηρισμό του τύπου	47
2.9	Τεχνικές για την ανίχνευση άλλων ιών	50
2.10	Ηλεκτροφόρηση των πηκτών αγαρόζης	53
2.11	Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων	54
2.11.1	Απομόνωση των προϊόντων των RT-PCRs	54
2.11.2	Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων των προϊόντων ενίσχυσης των RT-PCRs	54
2.12	Λογισμικά πολλαπλής στοίχισης και επεξεργασίας αλληλουχιών, φυλογενετικής ανάλυσης και ανάλυσης των πρωτεϊνών	55
2.13	Λογισμικό στατιστικής ανάλυσης αποτελεσμάτων	55
2.14	Απομόνωση στελεχών του CCoV σε κυτταροκαλλιέργειες	55
2.15	Έμμεσος ανοσοφθορισμός για την επιβεβαίωση της <i>in vitro</i> απομόνωσης στελεχών του CCoV	57
2.16	Έμμεσος ανοσοφθορισμός για τον αποκλεισμό της <i>in vitro</i> απομόνωσης στελεχών του CPV-2	57
2.17	Τιτλοποίηση των στελεχών CCoV	58
3	Αποτελέσματα	59
3.1	Στελέχη του CCoV που ανιχνεύθηκαν στα κόπρανα των σκύλων	59
3.1.1	Ανίχνευση του CCoV και χαρακτηρισμός των τύπων με RT-PCR	59
3.1.2	Ανίχνευση του CCoV και	60

	χαρακτηρισμός των τύπων με real time (RT-) PCRs και σύγκριση αυτών με τις αντίστοιχες RT-PCRs	
3.1.3	Διαφοροποίηση του υποτύπου CCoVIIa από τον CCoVIIb και του υποτύπου CCoVIIb από τον TGEV με RT-PCR	61
3.1.4	Παράλληλη ερμηνεία των αποτελεσμάτων των RT-PCRs και των real time (RT-) PCRs	63
3.1.5	Ποσοστά ανίχνευσης του ιού σε σκύλους που διαβιούσαν ατομικά ή ομαδικά	65
3.1.6	Ποσοστά ανίχνευσης του ιού σε σκύλους δύο ηλικιακών ομάδων	66
3.1.7	Ανίχνευση άλλων ιών σε ζώα με CCoV στα κόπρανα	67
3.1.8	Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών του CCoV τύπου I	69
3.1.9	Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών του CCoVIIa	73
3.1.10	Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών του CCoVIIb	77
3.1.11	Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων και φυλογενετική ανάλυση του στελέχους THr/85/08	80
3.2	Στελέχη του CCoV που ανιχνεύθηκαν στα όργανα των σκύλων	82
3.2.1	Ανίχνευση του CCoV και χαρακτηρισμός των τύπων με RT-PCR	82
3.2.2	Ανίχνευση του CCoV και χαρακτηρισμός των τύπων με real time (RT-) PCRs και σύγκριση αυτών με τις αντίστοιχες RT-PCRs	83
3.2.3	Διαφοροποίηση του υποτύπου	84

	CCoVIIa από τον CCoVIIb και του υποτύπου CCoVIIb από τον TGEV με RT-PCR	
3.2.4	Παθολογοανατομικά ευρήματα	84
3.2.5	Ανίχνευση άλλων ιών στα ζώα με CCoV στα όργανα	87
3.2.6	Αλληλούχηση των προϊόντων και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών που περνούν τον εντερικό φραγμό	87
3.2.6.α	ORF2	89
3.2.6.β	ORF3	91
3.2.6.γ	ORF4	92
3.2.6.δ	ORF5	94
3.2.6.ε	ORF6	96
3.2.6.στ	ORF7	98
3.2.7	Απομόνωση στελεχών του CCoV σε κυτταροκαλλιέργειες, έμμεσος ανοσοφθορισμός και τιτλοποίηση του ιού	99
E	Συμπεράσματα	103
ΣΤ	Βιβλιογραφία	120
Z	Παράρτημα	137
	Βιογραφικό Σημείωμα	193

**ΑΛΦΑΒΗΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΩΝ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ ΠΟΥ
ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΟ ΚΕΙΜΕΝΟ**

CAV (Canine adenovirus)	Αδενοϊός του σκύλου
CCoV (Canine coronavirus)	Κοροναϊός του σκύλου
CDV (Canine distemper virus)	Ιός της νόσου του Carré
CPV (Canine parvovirus)	Παρβοϊός του σκύλου
CRCoV (Canine respiratory coronavirus)	Αναπνευστικός κοροναϊός του σκύλου
ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	Δοκιμή ELISA
FCoV (Feline coronavirus)	Εντερικός κοροναϊός της γάτας
FIP (Feline Infectious Peritonitis)	Λοιμώδης περιτονίτιδα της γάτας
MEM (Minimum Essential Medium)	MEM (δεν μεταφράζεται)
ORF (Open Reading Frame)	Ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο
PBS (Phosphate Buffer Saline)	Ισότονο διάλυμα αλάτων
PCR (Polymerase Chain Reaction)	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RT (Reverse Transcription)	Αντίστροφη μεταγραφή
TGEV (Transmissible Gastroenteritis Virus)	Ιός της μεταδοτικής γαστρεντερίτιδας του χοίρου

ΚΟΡΟΝΑΪΟΣ ΤΟΥ ΣΚΥΛΟΥ
(Canine Corona Virus, CCoV).
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ

ΝΤΑΦΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

*Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο
Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο
Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα, [email: efxil@aua.gr](mailto:efxil@aua.gr)*

A. Περίληψη

Ο κοροναϊός του σκύλου (*canine coronavirus*, CCoV) θεωρείται ένας από τους κύριους αιτολογικούς παράγοντες οξείας διάρροιας των σκύλων, ιδιαίτερα των νεαρών. Αποτέλεσμα της έντονης γενετικής ποικιλομορφίας που χαρακτηρίζει τον εν λόγω ιό ήταν η εμφάνιση δύο ξεχωριστών τύπων κοροναϊού, του τύπου I και του τύπου II. Πρόσφατα, ο τύπος II χωρίστηκε σε δύο νέους υποτύπους, τον IIa, στον οποίο κατατάσσονται τα κλασικά στελέχη και τον IIb, στον οποίο ανήκουν στελέχη που αναδύθηκαν μετά από ανασυνδυασμό με τον ιό της μεταδοτικής γαστρεντερίτιδας του χοίρου. Τα τελευταία χρόνια ανιχνεύθηκαν στελέχη ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να διαπερνούν τον εντερικό φραγμό, προκαλώντας συστηματική μόλυνση στα ζώα. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της παρουσίας του κοροναϊού του σκύλου στην Ελλάδα, ο μοριακός χαρακτηρισμός των στελεχών που κυκλοφορούν, καθώς και η διαπίστωση της ύπαρξης στελεχών που ανιχνεύονται στα ζώα πέραν του εντερικού επιθηλίου. Για το σκοπό αυτό διενεργήθηκε δειγματοληψία κοπράνων και οργάνων από σκύλους με οξεία διάρροια από το Δεκέμβρη του 2007, η οποία διάρκεσε δύο χρόνια. Τα δείγματα προέρχονταν από κυνοκομεία, καταστήματα πώλησης ζώων συντροφιάς και κλινικές ζώων. Η εξέταση των δειγμάτων έγινε με χρήση των μεθόδων RT-PCR και real time (RT-) PCR με στόχο την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό του CCoV στα κόπρανα και τα όργανα των σκύλων. Παράλληλα, με αλληλούχηση τμημάτων του γονιδιώματος του ιού, έγινε μοριακή και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών. Το ποσοστό του CCoV που ανιχνεύθηκε σε ζώα με οξεία διάρροια ήταν υψηλό (65,05%). Ο ιός ανιχνεύθηκε, επίσης, στο 77,34% των σκύλων που διαβιούσαν ομαδικά και στο 55,13% των σκύλων που διαβιούσαν ατομικά. Σε σκύλους ηλικίας κάτω των 3 μηνών ανιχνεύτηκε στο 73,63% αυτών, ενώ σε σκύλους ηλικίας 3 μηνών και άνω στο 58,26%. Μετά από το μοριακό χαρακτηρισμό των ιών διαπιστώθηκε η

παρουσία των δύο τύπων και των δύο υποτύπων στην Ελλάδα. Στην πλειοψηφία των θετικών ζώων ανιχνεύθηκαν μεικτές μολύνσεις (47,01%), με παρόντες περισσότερους του ενός τύπους ή υποτύπους. Παράλληλα διαπιστώθηκε η παραλλακτικότητα μεταξύ των στελεχών καθώς και η ύπαρξη ενός στελέχους που προέρχονταν από ανασυνδυασμό μεταξύ των δύο τύπων (THr/85/08). Επιπλέον, σε τρεις σκύλους ανιχνεύθηκαν στελέχη που διαπερνούν τον εντερικό φραγμό, ένα εκ των οποίων χαρακτηρίστηκε ως CCoVIIa (NA/09) και δύο ως CCoVIIb (66/09, 68/09). Τα δύο CCoVIIb στελέχη απομονώθηκαν στη συνεχή κυτταρική σειρά A72. Από τη συγκεκριμένη μελέτη γίνεται εμφανής η παρουσία και η συχνότητα με την οποία εμφανίζεται ο CCoV σε ζώα με οξεία διάρροια στην Ελλάδα. Επιπλέον, υποδηλώνεται η συχνότερη εμφάνισή του σε ζώα που διαβιούν ομαδικά, καθώς και σε κουτάβια. Παράλληλα, από το χαρακτηρισμό αποδεικνύεται η συχνή εμφάνιση μεικτών μολύνσεων στην Ελλάδα και η συμμετοχή σε αυτές όλων των πιθανών συνδυασμών των τύπων και των υποτύπων του CCoV, με τις I/IIa/IIb μολύνσεις, να αναφέρονται για πρώτη φορά διεθνώς. Τα ελληνικά στελέχη εμφανίζουν έντονη παραλλακτικότητα, με τη μεγαλύτερη να αφορά στον τύπο I. Επιπλέον, έγινε σαφής η παρουσία αποκλίνοντος (ED/99/08/GR) αλλά και ανασυνδυασμένου (THr/85/08) στελέχους, ενισχύοντας τη θεωρία της έντονης γενετικής εξέλιξης και ποικιλομορφίας των κοροναϊών. Τέλος, διαπιστώθηκε η παρουσία στελεχών που διαπερνούν τον εντερικό φραγμό και στην Ελλάδα, τα οποία ομοιάζουν σε υψηλό ποσοστό με τα στελέχη αναφοράς. Για πρώτη φορά γίνεται ανίχνευση στελέχους του CCoVIIa στο πάγκρεας και στην καρδιά, ενώ όσον αφορά στα CCoVIIb στελέχη, παρουσιάζεται αναλυτικά για πρώτη φορά η κατανομή τους στα όργανα. Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων TGEV-like στελεχών, δίνει τη δυνατότητα περαιτέρω έρευνας, σχετικά με την παθογένεια, καθώς και την κάλυψη των ζώων έναντι αυτών, μετά από χρήση του εμπορικού εμβολίου.

Λέξεις κλειδιά: Κοροναϊός, σκύλος, CCoV, μοριακός χαρακτηρισμός, Ελλάδα

**Canine Corona Virus (CCoV).
SURVEY OF THE PRESENCE AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION IN GREECE**

ΝΤΑΦΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

*Faculty of Animal Science and Aquaculture, Department of Anatomy and
Physiology of Farm Animals ,Agricultural University of Athens, Iera Odos 75,
118 55, Athens, [email: efxil@aua.gr](mailto:efxil@aua.gr)*

B. Abstract

Canine coronavirus (CCoV), is an aetiological agent of acute diarrhoea in dogs and especially puppies. Due to the genetic variability, nowadays CCoV is classified in two distinct types, type I and II. Moreover, recently, type II was divided in two new subtypes, encompassing the classical strains (CCoVIIa) and the new strains, emerging as a result of recombination among CCoV and transmissible gastroenteritis virus (CCoVIIb). In addition, during the last years, strains with the ability to trespass the intestinal tract, causing systemic infection, have been detected. The aim of the present study was to investigate the presence of CCoV in Greece, to characterize the circulating strains and to investigate the presence of strains detected in the organs. Sampling took place during December of 2007 and December of 2009, collecting faecal and organ samples from dogs presenting acute diarrhoea. Samples were collected from kennels, pet shops and veterinary clinics. RT-PCR and real time (RT-) PCR were used for CCoV detection and characterization. In addition, molecular and phylogenetic analysis took place after sequencing parts of the strains' genome. CCoV was detected in 65.05% of the animals presenting acute diarrhoea. Moreover, CCoV was detected in 77.34% of the animals living in groups and in 55.13% of the single housed animals, as well as in 73.63% of the dogs, younger than 3 months old and in 58.26% of the elder animals. Both types and subtypes of CCoV were present in Greece, with mixed infections being present in the 47.01% of the CCoV detection. In addition, the variability among strains, as well as the detection of a recombinant, type I-type II strain (THr/85/08) were shown. In three puppies, one CCoVIIa (NA/09) and two CCoVIIb (66/09, 68/09) strains were detected in the organs. The two CCoVIIb strains were isolated in the cell line A72. In the present study, the presence and frequency of CCoV in dogs with acute diarrhoea in Greece were demonstrated, as well as the more frequent detection of CCoV in animals living in groups and in

puppies. Moreover, it was shown that mixed CCoV infections prevail, with I/IIa/IIb, detected for the first time. Greek strains manifested significant variability, especially regarding CCoV type I. In addition, the detection of a divergent (ED/99/08/GR) and a recombinant (THr/85/08) strain stands by the theory of intense genetic evolution and variability of coronaviruses. Finally, the three strains detected in the organs, resembling the reference strains, revealed that such strains, of possible high virulence are also present in Greece. Detection of CCoVIIa in the pancreas and the heart, as well as the distribution of CCoVIIb strains in different organs were demonstrated for the first time. The isolation of the two TGEV-like strains of puppies offers the opportunity of further investigation, regarding the pathogenesis of CCoVIIb strains and the protection the commercial vaccine offers.

Key words: Coronavirus, dog, CCoV, molecular characterization, Greece

Γ. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΚΟΡΟΝΑΪΟΣ ΤΟΥ ΣΚΥΛΟΥ

1.1.1 Ταξινόμηση

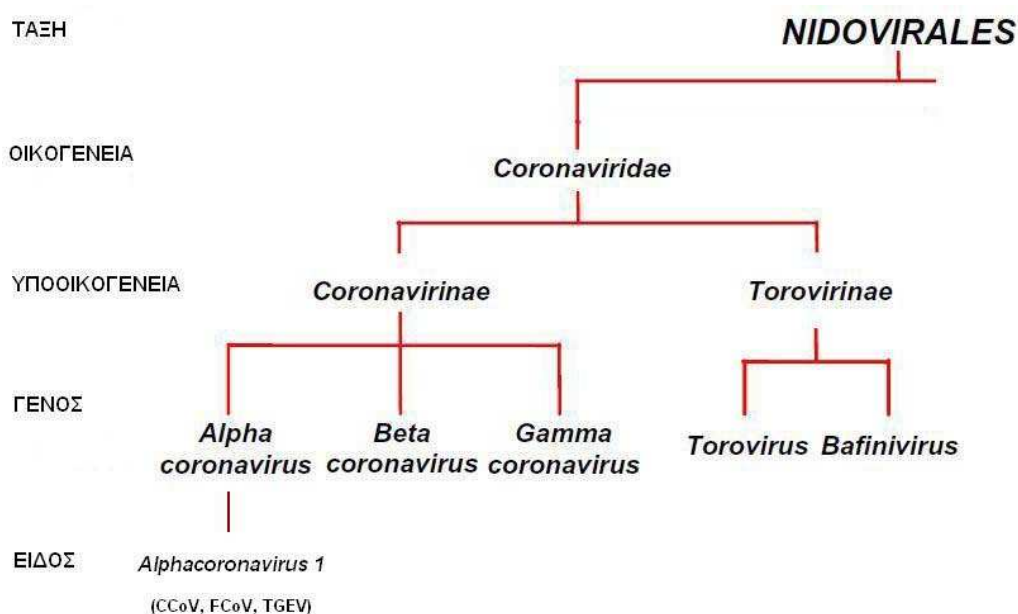
Ο κοροναϊός του σκύλου (*Canine Coronavirus*, CCoV), ανήκει στην τάξη *Nidovirales* και στην οικογένεια *Coronaviridae*. Μέχρι τελευταία ταξινομούταν στην οροομάδα 1 του γένους *Coronavirus* (Enjuanes et al., 2000). Λόγω όμως πρόσφατης αλλαγής στην ταξινόμηση της τάξης *Nidovirales*, ο κοροναϊός του σκύλου κατατάσσεται στην υποοικογένεια *Coronavirinae* και στο γένος *Alphacoronavirus* (Carstens, 2010).

Η υποοικογένεια *Coronavirinae* περιλαμβάνει 3 γένη, τα: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* και *Gammacoronavirus*, στα οποία κατατάσσονται τα γνωστά είδη των κοροναϊών (Carstens, 2010). Η ταξινόμηση των ειδών γίνεται βάση του ξενιστή, των αντιγονικών ιδιοτήτων και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδιώματος κάθε είδους (Enjuanes et al., 2000; Lai and Holmes, 2001). Το γένος *Alphacoronavirus* περιλαμβάνει τον κοροναϊό 229E του ανθρώπου (HCoV-229E), τους ιούς της μεταδοτικής γαστρεντερίτιδας (*Transmissible gastroenteritis virus*, TGEV) και της επιδημικής διάρροιας του χοίρου (*Porcine epidemic diarrhea virus*, PEDV) τον εντερικό κοροναϊό της γάτας (*Feline coronavirus*, FCoV), τον ιό της λοιμώδους περιτονίτιδας της γάτας (*Feline infectious peritonitis virus*, FIPV) και τον κοροναϊό του σκύλου (*Canine coronavirus*, CCoV). Στο γένος *Betacoronavirus* κατατάσσονται ο ιός της ηπατίτιδας των τρωκτικών (*Murine hepatitis virus*, MHV), ο κοροναϊός των βοοειδών (*Bovine coronavirus*, BCoV), ο αναπνευστικός κοροναϊός του σκύλου (*Canine respiratory coronavirus*, CRCoV) και ο κοροναϊός του σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου του ανθρώπου (*Severe acute respiratory syndrome, SARS-related coronavirus*), ενώ στο γένος *Gammacoronavirus* ταξινομείται ο κοροναϊός των πτηνών (*Avian coronavirus*) και ο κοροναϊός της φάλαινας Beluga (*Beluga Whale coronavirus*) (Enjuanes et al., 2000; Lai and Holmes, 2001; Woo et al., 2009; Carstens, 2010).

Η αντιγονική ομοιότητα μεταξύ του κοροναϊού του σκύλου και του ιού της μεταδοτικής γαστρεντερίτιδας του χοίρου διαπιστώθηκε από τα πρώτα ερευνητικά βήματα στο πεδίο αυτό (Binn et al., 1974; Garwes and Reynolds, 1981). Σήμερα, ο κοροναϊός του σκύλου θεωρείται αντιγονικά συγγενής με τον κοροναϊό της γάτας και

με τον ιό της μεταδοτικής γαστρεντερίτιδας του χοίρου, εξαιτίας κοινών επιτόπων στις πρωτεΐνες. Έτσι οι ανωτέρω τρεις ιοί σχηματίζουν μια στενά συγγενική αντιγονική ομάδα. Μάλιστα δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο να προέρχονται από κάποιο κοινό προγονικό ιό (Horzinek et al., 1982; Sanchez et al., 1990; Horsburg and Brown, 1993; Holmes, 2001). Λόγω της μεγάλης αυτής ομοιότητας (>96% σε επίπεδο αμινοξέων στην περιοχή της πολυμεράσης), η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee of Taxonomy of Viruses) πρότεινε πρόσφατα οι τρεις αυτοί ιοί να μη θεωρούνται διαφορετικό είδος, αλλά ποικιλίες του ίδιου είδους (*Alphacoronavirus 1*) με διαφορετικούς ξενιστές (Εικόνα 1) (de Groot et al., 2009; Carstens, 2010).

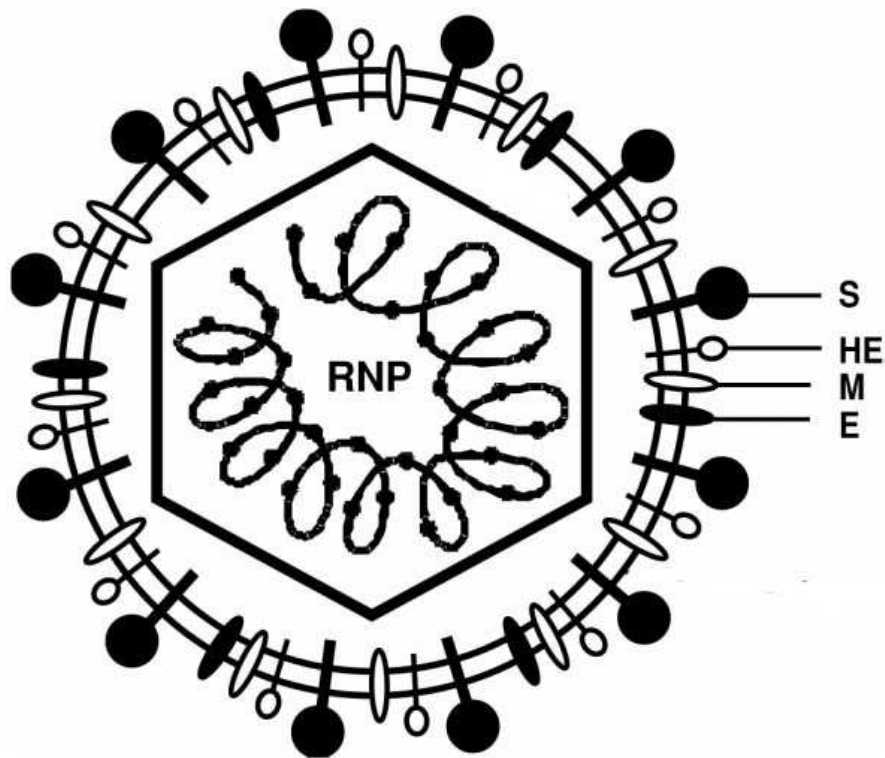
Θα πρέπει να επισημανθεί ότι ο κοροναϊός του σκύλου (CCoV) που κατατάσσεται στο γένος *Alphacoronavirus*, τόσο μοριακά όσο και αντιγονικά, είναι διαφορετικός από τον αναπνευστικό κοροναϊό του σκύλου (CRCoV), ο οποίος κατατάσσεται στο γένος *Betacoronavirus* και δεν απασχολεί την παρούσα μελέτη (Erles and Brownlie, 2008).



Εικόνα 1. Ταξινόμηση του κοροναϊού του σκύλου

1.1.2 Μορφολογία και δομή

Τα σωματίδια του κοροναϊού του σκύλου είναι πλειομορφικά, στρογγυλά έως ελλειψοειδή, με μέσο μέγεθος που κυμαίνεται από 80 nm έως 200 nm (Takeuchi et al., 1976). Έχουν την τυπική μορφολογία των κοροναϊών, η ονομασία των οποίων προέρχεται από τη λατινική λέξη corona (στέμμα), λόγω της μορφής που εμφανίζουν κατά την παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διερχόμενης δέσμης ηλεκτρονίων με αρνητική χρώση. Τα ιικά σωματίδια αποτελούνται από το νουκλεοκαψίδιο και το περίβλημα. Το νουκλεοκαψίδιο είναι ελικοειδές και σε μερικούς κοροναϊούς περιβάλλεται από πυρήνα εικοσαεδρικής συμμετρίας (Balasuriya and Stott, 2004). Το νουκλεοκαψίδιο απαρτίζεται από το γονιδιακό RNA και τη φωσφοπρωτεΐνη N. Ο πυρήνας του σωματιδίου του ιού συγκροτείται από τη γλυκοπρωτεΐνη M, πιθανώς όμως συμμετέχει και η φωσφοπρωτεΐνη N. Εξωτερικά του πυρήνα παρατηρείται το λιποπρωτεϊνικό περίβλημα, που αποτελείται από 3 γλυκοπρωτεΐνες, τις: S, M και E. Η γλυκοπρωτεΐνη S σχηματίζει προεξοχές (πεπλομερή) στην επιφάνεια του περιβλήματος, μήκους 20nm και σχήματος ροπάλου. Η γλυκοπρωτεΐνη M εκτείνεται από άκρο σε άκρο της διπλής στοιβάδας λιπιδίων, ενώ η γλυκοπρωτεΐνη E υπάρχει σε μικρές ποσότητες. Σε μερικούς κοροναϊούς, όπως σε εκείνον των βοοειδών (BCoV) και στον αναπνευστικό κοροναϊό του σκύλου (CRCoV), υπάρχει επίσης η γλυκοπρωτεΐνη HE (αιμοσυγκολλητίνη - εστεράση) που σχηματίζει βραχείες προεξοχές στην επιφάνεια του περιβλήματος (Εικόνα 2). Ωστόσο, ο κοροναϊός του σκύλου και γενικά όλοι οι κοροναϊοί που ανήκουν στην πρώτη αντιγονική ομάδα (γένος *Alphacoronavirus*) δεν διαθέτουν την πρωτεΐνη HE (Lai and Holmes, 2001; Balasuriya and Stott, 2004).



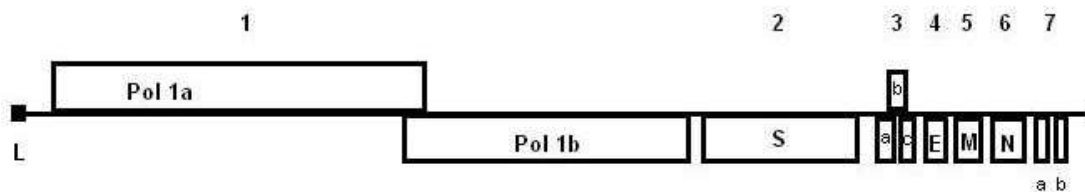
Εικόνα 2. Μορφολογία-δομή των κοροναϊών. Διακρίνονται εξωτερικά οι 4 πρωτεΐνες S, M, E και HE και εσωτερικά το νουκλεοκαψίδιο (RNP, RNA-nucleocapsid protein) (Lai and Holmes, 2001).

1.1.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Ο κοροναϊός του σκύλου αδρανοποιείται με λιποδιαλυτικές ουσίες (χλωροφόρμιο, αιθέρα), όπως επίσης με φορμαλίνη, φαινόλη, β-προπιολακτόνη και υποχλωριώδη διαλύματα (Appel, 1987; Balasuriya and Stott, 2004; Pratelli, 2008). Επιπλέον, θεωρείται οξεάντοχος ιός αφού ακόμη και σε pH 3 δεν αδρανοποιείται (Binn et al., 1974). Γενικά, οι κοροναϊοί αδρανοποιούνται στους 56 °C για 10' – 15', ενώ η μολυσματικότητά τους μπορεί να διατηρείται επί έτη, όταν συντηρούνται στους -70 °C. Ωστόσο, ο CCoV τείνει να χάνει τη μολυσματικότητά του ακόμα και στους 37 °C (Tennant et al., 1994). Έρευνα έδειξε ότι ο ιός αδρανοποιείται απόλυτα στους 56 °C μετά τα 60', στους 65 °C μετά τα 40' και σε ακραίες αλκαλικές τιμές pH (13,2) (Pratelli, 2008).

1.1.4 Το γονιδίωμα και οι πρωτεΐνες που αυτό κωδικοποιεί

Οι κοροναϊοί φέρουν ευθύγραμμο, θετικής πολικότητας, μονόκλωνο RNA μήκους 27,6-31 kb (Appel, 1987; Balasuriya and Stott, 2004). Στο 5' άκρο τους υπάρχει η 5'-cap αλληλουχία και ακολουθεί η αλληλουχία οδηγός (leader sequence, 65-98 νουκλεοτίδια) και η περιοχή UTR (untranslated region, 200-400 νουκλεοτίδια) που δεν μεταφράζεται. Στο 3'-άκρο υπάρχει μία άλλη UTR περιοχή (200-500 νουκλεοτίδια) και μία πολυ-A ομάδα. Το RNA του κοροναϊού του σκύλου περιέχει συνολικά 10 γονίδια, λειτουργεί ως mRNA και είναι μολυσματικό. Τα γονίδια στον κοροναϊό του σκύλου είναι οργανωμένα στη σειρά 5'-*Pol-S-E-M-N*-3', με μερικά άλλα γονίδια, που κωδικοποιούν μη δομικές πρωτεΐνες, να βρίσκονται διασκορπισμένα μεταξύ αυτών. Σε αντίθεση με τους περισσότερους κοροναϊούς, το γονιδίωμα τόσο του CCoV όσο και του FCoV χαρακτηρίζεται από την παρουσία 2 ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων (open reading frames, ORFs) μετά το γονίδιο N, τα 7a και 7b (Εικόνα 3) (Enjuanes et al., 2000; Homes, 2001; Lai and Holmes, 2001).

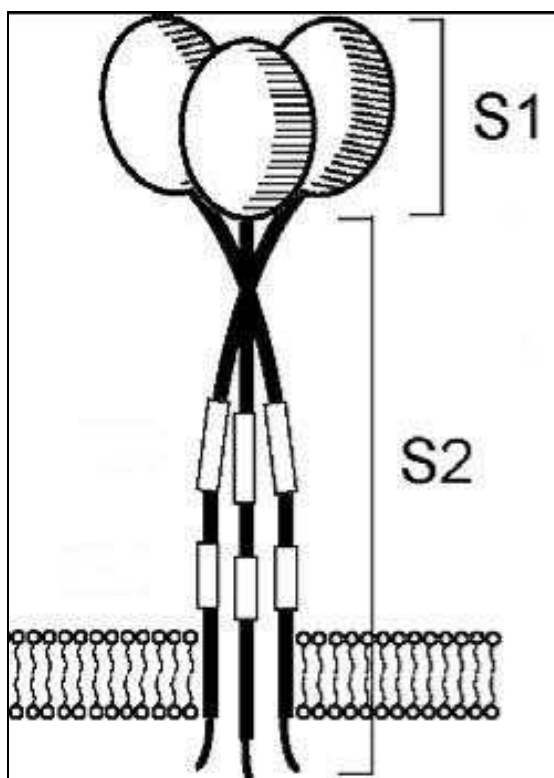


Εικόνα 3. Το γονιδίωμα του CCoV. Τα νούμερα υποδεικνύουν τα mRNA. Διακρίνεται από αριστερά η αλληλουχία οδηγός (L), το γονίδιο της πολυμεράσης καθώς και τα γονίδια των δομικών (S, E, M, N) και μη δομικών πρωτεϊνών (3a, 3b, 3c, 7a, 7b).

Το γονίδιο *pol* καταλαμβάνει τα δύο τρίτα του γονιδιώματος και αποτελείται από δύο ORFs, τα 1a και 1b, τα οποία αλληλεπικαλύπτονται για κάποια νουκλεοτίδια. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί μία RNA-εξαρτημένη RNA πολυμεράση (Enjuanes et al., 2000; Holmes, 2001).

Το γονίδιο *S* κωδικοποιεί τη γλυκοπρωτεΐνη *S*. Πρόκειται για μεγάλη πρωτεΐνη, η οποία στους διάφορους κοροναϊούς απαρτίζεται από 1160-1453 αμινοξέα και κατέχει κεντρικό ρόλο στη βιολογία και την παθογένειά τους. Είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση του ιού με τους υποδοχείς του κυττάρου, για την πρόκληση

αιμοσυγκόλλησης και τη συγχώνευση μεμβρανών κυττάρου-ιού, καθώς και για την παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Εξουδετερωτικά αντισώματα αλλά και κυτταρικά επαγόμενη κυτταροτοξικότητα στρέφονται έναντι επιτόπων της γλυκοπρωτεΐνης S. Γενικά, η γλυκοπρωτεΐνη S αποτελεί το κυρίαρχο αντιγόνο που εμπλέκεται στην εξουδετέρωση του ιού από την άμυνα του οργανισμού. Ιδιαίτερα το σφαιρικό της τμήμα (S1 υποπεριοχή στο N-άκρο του μορίου της) περιέχει κύριους επιτόπους για τη διέγερση της χυμικής και της κυτταρικής ανοσίας (Εικόνα 4). Ωστόσο, λόγω του ότι η συγκεκριμένη περιοχή εμφανίζει υψηλή παραλλακτικότητα, επιτρέπει παράλληλα τη διαφυγή στελεχών του ιού από τους μηχανισμούς της ανοσίας (Balasuriya and Stott, 2004; Enjuanes et al., 2000; Lai and Holmes, 2001).



Εικόνα 4. Η πρωτεΐνη S. Διακρίνεται το σφαιρικό τμήμα S1 (αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης) και το S2 (καρβοξυτελικό άκρο) (Masters, 2006).

Το γονίδιο M κωδικοποιεί την αντίστοιχη γλυκοπρωτεΐνη M. Η γλυκοπρωτεΐνη αυτή είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, αποτελείται από 225-260

αμινοξέα και είναι η πιο άφθονη σε ποσότητα πρωτεΐνη του ιικού σωματιδίου. Από το μόριό της, μόνο ένα πολύ μικρό αμινοτελικό τμήμα βρίσκεται εκτεθειμένο στο εξωτερικό του περιβλήματος. Είναι εκείνη που υποκινεί τη συγκρότηση των ικών σωματιδίων, σε συνεργασία με τη φωσφοπρωτεΐνη N, ενώ παράλληλα καθορίζει τα σημεία εκβλάστησης των απόγονων σωματιδίων. Προκαλεί την παραγωγή ιντερφερόνης-α καθώς και αντισωμάτων. Τα αντισώματα έναντι της M πρωτεΐνης εξουδετερώνουν τον ιό, παρουσία του συμπληρώματος (Spaan et al., 1988; de Haan et al., 2000; Enjuanes et al., 2000; Lai and Holmes, 2001; Balasuriya and Stott, 2004; Masters, 2006).

Το γονίδιο E κωδικοποιεί την πιο μικρού μεγέθους πρωτεΐνη του περιβλήματος (80-109 αμινοξέα), την πρωτεΐνη E. Βρίσκεται σε μικρότερες ποσότητες στο ικό σωματίδιο, σε σχέση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του περιβλήματος. Είναι απαραίτητη (με τη βοήθεια της πρωτεΐνης M) για τη συγκρότηση των ικών σωματιδίων (Raamsman, 1999; Enjuanes et al., 2000; Lai and Holmes, 2001; Masters, 2006).

Το γονίδιο N κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου (377-455 αμινοξέα). Η εν λόγω πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της σύνθεσης του ιικού RNA, καθώς και για τη συγκρότηση και το σχηματισμό του ελικοειδούς νουκλεοκαψιδίου. Έναντι της πρωτεΐνης N παράγονται αντισώματα, ενώ σημειώνεται ότι η πιο αποτελεσματική παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων επιτυγχάνεται με την αντιγονική διέγερση μέσω των πρωτεϊνών N και S. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι μέσω της συγκεκριμένης πρωτεΐνης διεγείρεται η κυτταρική ανοσία (Spaan et al., 1988; Enjuanes et al., 2000; Lai and Holmes, 2001; Balasuriya and Stott, 2004).

Τέλος, υπάρχουν και μη δομικές πρωτεΐνες (3a, 3b, 3c, 7a και 7b) που κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια, με τις λειτουργίες των περισσότερων να παραμένουν άγνωστες. Τα γονίδια αυτά δεν φαίνεται να είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό των κοροναϊών σε κυτταροκαλλιέργειες. Αντιθέτως, η έκφρασή τους φαίνεται να έχει αρνητική επίδραση στην προσαρμογή των ιών *in vitro*. Ωστόσο η απώλεια των συγκεκριμένων γονιδίων έχει γενικά συνδεθεί με απώλεια της μολυσματικότητας των ιών για τους ξενιστές τους (de Haan et al., 2002; Lissenberg et al., 2005; Ortego et al., 2008; Woods, 2001).

1.1.5 Πολλαπλασιασμός - αντιτύπωση του ιού

Για τον πολλαπλασιασμό του κοροναϊού του σκύλου, όπως και για όλους τους ιούς που προσβάλλουν τα σπονδυλωτά, σημαντικό στάδιο αποτελεί η σύνδεση των ιικών σωματιδίων με τη μεμβράνη των κυττάρων του ξενιστή. Οι υποδοχείς των κυτταρικών μεμβρανών και η δυνατότητα σύνδεσης αυτών με την πρωτεΐνη S, είναι οι παράγοντες που καθορίζουν τον τροπισμό του ιού.

Ο υποδοχέας για την προσκόλληση του κοροναϊού του σκύλου στο κύτταρο-ξενιστή είναι η συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη αμινοπεπτιδάση N (aminopeptidase N, APN). Η APN εντοπίζεται πολύ συχνά στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και θεωρείται ότι είναι ο υποδοχέας για τους ιούς TGEV, FCoV, FIPV και CCoV (Delmas et al., 1992; Benbaccer et al., 1997). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η APN (fAPN) της γάτας, η οποία μπορεί και λειτουργεί ως υποδοχέας και για τους τέσσερις ιούς, υποδηλώνοντας ότι κάποιος κοινός πρόγονός τους μπορεί να ήταν ένας κοροναϊός, που χρησιμοποιούσε τον συγκεκριμένο υποδοχέα (Lai and Holmes, 2001; Tresnan et al., 1996).

Μετά την προσκόλληση του ιού στον υποδοχέα του, ακολουθεί η διείσδυση του στο εσωτερικό του κυττάρου και η απέκδυση. Όσον αφορά στην είσοδο των κοροναϊών, φαίνεται να κυριαρχούν δυο θεωρίες (συγχώνευση ιικού περιβλήματος με την κυτταροπλασματική μεμβράνη ή ενδοκύττωση), στις οποίες κύριο ρόλο κατέχει η πρωτεΐνη S. Και στις δύο περιπτώσεις, παρατηρείται συγχώνευση του περιβλήματος του ιού, είτε με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, είτε με τις μεμβράνες ενδοσωμάτων που σχηματίστηκαν μετά από την ενδοκύττωσή του. Τη συγχώνευση του περιβλήματος ακολουθεί η απέκδυση και η απελευθέρωση του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα (Lai and Holmes, 2001; Masters, 2006).

Οι κοροναϊοί πολλαπλασιάζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Μετά την απελευθέρωση του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα, αυτό χρησιμοποιείται για τη σύνθεση της RNA-εξαρτημένης RNA πολυμεράσης, που θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταγραφή των ιικών mRNAs (Enjuanes et al., 2000). Χαρακτηριστικό των κοροναϊών αποτελεί η τμηματική παραγωγή υπογονιδιωματικών mRNAs, διαφορετικού μεγέθους με όμοιο 3'-άκρο και διαφορετικό σε έκταση 5'-άκρο, τα οποία σχηματίζουν ομάδες. Υπάρχει ένα υπογονιδιωματικό mRNA για κάθε γονίδιο του ιού, με εξαίρεση το πρώτο γονίδιο που εκφράζεται απευθείας από το

γονιδιωματικό RNA. Παρά το γεγονός ότι όλα τα mRNAs περιέχουν περισσότερα από ένα ORF (με εξαίρεση το μικρότερο από αυτά που περιέχει 1 ORF), καθένα από αυτά οδηγεί στη μετάφραση μόνο του πλησιέστερου, στο 5' άκρο, ORF (λειτουργικώς μονοκιστρονικά). Κάθε mRNA έχει στο 5' άκρο μία αλληλουχία οδηγό (leader sequence) μήκους 65-98 βάσεων, όμοια με την αλληλουχία στο 5' άκρο του γονιδιωματικού RNA. Παρ' όλο που η αλληλουχία αυτή δεν βρίσκεται πουθενά αλλού στο γονιδίωμα του ιού, οι διαγονιδιακές αλληλουχίες (intergenic sequences) που σχετίζονται με τη μεταγραφή, εμφανίζουν ομολογία 7-18 νουκλεοτιδίων με το 3'-άκρο της αλληλουχίας οδηγό (Siddell et al., 1983; Spaan et al., 1988; Enjuanes et al., 2000; Holmes, 2001; Lai and Holmes, 2001; Masters, 2006).

Μετά την απέκδυση του ιού, το γονιδιωματικό RNA μεταγράφεται πρώτα σε αρνητικής πολικότητας RNA, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως εκμαγείο (template) για τη σύνθεση των mRNAs και του γονιδιωματικού RNA. Πάνω στο μηχανισμό σύνθεσης και στις λειτουργίες των mRNAs και του γονιδιωματικού RNA υπάρχει διχογνωμία, με 2 θεωρίες να κυριαρχούν, εκείνη της *leader-primed μεταγραφής* και εκείνη της *μη συνεχούς μεταγραφής κατά τη σύνθεση αρνητικής πολικότητας RNA*. Η σύνθεση του RNA λαμβάνει χώρα πάνω σε μεμβρανώδεις δομές που σχετίζονται με το ενδοπλασματικό δικτυωτό και τη συσκευή Golgi του μολυσμένου κυττάρου (Enjuanes et al., 2000; Lai and Holmes, 2001; Masters, 2006).

Από τις πρωτεΐνες του ιού, η πολυμεράση είναι αυτή που παράγεται πρώτη μετά την απέκδυση του ιού, με σκοπό τον πολλαπλασιασμό του ιικού RNA. Η πολυμεράση προέρχεται από την πολυπρωτεΐνη 1a και 1b και συντίθεται από τα αντίστοιχα ORFs. Η πολυμεράση και διάφορες άλλες πρωτεΐνες αποτελούν προϊόντα πρωτεόλυσης της πολυπρωτεΐνης, από τις ίδιες τις πρωτεάσες που εμπεριέχει. Η πρωτεΐνη S, μετά τη σύνθεσή της, εισέρχεται στο ενδοπλασματικό δικτυωτό, γλυκοσυλιώνεται και σχηματίζει τριμερή. Στη συνέχεια συγκεντρώνεται στη συσκευή Golgi, όπου συμμετέχει στη συγκρότηση των ικών σωματιδίων, ενώ ένα μικρό ποσοστό της μεταφέρεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, όπου είναι πιθανό να προκαλεί συγχώνευση κυττάρων-ιού. Αντίστοιχα και η πρωτεΐνη M ακολουθεί το ίδιο κυτταρικό μονοπάτι, χωρίς ωστόσο η ίδια να ανευρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η πρωτεΐνη N συντίθεται σε ελεύθερα πολυσώματα, φωσφορυλιώνεται στο κυτταρόπλασμα και εντοπίζεται σε μεμβράνες του κυττάρου, ενώ η πρωτεΐνη E μετά τη σύνθεσή της εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα, αλλά

και στην επιφάνεια του κυττάρου (Siddell et al., 1983; Holmes, 2001; Lai and Holmes, 2001).

Κατά τη συγκρότηση του ιικού σωματιδίου, αρχικά λαμβάνει χώρα η δημιουργία του νουκλεοκαψιδίου από την πρωτεΐνη N και το γονιδιωματικό RNA. Επιπλέον, είναι απαραίτητες οι πρωτεΐνες M και E και η αλληλεπίδραση, τόσο μεταξύ τους όσο και με το νουκλεοκαψίδιο. Η εκβλάστηση των ιικών σωματιδίων λαμβάνει χώρα στο αντίστοιχο τμήμα (budding compartment) ανάμεσα στο ενδοπλασματικό δικτυωτό και τη συσκευή Golgi, αποκτώντας τη λιπιδική τους στιβάδα από το τμήμα αυτό και όχι από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αφού ενσωματωθεί και η πρωτεΐνη S, τα ιικά σωματίδια εισέρχονται στη συσκευή Golgi, όπου και υφίστανται τις τελικές μορφολογικές αλλαγές. Στη συνέχεια συσσωρεύονται σε κυστίδια με λείο τοίχωμα και απελευθερώνονται από το κύτταρο μετά από συγχώνευση των κυστιδίων με την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Takeuchi et al., 1976; Appel, 1987; Lai and Holmes, 2001).

1.1.6 *In vitro* καλλιέργεια του ιού

Ο κοροναϊός του σκύλου πολλαπλασιάζεται σε διάφορες κυτταρικές σειρές, οι οποίες προέρχονται από σκύλο ή γάτα. Κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειες από νεφρό ή θύμο σκύλου, καθώς και διάφορες συνεχείς κυτταρικές σειρές, όπως η A72 (από ινοσάρκωμα σκύλου), η fcwf-4 (felis cutus whole fetus-4) και η CRFK (Crandall Feline Kidney). Η κυτταροπαθογόνος δράση του ιού μπορεί να είναι πρόσκαιρη, χωρίς να είναι πάντα εμφανής. Η σειρά A72 θεωρείται εκλογής, αφού σε αυτή εκδηλώνεται πιο σταθερά η δράση του ιού. Κατά τον πολλαπλασιασμό του CCoV *in vitro* προκαλείται νέκρωση των μολυσμένων κυττάρων μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης (Ruggieri et al., 2007). Το κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα δεν είναι σαφώς καθορισμένο και εξαρτάται τόσο από το στέλεχος, όσο και από τον τίτλο του ιού. Μπορεί να εμφανίζονται μεγάλα, παράξενου σχήματος κύτταρα, συγκύτια, στρογγυλεμένα και συρρικνωμένα κύτταρα που χάνουν την επαφή τους με τα γειτονικά ή τέλος αποκόλληση του ταπητίου που σχηματίζουν τα κύτταρα, κατά εστίες. Με χρήση μάλιστα ημίρρευστου καλλιεργητικού μέσου, παρατηρείται ο σχηματισμός πλακών (Appel, 1987; Bandai et al., 1999;).

1.1.7 Γενετική ποικιλομορφία και εξέλιξη

Τρεις φαίνεται να είναι οι κινητήριες δυνάμεις που οδηγούν στην εμφάνιση μεγάλης γενετικής ποικιλομορφίας στους κοροναϊούς: η έλλειψη πιστότητας και διόρθωσης που χαρακτηρίζει την RNA-εξαρτημένη RNA πολυμεράση και οδηγεί στην εμφάνιση μεταλλάξεων, οι ανασυνδυασμοί που παρατηρούνται κυρίως εξαιτίας του τρόπου πολλαπλασιασμού των κοροναϊών και τέλος το εξαιρετικά μεγάλο γονιδίωμά τους (Woo et al., 2009).

Μία από τις πολύ ενδιαφέρουσες απόψεις, σχετικά με τη γενετική ποικιλομορφία και εξέλιξη των κοροναϊών, είναι ότι εξαιτίας της υψηλής συχνότητας σφαλμάτων της RNA πολυμεράσης πολύ συχνά λαμβάνουν χώρα μεταλλάξεις στο ιικό RNA. Η συσσώρευση σημειακών μεταλλάξεων, απαλείψεων και προσθηκών στο γονιδίωμα αποτελεί κυρίαρχη δύναμη εξέλιξης των RNA ιών γενικά, οδηγώντας στην εμφάνιση νέων στελεχών, οροτύπων ή ακόμα και υποτύπων. Στους ιούς μάλιστα με μεγάλο RNA γονιδίωμα, όπως οι κοροναϊοί, είναι λογικό να συσσωρεύονται αρκετές σημειακές μεταλλάξεις, λόγω των σφαλμάτων της πολυμεράσης, σε κάθε πολλαπλασιασμό (Jarvis and Kirkegaard, 1991). Τα ευαίσθητα στη θερμοκρασία και τα μεταλλαγμένα εξαιτίας απάλειψης στελέχη φαίνεται να είναι πολύ συνηθισμένα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο αναπνευστικός κοροναϊός του χοίρου (PRCoV), ιός που προσβάλλει το αναπνευστικό σύστημα των χοίρων, προέρχεται από τον ιό της μεταδοτικής γαστρεντερίτιδας του χοίρου (TGEV). Υπεύθυνη για την εμφάνιση του PRCoV είναι κυρίως μία μεγάλη μετάλλαξη στο γονίδιο S, εξαιτίας απάλειψης (Holmes, 2001; Lai and Holmes, 2001).

Για τη γενετική ποικιλομορφία των κοροναϊών, υπεύθυνο είναι επίσης το φαινόμενο του γενετικού ανασυνδυασμού, παρά το γεγονός ότι αυτό δεν είναι πολύ συνηθισμένο σε RNA ιούς με ενιαίο γονιδίωμα (Lai, 1992; Worobey and Holmes, 1999). Η υψηλή συχνότητα ανασυνδυασμών που παρατηρείται, αποδίδεται στον τρόπο πολλαπλασιασμού των κοροναϊών (Sraan et al., 1988). Πράγματι, στους κοροναϊούς έχουν παρατηρηθεί ανασυνδυασμοί κατά την καλλιέργειά τους σε κύτταρα (Sanchez et al., 1999; Kuo et al., 2000) και σε εμβρυοφόρα αυγά (Kottier et al., 1995), καθώς και κατά την πειραματική μόλυνση ζώων (Keck et al., 1988). Ανασυνδυασμοί έχουν παρατηρηθεί και στη φύση, όπως στον κοροναϊό της γάτας

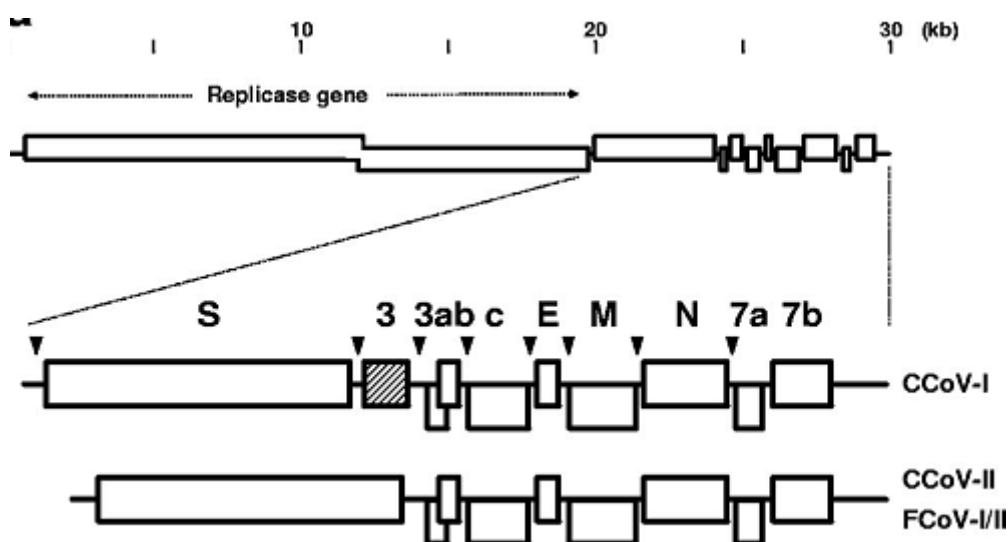
(FCoV) (Enjuanes et al., 2000; Holmes, 2001; Lai and Holmes, 2001). Ο FCoV χωρίζεται σήμερα σε δύο τύπους, τον τύπο I και τον τύπο II, με τον δεύτερο να αποτελεί προϊόν ανασυνδυασμού σε δύο σημεία ανάμεσα στον κλασικό FCoV (τύπο I) και στον CCoV (τύπο II) (Herrewegh, 1998).

Αίτιο για έρευνα πάνω στην ποικιλομορφία του κοροναϊού του σκύλου αποτέλεσαν σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο M στελεχών CCoV και αντικαταστάσεις αμινοξέων, με αποτέλεσμα οι αλληλουχίες που προέκυψαν να ομοιάζουν με εκείνες του κοροναϊού της γάτας (FCoV) (Pratelli et al., 2001a; Pratelli et al., 2002b). Οι συγκεκριμένες παρατηρήσεις οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν δύο γονότυποι CCoV, ο τύπος I και ο τύπος II, που συνθέτουν στενά συγγενικές ομάδες. Ο CCoV τύπος I, ο οποίος είναι αυτός που αναγνωρίστηκε επίσημα προσφάτως, αρχικά θεωρήθηκε ότι εξελίχθηκε παράλληλα με τον τύπο II και ότι δεν προέκυψε από ανασυνδυασμό μεταξύ του τύπου I του FCoV και του τύπου II του CCoV. Μάλιστα θεωρήθηκε πιθανό, τόσο ο FCoV όσο και CCoV τύπος I να προέκυψαν από έναν κοινό προγονικό κοροναϊό και μέσω ανασυνδυασμών να εξελίχθηκαν τελικά παράλληλα (Pratelli et al., 2003a; Pratelli et al., 2003b; Pratelli et al., 2004b).

Οι δύο τύποι του κοροναϊού του σκύλου χαρακτηρίζονται από διαφορετικές μοριακές και βιολογικές ιδιότητες. Στον τύπο I σε επίπεδο γονιδιώματος, τόσο σε τμήματα του γονιδίου της πολυμεράσης όσο και στο γονίδιο M, παρατηρούνται νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που ομοιάζουν με εκείνες του FCoV και διαφέρουν αρκετά από τις αντίστοιχες του κλασικού τύπου (τύπος II). Επιπλέον, στον CCoV τύπο I, αμέσως μετά το γονίδιο S, υπάρχει ένα επιπλέον ORF (ORF3), που κωδικοποιεί μία γλυκοπρωτεΐνη (gp3). Ωστόσο, η διαφορά μεταξύ των δύο τύπων γίνεται πιο αντιληπτή στο γονίδιο S με την ομοιότητα να αγγίζει μόλις το 61% σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Εντύπωση δε προκαλεί το γεγονός ότι στο γονίδιο S του τύπου I εντοπίζεται ένα πιθανό πρωτεολυτικό σημείο διάσπασης της αντίστοιχης πρωτεΐνης, το οποίο απουσιάζει από όλους τους κοροναϊούς που κατατάσσονται στο γένος *Alphacoronavirus* και εντοπίζεται, στην ίδια περίπου θέση, σε εκείνους των γενών *Betacoronavirus* και *Gammacoronavirus*. Οι δύο τύποι φαίνεται ότι διαφέρουν και αντιγονικά, λόγω της μεγάλης παραλλακτικότητας στην πρωτεΐνη S. Σε βιολογικό επίπεδο, αξίζει να αναφερθεί ότι ο CCoV τύπος I δεν έχει απομονωθεί ακόμα σε κυτταροκαλλιέργειες, δυσχεραίνοντας έτσι την έρευνα πάνω στην παθογένεια και στα

ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του (Pratelli et al., 2004b; Pratelli, 2006; Lorusso et al., 2008). Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι οι δύο τύποι του κοροναϊού του σκύλου είναι δυνατό να ανιχνεύονται ταυτόχρονα στους σκύλους, προκαλώντας μεικτές μολύνσεις, ενώ πρόσφατα, μετά από αλληλούχηση τμημάτων του γονιδιώματος ενός μη τυπικού στελέχους CCoV, υποδηλώθηκε πιθανή προέλευσή του από ανασυνδυασμό των δύο τύπων (Pratelli et al., 2004a; Escutenaire et al., 2007a; Decaro and Buonavoglia, 2008).

Σήμερα, υποστηρίζεται πλέον ότι ο CCoV τύπος I προϋπήρχε του τύπου II. Η παρουσία του ORF3 στον τύπο I και η απουσία του από τον τύπο II, με ταυτόχρονη ύπαρξη νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που φαίνεται να είναι κατάλοιπα του συγκεκριμένου ORF, υποστηρίζει την προϋπαρξη του τύπου I και την εμφάνιση του δεύτερου αργότερα (Εικόνα 5). Η γλυκοπρωτεΐνη (gp3) που κωδικοποιείται από την αντίστοιχη περιοχή, λόγω έλλειψης διαμεμβρανικών περιοχών, εικάζεται ότι αποτελεί περιφερική της μεμβράνης ή εκκριτική πρωτεΐνη. Βάσει της έντονης διαφοράς ανάμεσα στις πρωτεΐνες S των δύο τύπων, φαίνεται ότι η γλυκοπρωτεΐνη 3 της συγκεκριμένης περιοχής παρέχει ένα πλεονέκτημα στους ιούς, μόνο σε συνδυασμό με την S του τύπου I, με αποτέλεσμα την απώλεια των αντίστοιχων νουκλεοτιδίων στον τύπο II (Lorusso et al., 2008).



Εικόνα 5. Το γονιδίωμα του CCoV-I και του CCoV-II/FCoV-I/II. Διακρίνεται με σκίαση το ORF3 που ανιχνεύτηκε μόνο στον CCoV-I (Lorusso et al., 2008)

Ο ανασυνδυασμός, ωστόσο, όσον αφορά στον CCoV, είχε ήδη επισημανθεί από τον Wesley το 1999, μετά από παρατήρηση της ομοιότητας ενός στελέχους CCoV (UCD-1) στο 5'-άκρο του γονιδίου S (τα 273 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου του πεπτιδίου) με τον ιό της μεταδοτικής γαστρεντερίτιδας του χοίρου (TGEV). Το στέλεχος UCD-1 είχε απομονωθεί στις Η.Π.Α. τη δεκαετία του '70 και αναπτυσσόταν εύκολα σε κύτταρα χοίρου, σε αντίθεση με τα περισσότερα στελέχη CCoV (Wesley, 1999).

Τελικά, το 2009 επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη CCoV στελεχών, στα οποία το αμινοτελικό άκρο της S πρωτεΐνης προέρχεται από ανασυνδυασμό κλασικών στελεχών CCoV (τύπου II) με TGEV. Τα εν λόγω στελέχη απομονώθηκαν στην κυτταρική σειρά A72 χωρίς όμως να πολλαπλασιάζονται σε εκείνες του χοίρου, ενώ αντιδρούσαν με μονοκλωνικά αντισώματα κατά του TGEV, γεγονός που δεν παρατηρείται στα κλασικά στελέχη CCoV. Εντύπωση προκάλεσε το γεγονός ότι τα στελέχη αυτά ανιχνεύθηκαν τόσο στο εντερικό περιεχόμενο, όσο και στα όργανα νεκρών από γαστροεντερίτιδα σκύλων, στους οποίους όμως ανιχνεύθηκε παράλληλα μεικτή μόλυνση από τύπου 2 παρβοϊό του σκύλου (*Canine parvovirus type 2*, CPV-2). Εντούτοις, κατά την πειραματική μόλυνση σκύλων, παρατηρήθηκε η κλασική συμπτωματολογία προσβολής από κοροναϊό, με τον ιό να ανιχνεύεται στα κόπρανα, όχι όμως και στο αίμα (Decaro et al., 2009; Erles and Brownlie, 2009). Τα νέα αυτά TGEV-like στελέχη αποτελούν πλέον ένα νέο υπότυπο, τον CCoVIIb, ενώ ο κλασικός κοροναϊός του σκύλου αποτελεί τον υπότυπο CCoVIIa (Decaro et al., 2010b).

Για τη δημιουργία των ανασυνδυασμών που παρατηρούνται στους κοροναϊούς του σκύλου, της γάτας και του χοίρου, είναι απαραίτητη η κυκλοφορία των ιών αυτών μεταξύ των τριών ειδών ξενιστών τους, αφού όπως γίνεται κατανοητό οι μεικτές μολύνσεις αποτελούν αναγκαία προϋπόθεση. Το είδος του ζώου, στο οποίο τελικά λαμβάνει χώρα ο ανασυνδυασμός δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα, ωστόσο έχει επιτευχθεί πειραματική μόλυνση γατών με CCoV, ενώ η μόλυνση σκύλου από FCoV δεν μπορεί να αποκλειστεί (McArdle et al., 1992; Barlough et al., 1994). Επιπλέον, έχει επιτευχθεί πειραματική μόλυνση χοιριδίων με στελέχη CCoV (Woods et al., 1981; Woods and Wesley, 1992). Από πειραματικές μολύνσεις κουταβιών με TGEV, φαίνεται ότι είναι πιθανόν οι σκύλοι να παίζουν ρόλο στην επιζωοτιολογία της μεταδοτικής γαστρεντερίτιδας του χοίρου (McClurkin et al., 1970; Larson et al., 1979).

1.2 ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΤΟΥ ΣΚΥΛΟΥ ΑΠΟ CCoV

1.2.1 Ιστορική αναδρομή

Προσβολή του σκύλου από κοροναϊό αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1974 (Binn et al., 1974). Συγκεκριμένα το 1971, το στέλεχος 1 – 71, υπήρξε το πρώτο στέλεχος CCoV που απομονώθηκε από τον Binn και τους συνεργάτες του, από κρούσμα διαρροιών σε στρατιωτικούς ενήλικες σκύλους στη Γερμανία. Η επιστημονική ομάδα μπόρεσε να μολύνει κουτάβια με το στέλεχος αυτό πειραματικά, προκαλώντας ήπια ως οξεία γαστρεντερίτιδα με διάρροια. Αργότερα στις Η.Π.Α, κατά την άνοιξη και το καλοκαίρι του 1978, έλαβαν χώρα εκτενείς επιζωοτιές διάρροιας σε σκύλους, από τις οποίες απομονώθηκε επανειλημμένα ο κοροναϊός του σκύλου (Carmichael and Binn, 1981).

1.2.2 Παθογένεια

Οι σκύλοι μολύνονται από τα μολυσμένα κόπρανα που υπάρχουν στο περιβάλλον μέσω της πεπτικής οδού. Ο ιός διέρχεται από το στομάχι, αφού είναι ανθεκτικός σε συνθήκες όξινου pH, και φθάνει στο λεπτό έντερο. Η χορήγηση του ιού παρεντερικά δεν οδηγεί σε μόλυνση του εντέρου (Binn et al., 1975; Appel, 1987).

Στο έντερο, ο ιός εισέρχεται στα εντεροκύτταρα ανάμεσα στις μικρολάχνες, στα ανώτερα 2/3 των εντερικών λαχνών. Φαίνεται ότι πολλαπλασιάζεται στα επιθηλιακά κύτταρα (εντεροκύτταρα) του δωδεκαδακτύλου και προοδευτικά στα κύτταρα των λαχνών όλου του λεπτού εντέρου, προκαλώντας προοδευτικά μείωση του αριθμού των κυττάρων και ατροφία των λαχνών. Μέσα σε 4 ημέρες παρατηρείται ανομοιόμορφη εμφάνιση των λαχνών του λεπτού εντέρου. Το κόλον ωστόσο δεν φαίνεται να προσβάλλεται. Σε νεογέννητους σκύλους, τα πιο χαρακτηριστικά ιστοπαθολογικά ευρήματα είναι η βράχυνση, η άμβλυνση και η συγχώνευση των λαχνών, καθώς και η βάθυνση των κρυπτών του λεπτού εντέρου (Binn et al., 1975; Keenan et al., 1976; Takeuchi et al., 1976; Appel et al., 1979; Carmichael and Binn, 1981).

Το επιθήλιο του λεπτού εντέρου αποτελεί τον κύριο στόχο του CCoV, παρ' όλο που κατά καιρούς ο ιός έχει ανιχνευθεί στα μεσεντέρια λεμφογάγγλια, στο ήπαρ και στο σπλήνα. Ωστόσο το 1991, ο Tennant και οι συνεργάτες του υποστήριξαν ότι στη μόλυνση από CCoV εμπλέκονται και τα κύτταρα του επιθηλίου των πλακών του Peyer, πιθανότατα τα M-κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά φαίνεται ότι παίρνουν μέρος στη πρόσληψη αντιγόνων από τον εντερικό αυλό και στην παρουσίασή τους στα λεμφοκύτταρα του υποκείμενου λεμφοειδή ιστού (Tennant et al., 1991). Στους κοροναϊούς γενικά, τα κύτταρα των επιθηλίων αποτελούν κύριους στόχους, ενώ φαίνεται να μολύνουν και κύτταρα με ευρεία διασπορά, όπως τα μακροφάγα. Στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου προκαλείται λυτική μόλυνση. Τα κύτταρα των κρυπών δεν μολύνονται αλλά εμφανίζουν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Η είσοδος του ιού στα απορροφητικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου, φαίνεται να λαμβάνει χώρα στη βάση των μικρολαχνών τους, στο ύψος του ινώδους κορυφαίου πλέγματος της κορυφής των κυττάρων. Σε κυτταρικό επίπεδο, στα εντεροκύτταρα παρατηρείται σχηματισμός λιποσταγονιδίων, καθώς και μεταβολές στη μορφολογία των κυτταρικών οργανιδίων, όπως τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Ο ιός πολλαπλασιάζεται και τελικά απελευθερώνεται στον αυλό με την απολέπιση των κυττάρων από το βλεννογόνο ή με ρήξη των μεμβρανών τους. Ο κοροναϊός του σκύλου μπορεί να ανιχνευθεί στα κόπρανα το νωρίτερο μέσα 48 ώρες μετά τη μόλυνση (Binn et al., 1975; Keenan et al., 1976; Takeuchi et al., 1976; Appel et al., 1979; Carmichael and Binn, 1981; Appel, 1987; Enjuanes et al., 2000).

Επιπλέον, σε νεογέννητους σκύλους κατά τη διάρκεια της λοίμωξης, παρατηρείται μείωση της δραστηριότητας των εντερικών ενζύμων. Η διάρροια φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της κακής απορρόφησης και της έλλειψης πεπτικών ενζύμων (Keenan et al., 1976; Takeuchi et al., 1976).

Τελικά, η παραγωγή αντισωμάτων (IgA) τοπικά, περιορίζει την εξάπλωση του ιού και αντιμετωπίζεται η μόλυνση. Μέσα σε 7 ημέρες από τη μόλυνση, παρατηρείται συνήθως αποκατάσταση των λαχνών του δωδεκαδακτύλου και ακολούθως προοδευτικά όλου του λεπτού εντέρου. Με την αποκατάσταση των βλαβών του εντερικού επιθηλίου, μειώνεται σταδιακά και η αποβολή του ιού (Keenan et al., 1976; Appel, 1987).

1.2.3 Ανοσολογική απάντηση

Η παραγωγή αντισωμάτων κατά την προσβολή του σκύλου από κοροναϊό επισημάνθηκε από τα πρώτα χρόνια έρευνας (Binn et al., 1974). Γενικά, οι δομικές πρωτεΐνες S, M και N είναι αυτές οι οποίες αποτελούν τα αντιγόνα που οδηγούν στην παραγωγή ισχυρής χυμικής ανοσίας, ακόμα και μέσα σε 10 ημέρες μετά τη μόλυνση, με διάρκεια που φαίνεται να ξεπερνά τους τρεις μήνες (Enjuanes et al., 2000; Elia et al., 2002). Εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι του CCoV έχουν ανιχνευθεί σε υψηλούς τίτλους από τη 14^η έως την 60^η ημέρα μετά τη μόλυνση, με τον υψηλότερο τίτλο να εμφανίζεται την 21^η ημέρα. Με ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), στα ίδια ζώα, ανιχνεύθηκαν αντισώματα από την 7^η ημέρα έως και 3 μήνες μετά τη μόλυνση (Keenan et al., 1976; Pratelli et al., 2002b).

Έρευνες έχουν γίνει επίσης όσον αφορά στις κλάσεις των ανοσοσφαιρινών που παράγονται κατά τη μόλυνση των σκύλων. Έτσι, φαίνεται ότι στον ορό οι IgM είναι δυνατό να ανιχνευθούν από την 3^η ημέρα μετά τη μόλυνση, με τις IgG να ακολουθούν και να ανιχνεύονται μετά την 7^η ημέρα. Στις εκκρίσεις του δωδεκαδακτύλου φαίνεται να ανιχνεύονται τόσο οι δύο προηγούμενες κλάσεις, όσο και η IgA, η οποία σε πειραματική μόλυνση εμφάνιζε προοδευτική αύξηση έως και τη 14^η ημέρα μετά τη μόλυνση, όπου έλαβε χώρα και ο τελευταίος προσδιορισμός της (Tennant et al., 1991).

Η προσφερόμενη διαμέσου του πρωτογάλατος μητρική ανοσία διαρκεί κατά κύριο λόγο 4 – 5 εβδομάδες, αλλά ο τίτλος των μητρικών αντισωμάτων είναι συνήθως χαμηλός. Τα αντισώματα είναι δυνατό να παρεμποδίζουν τη μόλυνση κατά το διάστημα αυτό, αν και έχουν σημειωθεί διάρροιες σε κουτάβια αυτής της ηλικίας λόγω προσβολής από CCoV (Appel, 1987).

Ο παρεντερικός ενοφθαλμισμός του ιού, παρ' όλο που οδηγεί σε αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων, δεν φαίνεται να προστατεύει τα ζώα από πιθανή μελλοντική μόλυνση, ούτε αποτρέπει την αποβολή του ιού. Οι σκύλοι, ωστόσο, μετά από μία φυσική λοίμωξη ανοσοποιούνται και το γεγονός αυτό αποδίδεται πιθανότατα στην παραγωγή ανοσοσφαιρίνης A. Γενικά, η προστασία έναντι των μολύνσεων από κοροναϊό έχει άμεσα συσχετιστεί με την παρουσία ειδικών αντισωμάτων στους βλεννογόνους των ειδών που προσβάλλονται (Saif, 1996). Η ανοσοσφαιρίνη A που εκκρίνεται στους βλεννογόνους, παίρνει μέρος στην προστασία τους, αφού μετά την

ένωσή της με τα αντιγόνα του ιού, παρεμποδίζει την είσοδό του στα κύτταρα-στόχο (Appel, 1987; Decaro et al., 2004b; Pratelli et al., 2004c).

1.2.4 Κλινικά Συμπτώματα

Η εντερίτιδα από τον κοροναϊό σκύλου παρουσιάζει πολλά κοινά σημεία με εκείνη που προκαλεί ο TGEV σε χοίρους και ο BCoV σε βοοειδή (Keenan et al., 1976; Cilli and Castrucci, 1981). Παρά το γεγονός ότι όλες οι φυλές και οι ηλικίες μπορούν να προσβληθούν, τα ενήλικα ζώα συνήθως δεν εμφανίζουν συμπτώματα και η βαριά συμπτωματολογία χαρακτηρίζει τις μολύνσεις των νεαρών. Η λοίμωξη συνήθως εκδηλώνεται με ανορεξία, κατάπτωση, λήθαργο και γαστρεντερικά συμπτώματα, όπως έμετο, ειδικά τις πρώτες δύο ημέρες και διάρροια. Τα κόπρανα είναι μαλακά, πολτώδη ή ακόμη και υδαρή, με κίτρινο έως πράσινο χρωματισμό και συνήθως αναδύουν αποκρουστική, χαρακτηριστική οσμή. Μπορεί επίσης να παρατηρείται αιμορραγική διάρροια. Η αφυδάτωση συνοδεύει πάντα τη διάρροια. Το ποσοστό θνησιμότητας είναι συνήθως χαμηλό, ιδιαίτερα για τους ενήλικες σκύλους. Η λευκοπενία, ένα πολύ κοινό χαρακτηριστικό εύρημα σε διάρροια από παρβοϊό, δεν παρατηρείται, αν και σε πειραματικές μολύνσεις με υψηλές δόσεις CCoV σημειώθηκε λεμφοπενία. Μερικές φορές μπορεί να παρατηρείται πυρετός, αν και δεν αποτελεί συνηθισμένο κλινικό εύρημα της εντερίτιδας από κοροναϊό (Keenan et al., 1976; Appel et al., 1979; Pollock and Carmichael, 1979; Appel, 1987; Carter and Wise, 2005).

Οι σκύλοι αναπτύσσουν ήπια ως οξεία διάρροια, με τα κόπρανα να εμφανίζουν κίτρινο έως πράσινο χρωματισμό (Keenan et al., 1976). Η διάρροια εκδηλώνεται 1 – 7 ημέρες μετά την έκθεση στον ιό και συνήθως διαρκεί για 1 – 2 εβδομάδες, αν και έχουν επίσης αναφερθεί επίμονες διάρροιες. Τα περισσότερα ζώα συνήθως αναρρώνουν μετά από μία περίοδο 7 – 10 ημερών (Carmichael and Binn, 1981; Balasuriya and Stott, 2004).

1.2.5 Παθολογοανατομικές αλλοιώσεις

Συνήθεις μακροσκοπικές αλλοιώσεις της λοίμωξης από κοροναϊό του σκύλου αποτελούν η διάταση των εντερικών ελίκων και το πολτώδες έως υδαρές εντερικό περιεχόμενο. Ο χρωματισμός του υγρού περιεχομένου μπορεί να είναι κίτρινος ή πράσινος. Το εντερικό τοίχωμα εμφανίζεται οιδηματικό, συμφορημένο έως και αιμορραγικό. Παράλληλα, τα μεσεντέρια λεμφογάγγλια εμφανίζονται συνήθως διογκωμένα και οιδηματικά (Appel et al., 1979; Pollock and Carmichael, 1979; Λέκκας κ.ά., 1998).

Η ιστολογική εικόνα του λεπτού εντέρου χαρακτηρίζεται από τη βράχυνση, την άμβλυνση και τη συγχώνευση των λαχνών, καθώς και τη βύθυνση των κρυπτών. Τα απορροφητικά κύτταρα των λαχνών εμφανίζονται κενοτοπιώδη, λόγω παρουσίας έγκλειστων λιπιδίων, και χαρακτηρίζονται από καταστροφή της ψυκτροειδούς παρυφής τους. Στο ύψος του βασικού υμένα παρατηρείται αυξημένη κυτταροβρίθεια, με τα λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα να κυριαρχούν (Keenan et al., 1976; Takeuchi et al., 1976; Appel, 1987, McCaw and Hoskins, 2006).

1.2.6 Επιζωοτιολογία νοσήματος

1.2.6.1 Γεωγραφική κατανομή του ιού και των τύπων του παγκοσμίως

Από τα πρώτα χρόνια έρευνας διαπιστώθηκε η παγκόσμια εξάπλωση του κοροναϊού του σκύλου. Ο ιός έχει ανιχνευθεί ή απομονωθεί στην Ευρώπη, στις Η.Π.Α, στην Ασία και στην Αυστραλία (Pollock and Carmichael, 1979; Carmichael and Binn, 1981; Appel, 1987; Bandai et al., 1999; Naylor et al., 2001b).

Στην Αυστραλία, διαπιστώθηκε η παρουσία του CCoV, με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διερχόμενης δέσμης ηλεκτρονίων, μόλις στο 2,88% των δειγμάτων κοπράνων, που προέρχονταν ωστόσο από σκύλους τόσο υγιείς όσο και με διάρροια (Finlaison, 1995). Ανάλογα αποτελέσματα σημειώθηκαν και στην Αργεντινή, όπου ο CCoV παρατηρήθηκε μόλις στο 7% των σκύλων που εξετάστηκαν, ενώ στο 71,4% των θετικών ζώων διαπιστώθηκε μεικτή μόλυνση με παρβοϊό του σκύλου (CPV-2) (del Amo et al., 1999). Ωστόσο, τα χαμηλά ποσοστά που καταγράφηκαν δεν θεωρούνται απόλυτα αντιπροσωπευτικά, με δεδομένο τόσο ότι στη δειγματοληψία συμπεριλήφθηκαν υγιείς σκύλοι, όσο και ότι η εξέταση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χαρακτηρίζεται από χαμηλή ευαισθησία. Πράγματι, στην

Αυστραλία συγκεκριμένα, κατά τον ορολογικό, με ELISA, έλεγχο του πληθυσμού των σκύλων διαπιστώθηκε η παρουσία του ιού σε όλες τις πολιτείες και σε ποσοστό 15,8% στους σκύλους συντροφιάς και 40,8% σε εκείνους των κυνοκομείων (Naylor et al., 2001b).

Στην Ιαπωνία αντίθετα, με χρήση μοριακών τεχνικών (αντίστροφη μεταγραφή-ένθετη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, reverse transcription-nested polymerase chain reaction, RT-nPCR), διαπιστώθηκε η παρουσία του ιού στο 16% των κοπράνων σκύλων που εμφάνιζαν διάρροια. Με χρήση μάλιστα οροεξουδετέρωσης, ανιχνεύθηκαν αντισώματα στο 44,1% των ορών τυχαίου δείγματος σκύλων (Bandai et al., 1999). Παρόμοια ευρήματα αναφέρθηκαν και στην Ολλανδία, όπου η οροθετικότητα ξεπερνούσε το 60% σε σκύλους που διαβιούσαν σε κυνοκομεία, ενώ ακόμα και σε εκείνους των ιδιωτών άγγιζε το 45%, υποδηλώνοντας τη μεγάλη διασπορά της μόλυνσης. Σε ζώα που εμφάνιζαν συμπτώματα, ανιχνεύτηκε στο 11% των περιπτώσεων ο CCoV στα κόπρανα και σε 7% του συνόλου των ζώων σε μεικτή μόλυνση με CPV-2 (Rimmelzwaan et al., 1991).

Στην Ιταλία, με χρήση μοριακών τεχνικών, ανιχνεύθηκε ο CCoV στο 62,8% των δειγμάτων κοπράνων από κουτάβια που εμφάνιζαν διάρροια (Decaro et al., 2004a). Όπως αναφέρθηκε, οι δύο τύποι του CCoV είναι δυνατό να ανιχνευθούν ταυτόχρονα σε σκύλο, προκαλώντας μεικτή μόλυνση. Μάλιστα, έχει αναφερθεί ότι οι συγκεκριμένες μεικτές μολύνσεις εμφανίζονται συχνά, σε σχέση με εκείνες που προκαλεί ο κάθε τύπος χωριστά και συνοδεύονται από δριμύτερη συμπτωματολογία (Pratelli et al., 2004a; Decaro et al., 2005b).

Σε κυνοκομείο της Μεγάλης Βρετανίας ανιχνεύθηκε ο CCoV με PCR στα κόπρανα σκύλων σε ποσοστό 17,5%. Το σχετικά χαμηλό αυτό ποσοστό, μπορεί να δικαιολογηθεί, λαμβάνοντας υπόψη ότι τα ζώα δεν εμφάνιζαν συμπτώματα κατά τη δειγματοληψία. Στο 71,4% των θετικών δειγμάτων ανιχνεύτηκε ο TGEV-like υπότυπος, ενώ ένα από τα ζώα αυτά εμφάνιζε μεικτή μόλυνση με τον κλασικό τύπο (CCoVIIa) και τον TGEV-like υπότυπο (CCoVIIb) να ανιχνεύονται στα κόπρανά του. Ο CCoV τύπος I ανιχνεύτηκε μόλις στο 14,3% των θετικών δειγμάτων (Erles and Brownlie, 2009).

Σε έρευνα στην ίδια χώρα πάντως, προκάλεσε εντύπωση το γεγονός ότι ο τύπος I ανιχνεύθηκε στο 2,8% (7 ζώα) των σκύλων, ενώ δεν εμφάνιζαν διάρροια στη φάση της δειγματοληψίας, ενισχύοντας τις απόψεις που υποστηρίζουν τις

ασυμπτωματικές μολύνσεις, καθώς και την αποβολή του ιού για μεγάλο διάστημα. Μάλιστα υπάρχουν ενδείξεις ότι ο CCoV τύπος I, ενδεχομένως να αποβάλλεται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και σε υψηλότερους τίτλους απ' ό τι ο II, ενώ η εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων δεν φαίνεται να διαφοροποιείται (Decaro et al., 2005b; Benetka et al., 2006; Stavisky et al., 2010).

Στη Τουρκία, το νόσημα είναι διαδεδομένο, αφού ανιχνεύθηκαν αντισώματα έναντι του CCoV στο 74,3% των υγιών ζώων, με τα ποσοστά να είναι υψηλότερα στα ζώα που διαβιούσαν σε κυνοκομεία. Παράλληλα καταδείχτηκε η ύπαρξη και των δύο τύπων κοροναϊού με χρήση μοριακών μεθόδων. Στο 15,5% των κουταβιών με διάρροια ανιχνεύθηκε ο συγκεκριμένος παράγοντας, όπου το 35,7% των θετικών δειγμάτων χαρακτηρίστηκε ως τύπος I και το 64,3% ως τύπος II (Yesilbag et al., 2004).

Σε έρευνα που αφορούσε τυχαία δείγματα κοπράνων από σκύλους που εμφάνιζαν γαστρεντερίτιδα από 14 χώρες τις Ευρώπης, ανιχνεύθηκε CCoV στο 42,06% των ζώων. Στο 18,86% των θετικών δειγμάτων ανιχνεύθηκε ο τύπος I, στο 44,22% ο τύπος II, ενώ στο υπόλοιπο 36,92% ανιχνεύθηκαν και οι δύο τύποι, υποδηλώνοντας ότι τέτοιου είδους μεικτές μολύνσεις είναι αρκετά συχνές. Από τα τύπου II στελέχη, μόλις το 20% αντιστοιχούσε στον υπότυπο CCoVIIb (Decaro et al., 2010b).

1.2.6.2 Μετάδοση και διασπορά

Η πιο σημαντική πηγή μόλυνσης θεωρούνται τα μολυσμένα με CCoV κόπρανα. Ο ιός μπορεί να αποβάλλεται με τα κόπρανα για 6 – 9 ημέρες μετά τη μόλυνση, αν και υπάρχουν αναφορές περιόδων μεγαλύτερων των 5 μηνών (Keenan et al., 1976; Pratelli et al., 2001a; Pratelli et al., 2002b). Ο κοροναϊός μπορεί και επιβιώνει στο περιβάλλον, ειδικά σε χαμηλές θερμοκρασίες αφού είναι ευαίσθητος στη θερμότητα, μολύνοντας ζώα, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις πυκνών πληθυσμών (συνωστισμού). Το νόσημα χαρακτηρίζεται από υψηλή μεταδοτικότητα, με τα ποσοστά οροθετικών ζώων να είναι σημαντικά υψηλότερα στα κυνοκομεία σε σύγκριση με εκείνα των δεσποζόμενων σκύλων. Η διαφορά μάλιστα στα ποσοστά οροθετικότητας φαίνεται να αγγίζει έως και το 40-60% (Appel, 1987; Rimmelzwaan

et al., 1991; Naylor et al., 2001b). Οι κοροναϊοί μεταδίδονται κυρίως μέσω της πεπτικής και της αναπνευστικής οδού (επαφή με κόπρανα) (Enjuanes et al., 2000).

Οι Carmichael και Binn το 1981 ήταν οι πρώτοι που υποστήριξαν ότι οι μολύνσεις των σκύλων από κοροναϊό είναι συχνότερες κατά τη χειμερινή περίοδο. Αργότερα αποδείχθηκε ότι οι υψηλές θερμοκρασίες αδρανοποιούν τον CCoV πολύ γρήγορα σε αντίθεση με άλλους ιούς του σκύλου και ότι όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία, τόσο μεγαλύτερο το χρονικό διάστημα που ο ιός διατηρεί την μολυσματική του ικανότητα (Carmichael and Binn, 1981; Tennant et al., 1994). Επιζωοτιολογικά, τα νοσήματα που προκαλούνται από τον TGEV και τον BCoV σε χοίρους και βοοειδή αντίστοιχα, φαίνεται να είναι εποχικά, κυριαρχώντας συγκεκριμένα το χειμώνα (Bohl, 1989; Espinasse et al., 1990; Balasuriya and Stott, 2004).

Από τον κοροναϊό του σκύλου, μπορούν να προσβληθούν όλες οι φυλές και οι ηλικίες των σκύλων, με τα νεαρά ζώα (6-12 εβδομάδων) ωστόσο να είναι σαφώς πιο ευπαθή (Appel, 1987; Carmichael and Binn, 1981). Εκτός όμως από τους σκύλους, ο CCoV μπορεί να μολύνει και άλλα μέλη της οικογένειας *Canidae*, όπως κογιότ, λύκους και αλεπούδες (Green et al., 1984; Foreyt and Evermann, 1985; Davidson et al., 1992; Zarnke et al., 2001; Clifford et al., 2006).

Ο κοροναϊός του σκύλου, πέραν της οικογένειας *Canidae*, φαίνεται να προσβάλλει και άλλα είδη ζώων, γεγονός που στηρίζει την εμφάνιση ανασυνδυασμένων στελεχών. Πρέπει να σημειωθεί βέβαια ότι τα αποτελέσματα των διάφορων μελετών είναι αντικρουόμενα. Έτσι, ενώ με το στέλεχος 1-71 δεν επιτεύχθηκε μόλυνση νεογέννητων και νεαρών χοιριδίων (Binn et al., 1974), η χρήση του στελέχους UCD-1 οδήγησε σε μόλυνση των νεογέννητων, όπως καταδείχθηκε με χρήση ανοσοφθορισμού στο επιθήλιο των κρυπών του εντέρου (Woods et al., 1981). Επίσης, σε μία άλλη μελέτη παρατηρήθηκε μόλυνση νεογέννητων χοιριδίων, μετά από επαφή τους με πειραματικά μολυσμένους με CCoV σκύλους (Woods and Wesley, 1992). Παράλληλα, όπως ήδη αναφέρθηκε, έχει επιτευχθεί πειραματική μόλυνση γατών με CCoV (McArdle et al., 1992; Barlough et al., 1994), ενώ πρόσφατα προκάλεσε εντύπωση το γεγονός ότι ανιχνεύτηκε σε γιγάντια Πάντα της οικογένειας *Ursidae*, στα οποία συσχετίστηκε με την εμφάνιση θανατηφόρας νόσου (Gao et al., 2009).

1.2.6.3 Μεικτές μολύνσεις

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι κατά τη μόλυνση ενός σκύλου από κοροναϊό μπορεί να συνυπάρχουν μολύνσεις από άλλους ιούς, βακτήρια ή παράσιτα, με αποτέλεσμα την εκδήλωση πιο σοβαρής κλινικής εικόνας (Appel, 1987; Carmichael and Binn, 1981; Mochizuki et al., 2001; Green, 2006). Στο παρελθόν, υπήρξαν αναφορές για μεικτές μολύνσεις σκύλου από κοροναϊό και παρβοϊό τύπου 2 (CPV-2) και από κοροναϊό και αδενοϊό τύπου 1 (*Canine adenovirus*, CAV-1), καθώς και από κοροναϊό και νοροϊό του σκύλου (Pratelli et al., 2001b; Decaro et al., 2007a; Ntafis et al., 2010e). Γενικά, υποστηρίζεται ότι η μόλυνση από CCoV εντείνει τη σοβαρότητα μίας μόλυνσης από CPV-2, ενώ έχει επίσης αναφερθεί υψηλή θνησιμότητα σε κουτάβια που νόσησαν από CCoV, δύο εβδομάδες αφού επιβίωσαν από παρβοεντερίτιδα (Pratelli et al., 1999b; McCaw and Hoskins, 2006).

1.2.7 Διάγνωση

1.2.7.1 Κλινική

Η κλινική διάγνωση του νοσήματος βασίζεται κατά κύριο λόγο στη διαπίστωση οξείας διάρροιας, πιθανόν αιμορραγικής. Στο ιστορικό είναι πιθανό να αναφέρεται έμετος, κυρίως τις πρώτες ημέρες της νόσου. Το ζώο είναι δυνατό να εμφανίζει ανορεξία, κατάπτωση και αφυδάτωση, χωρίς ωστόσο τα συμπτώματα να είναι τόσο έντονα, όσο εκείνα που παρατηρούνται στην παρβοϊωση. Η κλινική εκδήλωση της νόσου δεν είναι χαρακτηριστική και μπορεί να συγχέεται με νόσους που χαρακτηρίζονται από εντερίτιδα ποικίλης αιτιολογίας. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η εργαστηριακή διάγνωση για την επιβεβαίωση της νόσου (McCaw and Hoskins, 2006).

1.2.7.2 Εργαστηριακή

Από τη δεκαετία του 1970, για τη διάγνωση της νόσου χρησιμοποιήθηκαν η παρατήρηση μετά από αρνητική χρώση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διερχόμενης δέσμης ηλεκτρονίων, η απομόνωση σε ευαίσθητες στον ιό πρωτογενείς

κυτταροκαλλιέργειες ή συνεχείς κυτταρικές σειρές, η οροεξουδετέρωση και ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (Binn et al., 1974; Keenan et al., 1976; Roseto et al., 1980).

Από τότε, έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές διαφορετικές διαγνωστικές τεχνικές για την ανίχνευση τόσο των αντιγόνων του CCoV, όσο και των αντισωμάτων που παράγονται έναντι αυτού. Η χρήση της δοκιμής ELISA για την ανίχνευση αντιγόνων του CCoV ή αντισωμάτων έναντι αυτού περιγράφεται για πρώτη φορά το 1991 ως μία απλή, γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο μεγάλου αριθμού δειγμάτων (Rimmelzwaan et al., 1991; Tuchiya et al., 1991). Η ELISA έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο ευαίσθητη από τη δοκιμή της οροεξουδετέρωσης του ιού (Rimmelzwaan et al., 1991; Pratelli et al., 2002a; Yesilbag et al., 2004). Το 2003, με τη βοήθεια της μοριακής βιολογίας, καθιερώνεται μία δοκιμασία ELISA βασισμένη σε ανασυνδυασμένη M-πρωτεΐνη (Elia et al., 2003). Επίσης, με χρήση της μοριακής βιολογίας πάντα, αναπτύχθηκαν ανοσοενζυμικές τεχνικές, ικανές να διαφοροποιήσουν τα αντισώματα που παράγονται μετά την έκθεση στον τύπο I ή στον τύπο II, είτε ακόμα και στον υπότυπο IIb (Pratelli et al., 2004b; Elia et al., 2010).

Η εξέταση, σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διερχόμενης δέσμης ηλεκτρονίων με αρνητική χρώση, δειγμάτων κοπράνων αποτελούσε μια από τις πιο συχνά εφαρμοζόμενες μεθόδους για τη διάγνωση της μόλυνσης από κοροναϊό (Finlaison, 1995; del Amo et al., 1999). Ένα από τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η παρουσία σωματιδίων παρόμοιων με κοροναϊό (coronavirus-like) στα κόπρανα, η οποία καθιστά τη διάγνωση περισσότερο δύσκολη. Επίσης, έχει επισημανθεί ότι απαιτείται υψηλός τίτλος ιού για να είναι δυνατή η ανίχνευσή του (McCaw and Hoskins, 2006). Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ηλεκτρονικής μικροσκόπησης είναι δυνατό να γίνει με εφαρμογή της ανοσο-ηλεκτρονικής μικροσκόπησης, με χρήση ειδικού αντιορού, και την πρόκληση έτσι συσσωμάτωσης των σωματιδίων του ιού (Appel, 1987).

Ένα πολύτιμο, αλλά χρονοβόρο, διαγνωστικό εργαλείο θεωρείται ότι είναι η απομόνωση του ιού σε ευαίσθητες κυτταρικές σειρές. Ο κοροναϊός του σκύλου μπορεί και πολλαπλασιάζεται σε διάφορες κυτταρικές σειρές προέλευσης σκύλου και γάτας, αν και η απομόνωσή του θεωρείται δύσκολη, εξαιτίας της ιδιαίτερης φύσης του ή των δυσκολιών που προκύπτουν λόγω του μολυσμένου πρωτογενούς υλικού (κόπρανα). Επιπλέον, είναι πιθανή ακόμα και η μερική αδρανοποίηση του ιού σε

ορισμένες περιπτώσεις, εξαιτίας του pH ή και της παρουσίας ιόντων και κολλοειδών στα κόπρανα (Tennant et al., 1994). Οι συνεχείς κυτταρικές σειρές που κυρίως χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του ιού είναι η A-72 και η CRFK. Το κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα, το οποίο δεν είναι πάντα εμφανές, περιλαμβάνει το σχηματισμό συγκυτίων, τη διόγκωση και την εστιακή αποκόλληση των κυττάρων. Η απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με εξουδετέρωση ή ανοσοφθορισμό. Τονίζεται ότι μέχρι στιγμής, δεν έχει επιτευχθεί η απομόνωση του CCoV τύπου Ι. Όπως γίνεται λοιπόν κατανοητό, όλες οι δυσκολίες που αφορούν στην απομόνωση του CCoV εμποδίζουν τις μελέτες επιζωοτιολογίας, παθογένειας αλλά και γενετικής εξέλιξης αυτού (Appel et al., 1979; Appel, 1987; Pratelli, 2005; Pratelli, 2006).

Τα τελευταία χρόνια, η καθιέρωση μοριακών διαγνωστικών τεχνικών έχει συνεισφέρει σημαντικά στη διάγνωση. Οι μέθοδοι αντίστροφης μεταγραφής – αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (reverse transcriptase – polymerase chain reaction, RT – PCR) θεωρείται ότι διαθέτουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, παρέχοντας έτσι πιο ακριβή αποτελέσματα. Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί διάφορες τέτοιες μέθοδοι για την ανίχνευση του RNA του ιού σε δείγματα κοπράνων σκύλου (Bandai et al., 1999; Pratelli et al., 1999a; Naylor et al., 2001a; Erles and Brownlie, 2009), ενώ υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν την αυξημένη ευαισθησία σε σύγκριση με την απομόνωση του ιού ή τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Bandai et al., 1999; Pratelli et al., 2000; Naylor et al., 2001a). Παράλληλα, περιγράφηκαν RT-PCRs ικανές να διαφοροποιούν τους δύο τύπους καθώς και τους δύο υποτύπους του CCoV, χωρίς να απαιτείται έτσι κάθε φορά ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδιώματος (Pratelli et al., 2002c; Pratelli et al., 2004a; Decaro et al., 2010b).

Πέρα από τις αναφερόμενες διαγνωστικές μεθόδους, πρόσφατα αναπτύχθηκαν και δοκιμασίες RT-PCR πραγματικού χρόνου (real-time (RT-) PCR) για την ανίχνευση των κοροναϊών (Escutenaire et al., 2007b). Η ανάπτυξη μιας τέτοιας δοκιμής, με χρήση ειδικού ανιχνευτή υβριδισμού τεχνολογίας TaqMan, προσφέρει πιο γρήγορη διάγνωση, με απλούστερο τρόπο και με μεγαλύτερη ευαισθησία, σε σύγκριση με τις PCRs που αναφέρθηκαν παραπάνω, ενώ παράλληλα είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός του RNA του ιού στο δείγμα (Decaro et al., 2004a). Σήμερα, υπάρχουν ακόμη και μέθοδοι real-time RT-PCR ειδικές του γονοτύπου,

επιτρέποντας έτσι την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τόσο του κοροναϊού τύπου I, όσο και του κοροναϊού τύπου II στα κόπρανα των σκύλων (Decaro et al., 2005b).

1.2.7.3 Διαφορική

Διαφορική διάγνωση του νοσήματος θα πρέπει να γίνεται από νοσήματα τα οποία προκαλούν εντερίτιδες με ανάλογη εκδήλωση συμπτωμάτων. Τέτοια είναι διάφορα λοιμώδη (παρβοϊώση, νόσος του Carré, λοιμώδης ηπατίτιδα, σαλμονέλωση κ.α.) και παρασιτικά νοσήματα (τζιαρντίωση, ασκαριδίωση κ.α.) που προσβάλλουν τα νεαρά συνήθως ζώα (McCaw and Hoskins, 2006).

1.2.8 Θεραπεία

Αιτιολογική θεραπεία για τη μόλυνση του σκύλου από κοροναϊό δεν υπάρχει. Για την αντιμετώπιση της νόσου εφαρμόζεται συμπτωματική θεραπεία, που βασίζεται στη χορήγηση ορών, για την αντιμετώπιση της αφυδάτωσης, και αντιεμετικών. Σε περίπτωση που το ζώο μπορεί να λάβει υγρά από το στόμα, δύναται να χορηγηθούν διαλύματα ηλεκτρολυτών. Παράλληλα, είναι δυνατό να χορηγηθούν αντιβιοτικά με σκοπό την πρόληψη ή και την αντιμετώπιση των πιθανών δευτερογενών βακτηριακών μολύνσεων. Το ζώο, τέλος, κατά τη διάρκεια της νόσου συνιστάται να παραμένει σε ήσυχο, ζεστό μέρος. Η νόσος έχει γενικά καλή πρόγνωση, καθώς δεν χαρακτηρίζεται από υψηλή θνησιμότητα (Pollock and Carmichael, 1979; Balasuriya and Stott, 2004; McCaw and Hoskins, 2006).

1.2.9 Πρόληψη και έλεγχος

Τα εμβόλια έναντι του κοροναϊού του σκύλου κυκλοφόρησαν στο εμπόριο για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1980. Στις Η.Π.Α., υπήρξαν αναφορές που ενοχοποίησαν για την πρόκληση εγκεφαλίτιδας στους σκύλους, ένα τροποποιημένο ζωντανό εμβόλιο έναντι του CCoV, όταν χορηγούνταν μαζί με τροποποιημένα ζωντανά εμβόλια έναντι των ιών της νόσου του Carré και της παρβοϊώσης του

σκύλου (Appel, 1987). Από τότε, έχουν παρασκευαστεί διάφορα εμβόλια. Σημειώνεται ότι στις κατευθυντήριες γραμμές της αναφοράς του American Animal Hospital Association (AAHA), όσον αφορά στους εμβολιασμούς των σκύλων, το 2006, ο εμβολιασμός έναντι του CCoV δεν συνιστάται (Paul et al., 2006).

Έρευνες πάνω στην αποτελεσματικότητα ενός αδρανοποιημένου εμβολίου (DURAMUNE PC, FortDodge) έναντι του CCoV αποκάλυψαν ότι δεν ήταν δυνατή η παρεμπόδιση της αποβολής του ιού μετά την προσβολή των ζώων, παρά μόνο η μείωση της διάρκειάς της. Ωστόσο θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα εμβολιασμένα ζώα δεν εμφάνισαν συμπτώματα, τυπικά της μόλυνσης από CCoV (Pratelli et al., 2003c). Πρόσφατα, αναφέρθηκε ένα τροποποιημένο ζωντανό εμβόλιο το οποίο, χορηγούμενο από τη στοματορινική οδό, μπορούσε να εμποδίζει την αποβολή του ιού και την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων, ενώ δεν παρατηρήθηκαν παρενέργειες (Pratelli et al., 2004c).

Γενικά, όσον αφορά στην πρόληψη, συστήνονται 2 εμβολιασμοί, με διαφορά 3-4 εβδομάδων, και στη συνέχεια ετήσια αναμνηστική δόση (McCaw and Hoskins, 2006). Παρ' όλα αυτά, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα εμβόλια που κυκλοφορούν δεν είναι βέβαιο ότι καλύπτουν τα ζώα έναντι του τύπου I και του υποτύπου CCoVIIIb, καθώς οι προκαταρκτικές μελέτες έδειξαν ότι οι κατηγορίες αυτές δεν εμφανίζουν απόλυτα διασταυρούμενες αντιδράσεις με τον CCoVIIa (Pratelli et al., 2004b, Decaro et al., 2009). Μόνο με την εφαρμογή εμβολιασμών και πειραματικών μολύνσεων θα μπορούσε ουσιαστικά να ελεγχθεί η κάλυψη των ζώων έναντι τέτοιου είδους στελεχών (CCoVI και CCoVIIIb). Τέλος, θα πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι, τουλάχιστον στους κοροναϊούς των πτηνών, έχουν σημειωθεί ανασυνδυασμοί ανάμεσα σε λοιμογόνα και ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης εμβολιακά στελέχη. Οι ανασυνδυασμοί αυτοί οδηγούν στην εμφάνιση νέων στελεχών με νέες αντιγονικές ιδιότητες και όπως γίνεται κατανοητό αποτελούν εμφαλήριο για προβληματισμό πάνω στη χρήση «ζωντανών» εμβολίων έναντι των κοροναϊών (Wang et al., 1994; Jia et al., 1995).

Η πρόληψη, πέραν των εμβολιασμών, θα πρέπει να βασίζεται στην αποφυγή επαφής με μολυσμένους σκύλους, αφού η κύρια πηγή της μόλυνσης είναι τα κόπρανα. Οι εκτενείς απολυμάνσεις θα πρέπει να εφαρμόζονται σε μέρη όπως τα κυνοκομεία και τα καταφύγια σκύλων, με στόχο τη μείωση της μόλυνσης του περιβάλλοντος από τον ιό. Από τα απολυμαντικά, έχουν ελεγχθεί διάφορα κατά του

CCoV (Pratelli, 2007). Γενικά, όμως, φαίνεται ότι το διάλυμα 3% υποχλωριώδους νατρίου (sodium hypochlorite) είναι αποτελεσματικό. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη ότι η μετάδοση από σκύλο σε σκύλο είναι δυνατή και ότι υπάρχουν σκύλοι που αποβάλλουν τον ιό για πολύ μεγάλη χρονική περίοδο μετά τη μόλυνση, γίνεται κατανοητό ότι δύσκολα επιτυγχάνεται η απολύμανση και η πρόληψη στα κυνοκομεία (Appel, 1987; Pratelli et al., 2001a; Pratelli et al., 2002b, Carter and Wise, 2005).

1.3 ΑΠΟΚΛΙΝΟΝΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΥ ΔΙΑΠΕΡΝΟΥΝ ΤΟΝ ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΦΡΑΓΜΟ

Λόγω της συχνής εμφάνισης των μεταλλάξεων και των ανασυνδυασμών στο γονιδίωμα του κοροναϊού του σκύλου, κατά καιρούς έχουν ανιχνευθεί διάφορα στελέχη, τα οποία είναι αποκλίνοντα από τα συνήθη και μπορεί να χαρακτηρίζονται παράλληλα από υψηλή λοιμογόνο δύναμη. Ένα τέτοιο στέλεχος, το UWSMN-1, ανιχνεύθηκε στην Αυστραλία σε ένα κρούσμα επιζωοτικής θανατηφόρου γαστρεντερίτιδας σε εκτροφή σκύλων. Κατά τη φυλογενετική ανάλυση, το στέλεχος αυτό, λόγω συγκέντρωσης μεταλλάξεων στο γονιδίωμά του, φάνηκε να βρίσκεται σε ξεχωριστή ομάδα από εκείνα των τυπικών κοροναϊών του σκύλου και της γάτας (Naylor et al., 2001a; Naylor et al., 2002). Σε ανάλογο κρούσμα στη Μεγάλη Βρετανία, ανιχνεύθηκε το στέλεχος BGF10, με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά την πολύ μεγάλου μεγέθους μη δομική πρωτεΐνη 3b, αλλά και τη μεγάλη απόκλιση του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης M από εκείνα άλλων στελεχών (Sanchez-Morgado et al., 2004). Στελέχη με υψηλή λοιμογόνο δύναμη έχουν αναφερθεί και σε δύο περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας από CCoV με μοιραία κατάληξη, όπου, πέραν της διαπίστωσης του ιού στο έντερο με ανοσοϊστοχημεία, παρατηρήθηκε μέτρια νέκρωση του σπλήνα, του θύμου, των λεμφογαγγλίων αλλά και του λεμφοειδούς ιστού του εντέρου (Evermann et al., 2005).

Επιπλέον, από τα πρώτα χρόνια μελέτης του κοροναϊού του σκύλου υπήρχαν υπόνοιες ότι υπάρχουν στελέχη που μπορούν να διαπερνούν τον εντερικό φραγμό και να εντοπίζονται σε κύτταρα πέραν του εντερικού επιθηλίου (Keenan et al., 1976). Κάτι τέτοιο δεν αποτελεί προνόμιο αποκλειστικά του CCoV, αφού υπάρχουν παρόμοιες αναφορές και για άλλους κοροναϊούς, όπως ακόμα και για τους στενά

συγγενικούς κοροναϊούς της γάτας και της μεταδοτικής γαστρεντερίτιδας του χοίρου. Τελικά το 1991, σε πειραματική μόλυνση κουτάβιων ηλικίας 10 εβδομάδων με στέλεχος CCoV, προκάλεσε εντύπωση το γεγονός ότι ο ιός απομονώθηκε όχι μόνο από το εντερικό περιεχόμενο, αλλά και από τα μεσεντέρια λεμφογάγγλια, τους πνεύμονες, το σπλήνα και τις αμυγδαλές, χωρίς ωστόσο να είναι δυνατή η απομόνωσή του από το αίμα. Στις αμυγδαλές, έλαβε επίσης χώρα ανίχνευση του ιού με ανοσοϊστοχημεία (Tennant et al., 1991).

Το 2005, σε θανατηφόρο κρούσμα συστηματικής νόσου που εκδηλώθηκε σε 7 κουτάβια ενός καταστήματος πώλησης ζώων συντροφιάς και χαρακτηριζόταν από αιμορραγική διάρροια, λήθαργο, έμετο, λευκοπενία, νευρολογικά συμπτώματα και πυρετό, ενοχοποιήθηκε ο τύπου II CCoV. Τα κουτάβια ήταν αρνητικά για οποιοδήποτε άλλο παθογόνο, αποκλείοντας το ενδεχόμενο πιθανής μεικτής μόλυνσης, ενώ στα παρεγχυματικά όργανα παρατηρήθηκαν σοβαρές αλλοιώσεις. Το στέλεχος CB/05 απομονώθηκε από το έντερο, τους πνεύμονες, το σπλήνα, τους νεφρούς και το ήπαρ και ανιχνεύθηκε επίσης με ανοσοϊστοχημεία. Με μοριακές τεχνικές ανιχνεύθηκε ιικό RNA στα παραπάνω όργανα αλλά και στον εγκέφαλο, σε υψηλές συγκεντρώσεις (Buonavoglia et al., 2006). Κατά τη μοριακή ανάλυση του CB/05, εντύπωση προκάλεσε μια πλαισιοτροπική μετάλλαξη απάλειψης 38 νουκλεοτιδίων που παρατηρήθηκε στο ORF 3b και θεωρείται πιθανό να ευθύνεται για την αλλαγή του τροπισμού του στελέχους (Decaro et al., 2007b). Με παρόμοιες μεταλλάξεις άλλωστε έχει συσχετιστεί η δυνατότητα του κοροναϊού της γάτας να αλλάζει τροπισμό και από απλή λοίμωξη του έντερου, που προκαλεί συνήθως, να οδηγεί στην εμφάνιση λοιμώδους περιτονίτιδας (Vennema et al., 1998).

Η συστηματική νόσος που προκάλεσε το στέλεχος CB/05 επιβεβαιώθηκε και πειραματικά, αφού η ερευνητική ομάδα κατάφερε σε πειραματική μόλυνση να αναπαράγει τη συμπτωματολογία, με τα συμπτώματα να εκδηλώνονται πιο έντονα στα κουτάβια ηλικίας 2,5 μηνών. Τα κουτάβια εκδήλωσαν ανορεξία, κατάπτωση, πυρετό, αιμορραγική διάρροια, έμετο, αλλά και λεμφοπενία. Παρ' όλο που δεν σημειώθηκε θάνατος, έγινε ανίχνευση του ιού σε υψηλούς τίτλους, τόσο στα κόπρανα, όσο και στα παρεγχυματικά όργανα, μετά από ευθανασία λόγω της δριμύτητας των συμπτωμάτων. Παράλληλα διαπιστώθηκε παραγωγή αντισωμάτων από τα ζώα, ενώ εντύπωση προκάλεσε το γεγονός ότι ο ιός δεν ανιχνεύθηκε στο αίμα (με μία μόνο εξαίρεση, σε πολύ χαμηλά ωστόσο επίπεδα) (Decaro et al., 2008). Στο

σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι χαμηλοί τίτλοι ιού στο αίμα παρατηρούνται και στη λοιμώδη περιτονίτιδα της γάτας (de Groot-Mijnes et al., 2005).

Οι αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στα παρεγχυματικά όργανα των κουταβιών της πειραματικής μόλυνσης, ήταν ανάλογες με εκείνες που παρατηρήθηκαν στο κρούσμα του 2005. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αιμορραγική εντερίτιδα, οροαιμορραγικό υγρό στην περιτοναϊκή κοιλότητα, πύκνωση στους πνεύμονες, αιμορραγικά έμφρακτα στη φλοιώδη μοίρα των νεφρών, πετέχιες στα λεμφογάγγλια, σπληνομεγαλία και συμφορημένο ήπαρ με κίτρινο-καφέ χρωματισμό (Buonavoglia et al., 2006; Decaro et al., 2008). Παρόμοιες αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν και σε μία ακόμα ανάλογη περίπτωση, όπου παράλληλα ο ιός ανιχνεύτηκε με ανοσοϊστοχημεία σε μακροφάγα/ ιστιοκύτταρα του πνεύμονα, σε κύτταρα του Kupffer και περιαγγειακά μονοπύρηννα του ήπατος, καθώς και σε κύτταρα του περιαγγειακού χώρου των νεφρών και του σπλήνα (Zappuli et al., 2008). Θεωρήθηκε λοιπόν, ότι τέτοιου είδους στελέχη είναι πιθανό να προκαλούν συστηματική λοίμωξη με μηχανισμό παθογένειας ανάλογο με εκείνον που παρατηρείται στη λοιμώδη περιτονίτιδα της γάτας και έχει ως βάση την προσβολή των μονοκυττάρων/μακροφάγων (Kipar et al., 2005; Rottier et al., 2005).

Κλείνοντας το κεφάλαιο αυτό, αξίζει να αναφερθεί ότι οι κοινές λοιμώξεις από στελέχη CCoV, δεν φαίνεται να καταλείπουν ικανοποιητική προστατευτική ανοσία σε κουτάβια έναντι του στελέχους CB/05. Σε πειραματική μόλυνση με το συγκεκριμένο στέλεχος, ο ιός προκάλεσε νόσο στα ζώα, που εκδηλώθηκε με διάρροια, λεμφοπενία αλλά και αποβολή του ιού, παρά την υψηλού επιπέδου χυμική ανοσία των κουταβιών (λόγω προσβολής από κλασικό CCoV). Μετά από ευθανασία των κουταβιών παρατηρήθηκε εντερίτιδα με αιμορραγίες στο βλεννογόνο, διόγκωση των λεμφογαγγλίων και σπληνομεγαλία, ενώ ο ιός ανιχνεύθηκε στο θύμο, το σπλήνα και τα λεμφογάγγλια. Ωστόσο, η νόσος δεν είχε την προαναφερθείσα σοβαρή μορφή και εξέλιξη, πιθανότατα λόγω διασταυρούμενης ανοσίας με τον κλασικό CCoV. Παρ' όλα αυτά υποδηλώθηκε ότι τα εμβόλια που κυκλοφορούν στο εμπόριο έναντι του CCoV, είναι πολύ πιθανό να μην προστατεύουν ικανοποιητικά τα ζώα από μία ενδεχόμενη λοίμωξη, η οποία προκαλώντας λεμφοπενία, μπορεί να αποτελεί προδιαθέτονα παράγοντα για την κλινική εκδήλωση ευκαιριακών παθογόνων ή και άλλων νοσημάτων (Decaro and Buonavoglia, 2008; Decaro et al., 2010a).

Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η επιζωοτιολογική μελέτη της παρουσίας του κοροναϊού του σκύλου στην Ελλάδα, καθώς, παρ' όλο που αποτελεί έναν από τους κύριους παθογόνους παράγοντες που εμπλέκονται στην εκδήλωση οξείας διάρροιας στους σκύλους, δεν υπήρχαν σχετικές αναφορές. Συγκεκριμένα, οι στόχοι της έρευνας ήταν οι παρακάτω:

1. Η διερεύνηση του ποσοστού ανίχνευσης του CCoV σε σκύλους με οξεία διάρροια.
2. Η διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ της συχνότητας ανίχνευσης του CCoV και της ομαδικής/ατομικής διαβίωσης, καθώς και της ηλικίας.
3. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των στελεχών και η διαπίστωση της ύπαρξης των δύο τύπων, καθώς και των δύο υποτύπων, οι οποίοι ανιχνεύθηκαν την τελευταία δεκαετία και αποτελούν νέο πεδίο έρευνας, όσον αφορά στον CCoV.
4. Η φυλογενετική ανάλυση των ιών που κυκλοφορούν στην Ελλάδα, με αλληλούχηση του 5'- τμήματος του γονιδίου S, αφού αποτελεί ιδιαίτερα ενδιαφέρον τμήμα του γονιδιώματος των κοροναϊών, καθώς εμφανίζει έντονη παραλλακτικότητα και είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του τμήματος της πρωτεΐνης S που συνδέεται με τους υποδοχείς των κυττάρων – στόχο.
5. Η διαπίστωση της παρουσίας στελεχών του CCoV με δυνατότητα να διαπερνούν τον εντερικό φραγμό και να ανιχνεύονται σε διάφορα όργανα του σκύλου. Όσον αφορά στα εν λόγω στελέχη, διεθνώς υπάρχουν ελάχιστες αναφορές, με αποτέλεσμα να απουσιάζουν επαρκή δεδομένα που να σχετίζονται με την επιζωοτιολογία και την παθογένεια αυτών.
6. Η απομόνωση των στελεχών που διαπερνούν τον εντερικό φραγμό και η μοριακή και φυλογενετική ανάλυση όλων των πρωτεϊνών τους, πλην της πολυμεράσης, με στόχο την κατανόηση των «μηχανισμών» ανάδυσής.
7. Η διερεύνηση της παρουσίας και άλλων ιών στα κόπρανα, με στόχο τη διαγνωστική διερεύνηση των συγκεκριμένων περιστατικών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ζώα

Κατά τη συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκε παθολογικό υλικό από 206 σκύλους με κλινική εικόνα οξείας διάρροιας. Οι σκύλοι προέρχονταν από κυνοκομεία, χώρους λιανικής πώλησης ζώων συντροφιάς (pet shop), καθώς και από κλινικές ζώων συντροφιάς. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από το νομό Αττικής, καθώς και από νομούς της βόρειας Ελλάδας (Θεσσαλονίκης, Χαλκιδικής, Πέλλας, Πιερίας), της κεντρικής Ελλάδας (Μαγνησίας, Λάρισας, Τρικάλων) και της Κρήτης. Η προέλευση των σκύλων φαίνεται στον Πίνακα 1 του Παραρτήματος. Η μελέτη περιλάμβανε την εξέταση δειγμάτων κοπράνων των ζώων αυτών για την ανίχνευση του CCoV. Σε περίπτωση που η νόσος είχε θανατηφόρα απόληξη και στα κόπρανα των σκύλων ανιχνευόταν ο CCoV, στη συνέχεια ακολουθούσε εξέταση των οργάνων (ήπαρ, σπλήνας, πάγκρεας, νεφροί, καρδιά, πνεύμονες, εγκέφαλος) για την ανίχνευση του ιού. Η δειγματοληψία έλαβε χώρα από το Δεκέμβριο του 2007 και για δύο χρόνια.

Για το μοριακό χαρακτηρισμό του CCoV χρησιμοποιήθηκαν όλα τα ζώα στα οποία ανιχνεύτηκε ο ιός. Για τη φυλογενετική ανάλυση των ελληνικών στελεχών που ανιχνεύθηκαν στα κόπρανα, χρησιμοποιήθηκαν 15 ζώα στα οποία ο CCoV χαρακτηρίστηκε ως CCoV-I, 19 ζώα στα οποία ανιχνεύτηκε CCoV που χαρακτηρίστηκε μοριακά ως CCoV-IIa και 13 ζώα στα οποία ο ιός χαρακτηρίστηκε ως CCoV-IIb. Για τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών που ανιχνεύθηκαν σε όργανα των ζώων, μετά το θάνατο αυτών, χρησιμοποιήθηκαν 3 ζώα.

Παράλληλα, σε 25 από τα παραπάνω ζώα έγινε διερεύνηση της παρουσίας και άλλων ιών στα κόπρανα και συγκεκριμένα του ιού της νόσου Carré (canine distemper virus, CDV), του αδενοϊού του σκύλου τύπου 1 και 2 (CAV-1 και CAV-2) και του παρβοϊού του σκύλου (CPV-2), με στόχο τη διαγνωστική διερεύνηση των συγκεκριμένων περιστατικών. Οι σκύλοι στους οποίους έλαβαν χώρα οι παραπάνω εξετάσεις, αποτελούσαν 3 ομάδες. Η μία ομάδα απαρτιζόταν από νεοεισερχόμενα κουτάβια κυνοκομείου των Τρικάλων (21 ζώα) στα οποία διαπιστώθηκαν επαναλαμβανόμενες επιζωοτίες οξείας διάρροιας, η 2^η από έναν σκύλο στον οποίο ανιχνεύθηκε ένα αποκλίνον στέλεχος CCoV και η 3^η από τρεις σκύλους στους οποίους ανιχνεύθηκε ο CCoV στα όργανα μετά το θάνατό τους.

2.2 Στοιχεία των ζώων

Από κάθε ζώο λαμβάνονταν παράλληλα πληροφορίες που αφορούσαν στην ηλικία του, στη φυλή, στο φύλο, στις συνθήκες διαβίωσης, καθώς και στην τυχόν εφαρμογή εμβολιασμών και αποπαρασιτώσεων. Επιπλέον, λαμβάνονταν πληροφορίες σχετικά με το ιστορικό της νόσου που εμφάνισε, τα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν, καθώς και τα ευρήματα της κλινικής εξέτασης. Τα στοιχεία των ζώων καταγράφονταν από τους κτηνίατρους που διαχειρίζονταν τα περιστατικά της οξείας διάρροιας.

2.3 Δείγματα κοπράνων και οργάνων

Από τα ζώα που εμφάνιζαν οξεία διάρροια, λαμβάνονταν κόπρανα, με χρήση αποστειρωμένου βαμβακοφόρου στείλεου μη εμποτισμένου σε υγρό μεταφοράς, από το απευθυσμένο. Οι βαμβακοφόροι στείλεοί ακολούθως καταψύχονταν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ και αποστέλλονταν στο εργαστήριο άμεσα με χρήση ισοθερμικών κιβωτίων και κατεψυγμένων παγοκύστεων, οι οποίες τοποθετούνταν σε άμεση επαφή με τα δείγματα. Στο εργαστήριο τα δείγματα αποθηκεύονταν άμεσα στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, μέχρι την εξέτασή τους, καθώς και μετά το πέρας αυτής.

Στα ζώα που εμφάνιζαν οξεία διάρροια, η οποία είχε θανατηφόρα απόληξη, εφαρμόστηκε η ίδια διαδικασία, ενώ παράλληλα, εκτός από το βαμβακοφόρο στείλεό, καταψυχόταν και το ζώο ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Η αποστολή στο εργαστήριο ακολουθούσε την προαναφερθείσα διαδικασία. Στο εργαστήριο, σε περίπτωση που ανιχνευόταν ο CCoV στα κόπρανα, ακολουθούσε νεκροτομή του ζώου, λήψη φωτογραφιών, καταγραφή των νεκροτομικών ευρημάτων και συλλογή, κάτω από άσηπτες συνθήκες, των οργάνων του. Τα όργανα τοποθετούνταν σε αποστειρωμένους περιέκτες με κατάλληλη σήμανση και αποθηκεύονταν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, μέχρι την εξέτασή τους, καθώς και μετά το πέρας αυτής.

2.4 Εκχύλιση RNA και DNA από κόπρανα και όργανα

Για την εκχύλιση RNA και DNA από τα κόπρανα, γινόταν αραιώση των δειγμάτων 1:100 με χρήση φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS, Sigma-

Aldrich, USA) και ομογενοποίηση με χρήση οργάνου ανατάραξης (Vortex, Bio-Rad Laboratories Srl, Italy). Ακολουθούσε φυγοκέντρηση των αραιωμένων δειγμάτων στα 8000g επί 5', ώστε να καθιζήσουν τα μη διαλυτά στοιχεία (Pratelli et al., 2000). Τέλος, συλλεγόταν το υπερκείμενο υγρό και εφαρμόζονταν οι τυποποιημένες διαδικασίες που αναφέρονται στα QIAamp Viral RNA Mini Kit και Dneasy Blood & Tissue Kit αντίστοιχα (Qiagen GmbH, Germany).

Για την εκχύλιση RNA από τα όργανα, έγινε λήψη τεμαχιδίου 10mg από τα όργανα και εφαρμογή της τυποποιημένης διαδικασίας που αναφέρεται στο RNease Mini Kit (Qiagen GmbH, Germany).

2.5 Εκκινητές

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές από προηγούμενες δημοσιευμένες ερευνητικές μελέτες. Τα ζεύγη των εκκινητών αναφέρονται στις αντίστοιχες μεθόδους. Εξάιρεση αποτέλεσε ένα ζεύγος εκκινητών, εκ των οποίων ο ανοδικός ήταν ένας κλασικός εκκινητής (1 ολιγονουκλεοτίδιο) ενώ ο καθοδικός αποτελούσε εκκινητή με εκφυλισμό (degenerate primer). Συγκεκριμένα, αποτελούνταν από μείγμα δύο ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία διέφεραν μεταξύ τους κατά ένα νουκλεοτίδιο. Το συγκεκριμένο ζεύγος (Πίνακας 1) σχεδιάστηκε για την παρούσα μελέτη, με στόχο την ανίχνευση και ενίσχυση τμήματος που εμπεριείχε το 5'-άκρο του γονιδίου S του τύπου I κοροναϊού. Για το σχεδιασμό του συγκεκριμένου ζεύγους (PolEnd-1060dR) χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Gene Runner Έκδοση 3.01 (Hastings Software, Inc), ενώ έγινε χρήση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών δύο στελεχών αναφοράς του CCoV τύπου I, των Elmo/02 και 23/03. Η σύνθεση των εκκινητών έλαβε χώρα στη Eurofins MWG, Germany.

Πίνακας 1. Ανοδικός (PolEnd) και καθοδικός (1060dR) εκκινητής που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 5'-άκρου του γονιδίου S του CCoV τύπου I.

ΟΝΟΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΤΗΞΗΣ Tm [°C]
PolEnd	5'-CTAAGGAAGGGTAAGTTGCTCA-3'	58,4
1060dR	5'-ATCAGCAGATGCTTGRGGACA-3'	58,8

Η συγκεκριμένη περιοχή επιλέχθηκε για τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών του CCoV, με δεδομένο ότι εμφανίζει μεγάλη παραλλακτικότητα και είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον τροπισμό και την αντιγονικότητα των κοροναϊών. Στη διεθνή βιβλιογραφία. Η θέση των εκκινητών ήταν γενετικά συντηρημένη στα δύο στελέχη και ο σχεδιασμός έγινε με στόχο την ενίσχυση τμήματος τουλάχιστον 990 νουκλεοτιδίων του 5'-άκρου του γονιδίου S. Όπως έχει παρατηρηθεί σε άλλους κοροναϊούς, το αμινοτελικό τμήμα των 330 αμινοξέων της S1 περιοχής αποτελεί και το τμήμα της πρωτεΐνης S που συνδέεται με τους υποδοχείς των κυττάρων. Φαίνεται λοιπόν ότι το τμήμα αυτό προσδιορίζει και το φάσμα των κυττάρων-στόχο των κοροναϊών (Suzuki and Taguchi, 1996).

2.6 Στελέχη του CCoV που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αποδοτικότητας των RT-PCRs

Για την αξιολόγηση της αποδοτικότητας των RT-PCRs χρησιμοποιήθηκαν 3 στελέχη CCoV από Ιταλία (ευγενική χορηγία του καθηγητή C. Buonavoglia). Κάθε ένα από αυτά ήταν χαρακτηρισμένο ως CCoVVI, CCoVIIIa και CCoVIIIb αντίστοιχα. Για την αξιολόγηση της εξειδίκευσης της RT-PCR, στην οποία χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητών με εκφυλισμό που σχεδιάστηκε ειδικά για τη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν τα τρία παραπάνω στελέχη, καθώς και κόπρανα από 5 ζώα, τα οποία ήταν αρνητικά για CCoV με χρήση real time (RT-) PCR (Decaro et al., 2004a).

2.7 Αντίστροφη μεταγραφή-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) για τα στελέχη του CCoV

2.7.1 Ανίχνευση-Διάγνωση

Για την ανίχνευση του κοροναϊού του σκύλου στα δείγματα κοπράνων και οργάνων των σκύλων έγινε χρήση ημιένθετης RT-PCR (Pratelli et al., 1999a; Pratelli et al., 2000; Decaro et al., 2004a). Για την ενίσχυση της περιοχής του ιικού γονιδιώματος που αναφέρεται στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών CCV1 (5'-TCCAGATATGTAATGTTCCGG-3') και CCV2 (5'-

TCTGTTGAGTAATCACCCAGCT-3'). Η συγκεκριμένη περιοχή περιλαμβάνει 409 νουκλεοτίδια της πρωτεΐνης M (αμινοξέα 123 έως 246). Σύμφωνα με το πιο πρόσφατο πρότυπο της πρωτεΐνης M, η περιοχή αυτή αντιπροσωπεύει το τέλος του τρίτου ενδομεμβρανικού τμήματος και την αρχή του εσωτερικού τμήματος του καρβοξυτελικού άκρου (Risco et al., 1995). Για την RT-PCR έγινε χρήση του εμπορικού kit SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen S.R.L.) και του ακόλουθου πρωτοκόλλου: αντίστροφη μεταγραφή στους 45 °C για 30' και αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 94 °C για 2' και στη συνέχεια 45 κύκλοι των 94 °C για 30'', 55 °C για 30'', 68 °C για 30''. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10'. Στη συνέχεια, για την εφαρμογή της ημιάνθετης PCR χρησιμοποιήθηκε το προϊόν της RT-PCR (αραιωμένο σε νερό 1:100) και το εμπορικό kit Accuprime Supermix II (Invitrogen S.R.L.). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο ανοδικός CCV3 (5'-GGTGTCACCTAACAATTGCTT-3') και ο καθοδικός της RT-PCR, CCV2. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής: 94 °C για 2' και στη συνέχεια 35 κύκλοι των 94 °C για 1', 55 °C για 1', 68 °C για 1'. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10'. Το προϊόν είχε μήκος 212 ζεύγη βάσεων. Ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα RNA που εκχυλίστηκαν από κόπρανα σκύλου θετικού και αρνητικού στον CCoV αντίστοιχα.

2.7.2 Χαρακτηρισμός του τύπου

Στα δείγματα που ανιχνεύθηκε ο CCoV, έγιναν 2 RT-PCRs με στόχο το χαρακτηρισμό του τύπου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών, ένα ειδικό για τον CCoV τύπου I και ένα για τον CCoV τύπου II. Και τα δύο ζεύγη εκκινητών ενισχύουν τμήματα του 3'-άκρου του γονιδίου S των συγκεκριμένων τύπων. Για την ενίσχυση του τύπου I CCoV χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος EL1F (5'-CAAGTTGACCGTCTTATTACTGGTAG-3') και EL1R (5'-TCATATACGTACCATTTATAGCTGAAGA-3') που ενισχύει τμήμα μήκους 346 νουκλεοτιδίων, ενώ για την ενίσχυση του τύπου II CCoV χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος S5 (5'-TGCATTTGTGTCTCAGACTT-3') και S6 (5'-CCAAGGCCATTTTACATAAG-3') που ενισχύει τμήμα μήκους 694 νουκλεοτιδίων του προαναφερθέντος γονιδίου. Για την RT-PCR έγινε χρήση του εμπορικού kit SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen S.R.L.) και του

ακόλουθου πρωτοκόλλου: αντίστροφη μεταγραφή στους 45 °C για 30' και αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 94 °C για 2' και στη συνέχεια 45 κύκλοι των 94 °C για 30'', 55 °C για 30'', 68 °C για 30''. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10' (Pratelli et al., 2004a). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα RNA που εκχυλίστηκαν από τα κόπρανα δύο σκύλων, ενός θετικού στον CCoV τύπου I και ενός θετικού στον CCoV τύπου II, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το RNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός σκύλου αρνητικού στον CCoV.

2.7.3 Διαφοροποίηση των υποτύπων IIa και IIb

Στα δείγματα, τα οποία χαρακτηρίστηκαν μοριακά ως CCoV τύπου II, έγινε χρήση δύο RT-PCRs για τη διαφοροποίηση του υποτύπου IIa (κλασικός τύπου II CCoV) και του υποτύπου IIb (TGEV-like τύπου II CCoV). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ένας ανοδικός εκκινητής, ο 20179 (5'-GGCTCTATCACATAACTCAGTCCTAG-3'), ο οποίος συνδέεται στο συντηρημένο 3'-άκρο του ORF1b και δύο καθοδικοί εκκινητές ειδικοί για κάθε υπότυπο, οι οποίοι συνδέονταν πλησίον του 5'-άκρου του γονιδίου S όπου εμφανίζεται και η έντονη παραλλακτικότητα μεταξύ των υποτύπων λόγω του ανασυνδυασμού. Συγκεκριμένα, για τον CCoVIIa χρησιμοποιήθηκε ο καθοδικός εκκινητής INS-R-dg (5'-GCTGTAACATAKTCRTCATTCCAC-3') και για τον CCoVIIb ο 174-268 (5'-CAACATGTAACCTTTGTCTGTGATCTGC-3'). Έτσι, κάθε θετικό δείγμα στον CCoV τύπου II, εξεταζόταν με τα δύο ζεύγη εκκινητών 20179/INS-R-dg (με μήκος προϊόντος 758 ζεύγη βάσεων) και 20179/174-268 (με μήκος προϊόντος 499 ζεύγη βάσεων) σε δύο χωριστές RT-PCRs, για τον καθορισμό του υποτύπου. Για τις μεθόδους χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit SuperScript One-Step RT-PCR for Long Templates (Invitrogen S.R.L.) και το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στον κυκλοποιητή (i-Cycler, Bio-Rad Laboratories Srl, Italy) ήταν το εξής: αντίστροφη μεταγραφή στους 50 °C για 30' και αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 94 °C για 2' και στη συνέχεια 40 κύκλοι των 94 °C για 30'', 55 °C για 1', 68 °C για 30''. Η τελική επέκταση έγινε στους 68 °C για 10' (Decaro et al., 2010b). Τα προϊόντα της RT-PCR με εκκινητές 20179/174-268 υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων, με σκοπό τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών του CCoVIIb.

Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα RNA που εκχυλίστηκαν από τα κόπρανα δύο σκύλων, ενός θετικού στον CCoVIIa και ενός θετικού στον CCoVIIb, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το RNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός σκύλου αρνητικού στον CCoV.

2.7.4 Διαφοροποίηση του CCoVIIb και του TGEV

Η συγκεκριμένη RT-PCR χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να διαπιστωθεί ότι τα στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ως CCoVIIb ήταν όντως στελέχη CCoV και όχι στελέχη του ιού της μεταδοτικής γαστρεντερίτιδας του χοίρου. Συγκεκριμένα έγινε χρήση του ζεύγους εκκινητών N3SN (5'-GTGTTTGATGACACACAGGTTGAG-3') και R3AS (5'-GCTTACCATTCTGTACAAGAGTAG-3'), οι οποίοι ενισχύουν το 3' άκρο του γονιδιώματος των κοροναϊών της γάτας (ORF7a/7b), του σκύλου (ORF7a/7b) και του χοίρου (ORF7a) (Wesley, 1999). Το εν λόγω ζεύγος οδηγεί στην ενίσχυση τμήματος μήκους 1082 νουκλεοτιδίων στους CCoVs, 1061 στους FCoVs και μόλις 367 στους TGEVs, στους οποίους το ORF7a είναι μικρότερο κατά 69 νουκλεοτίδια, ενώ το ORF7b απουσιάζει (Horshburgh et al., 1992). Για τη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen S.R.L.) και το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ήταν το εξής: αντίστροφη μεταγραφή στους 50 °C για 30' και αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 94 °C για 2' και στη συνέχεια 40 κύκλοι των 94 °C για 30'', 60 °C για 30'', 68 °C για 1'. Η τελική επέκταση έγινε στους 68 °C για 10' (Wesley, 1999). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα RNA που εκχυλίστηκαν από τα κόπρανα ενός θετικού στον CCoVIIb σκύλου και ενός θετικού στον TGEV χοίρου, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το RNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός σκύλου αρνητικού στον CCoV.

2.7.5 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου S του ιού

Για την ενίσχυση του 5'-άκρου του γονιδίου S, με στόχο τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών, χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών, ένα για τον CCoV τύπου I και ένα για τον CCoV υπότυπο IIa. Και τα δύο ζεύγη ενισχύουν το 5'-άκρο του γονιδίου S. Για τον τύπου I CCoV χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος PolEnd/1060dR,

το οποίο ενίσχυε τμήμα 1158 νουκλεοτιδίων που περιλάμβαναν το 3'-άκρο του γονιδίου της πολυμεράσης (ORF1b) και το 5'-άκρο του γονιδίου S. Με το ζεύγος αυτό ενισχύθηκε τμήμα του γονιδιώματος 15 στελεχών που χαρακτηρίστηκαν ως CCoV τύπος I στην παρούσα μελέτη. Για τον CCoV τύπου II χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών EI-Ins1 (5'-GGATTACTAARGADKGGTAAGTTGC-3') και S2 (5'-CAACTTCACTTGAAGCAACA-3'), το οποίο ενισχύει τμήμα 1632 νουκλεοτιδίων που περιλάμβαναν το 3'-άκρο του γονιδίου της πολυμεράσης (ORF1b) και το 5'-άκρο του γονιδίου S (Decaro et al., 2007b). Για τις συγκεκριμένες RT-PCRs χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit SuperScript One-Step RT-PCR for Long Templates (Invitrogen S.R.L.) και το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ήταν το εξής: αντίστροφη μεταγραφή στους 50 °C για 30', αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 94 °C για 2' και στη συνέχεια 40 κύκλοι των 94 °C για 1', 52 °C για 2', 68 °C για 2'. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10'. Τα προϊόντα των εν λόγω RT-PCRs υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων, με σκοπό τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα RNA που εκχυλίστηκαν από τα κόπρανα δύο σκύλων, ενός θετικού στον CCoV τύπου I και ενός θετικού στον CCoV υπότυπο IIa, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το RNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός σκύλου αρνητικού στον CCoV.

2.7.6 Ενίσχυση των ORF 2, 3, 4, 5, 6 και 7 των στελεχών του CCoV που διαπερνούν τον εντερικό φραγμό

Ειδικά στα τρία στελέχη CCoV, που ανιχνεύθηκαν στα όργανα των σκύλων, εφαρμόστηκαν RT-PCRs, με σκοπό την ενίσχυση του 3'-άκρου του γονιδιώματος των στελεχών (ενίσχυση όλων των γονιδίων πλην αυτού της πολυμεράσης). Για την εν λόγω ενίσχυση χρησιμοποιήθηκε ιικό RNA από το σπλήνα για το στέλεχος NA/09 (σκύλος 13/09) και από τον πνεύμονα για τα στελέχη 66/09 και 68/09 (Πίνακας 1, Παράρτημα). Αποφασίστηκε η ενίσχυση της εν λόγω περιοχής, καθώς τα συγκεκριμένα γονίδια σχετίζονται με την παθογένεια των κοροναϊών και συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον στη μοριακή διερεύνηση των στελεχών που διαπερνούν τον εντερικό φραγμό. Με χρήση 6 ζευγών εκκινητών, ενισχύθηκαν 6 μερικώς αλληλοκαλυπτόμενα τμήματα του γονιδιώματος, τα οποία εμπεριείχαν

τελικά τα ORFs 2 (γονίδιο S), 3a, 3b, 3c, 4 (γονίδιο E), 5 (γονίδιο M), 6 (γονίδιο N) 7a και 7b. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: El-Ins1 (5'-GGATTACTAARGADKGGTAAGTTGC-3') και S2 (5'-CAACTTCACTTGAAGCAACA-3') (προϊόν μήκους 1632 ζεύγη βάσεων), SIIF (5'-GCATTAGTAGTTGAAAACACAGC-3') και SIIR (5'-TCAAGTCTGGCACCCATTG-3') (προϊόν μήκους 1280 ζεύγη βάσεων), S3 (5'-GAGACTTTCAACCAATTAGC-3') και UCD6R (5'-TTAATGAATGTGAACTTTTTCAATAGG-3') (προϊόν μήκους 1875 ζεύγη βάσεων), SM1F (5'-CAGTTTGAAAGTTATGAACCTATTGA-3') και M6 (5'-TCCCTGAGAGGACATTTAGA-3') (προϊόν μήκους 2400 ζεύγη βάσεων), MNIF (5'-CAACAGATGCAAGAACTGAYAA-3') και MNIR (5'-TTAGTTCGTTACCTCATCAATAATCTC-3') (προϊόν μήκους 1217 ζεύγη βάσεων), 7abF (5'-TGATCCTAAGACTGGACAATTCC-3') και 7abR (5'-AAATCTAGCATTGCCAAATCAAA-3') (προϊόν μήκους 1313 ζεύγη βάσεων) (Decaro et al., 2007b). Για τις συγκεκριμένες RT-PCRs χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit SuperScript One-Step RT-PCR for Long Templates (Invitrogen S.R.L.) και το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στον κυκλοποιητή ήταν το εξής: αντίστροφη μεταγραφή στους 50 °C για 30', αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 94 °C για 2' και στη συνέχεια 40 κύκλοι των 94 °C για 1', 50 °C για 1', 68 °C για 2,5'. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10'. Τα προϊόντα των εν λόγω RT-PCRs υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων, με σκοπό τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε RNA που εκχυλίστηκε από τον πνεύμονα σκύλου θετικού στο στέλεχος CB/05, ενώ ως αρνητικός RNA που εκχυλίστηκε από τον πνεύμονα σκύλου αρνητικού στον CCoV.

2.7.7 Επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού του στελέχους THr/85/08

Για την ενίσχυση τμημάτων του στελέχους THr/85/08 με σκοπό να διαπιστωθεί η ύπαρξη ανασυνδυασμού, (σκύλος 85/08, Πίνακας 1, Παράρτημα), εφαρμόστηκε αρχικά μία RT-PCR και στη συνέχεια δύο ημιένθετες PCRs (seminested PCRs). Κατά την RT-PCR, ενισχύθηκε περιοχή μήκους 3148 νουκλεοτιδίων που εμπεριείχε το 3'-άκρο του ORF2 (γονίδιο S), το ORF3, το ORF4 καθώς και το 5' άκρο του ORF5 (γονίδιο M). Το μέγεθος του προϊόντος δίνεται σε

σχέση με το στέλεχος αναφοράς Insanc-1, καθώς στο ORF3 είναι συχνή η εμφάνιση μεταλλάξεων προσθήκης και απάλειψης. Για την ενίσχυση έγινε χρήση των εκκινητών S5 (ανοδικός) και CCV2 (καθοδικός) που προαναφέρθηκαν. Η συγκεκριμένη RT-PCR ενισχύει μόνο το γονιδίωμα του CCoV τύπου II. Για τη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit SuperScript One-Step RT-PCR For Long Templates (Invitrogen S.R.L.) και το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ήταν το εξής: αντίστροφη μεταγραφή στους 50 °C για 30' και αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 94 °C για 5' και στη συνέχεια 40 κύκλοι των 94 °C για 1', 55 °C για 1', 68 °C για 4'. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10'. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το RNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός θετικού στον CCoV τύπου II σκύλο, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το RNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός σκύλου αρνητικού στον CCoV.

Για τις ημι-ένθετες στη συνέχεια PCRs, χρησιμοποιήθηκαν δύο νέοι εκκινητές, καθώς και οι εκκινητές της RT-PCR. Τα ζεύγη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα S5/S6 και CCV1/CCV2. Το προϊόν της πρώτης RT-PCR χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:100. Για τις PCRs, έγινε χρήση του εμπορικού kit Accuprime Supermix II (Invitrogen S.R.L.) και οι εξής συνθήκες: 94 °C για 2' και στη συνέχεια 35 κύκλοι των 94 °C για 30'', 55 °C για 30'', 68 °C για 30''. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10'. Τα προϊόντα των εν λόγω PCRs υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων, με σκοπό τη φυλογενετική ανάλυση του στελέχους. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το RNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός θετικού στον CCoV τύπου II σκύλο, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το RNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός σκύλου αρνητικού στον CCoV.

2.8 Αντίστροφη μεταγραφή-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Reverse Transcription-real time Polymerase Chain Reaction) για την ανίχνευση του CCoV και το χαρακτηρισμό του τύπου

Για την ανίχνευση του κοροναϊού και το χαρακτηρισμό του, εφαρμόστηκαν τρεις διαφορετικές, real time (RT-) PCRs, δηλαδή μία για την ανίχνευση του CCoV και δύο ειδικές του γονότυπου. Η αντίστροφη μεταγραφή που αφορούσε και στις τρεις real time (RT-) PCRs έλαβε χώρα κάτω από τις ίδιες συνθήκες, με χρήση του εμπορικού kit GeneAmp® RNA PCR (Applied Biosystems, Italy). Συγκεκριμένα, 1 μl

RNA μεταγραφόταν αντίστροφα σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 µl που περιείχε PCR buffer 1x (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3), 5 mM MgCl₂, 1 mM από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 U Rnase Inhibitor, 2,5 U MuLV reverse transcriptase και 2,5 U random hexamers. Η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) γινόταν στους 42 °C για 30' και η αποδιάταξη στους 99 °C για 5' (Decaro et al., 2004a).

Για την ανίχνευση του ιικού RNA, χρησιμοποιήθηκε real time PCR που στόχευε στην ενίσχυση τμήματος 99 νουκλεοτιδίων του ORF5 (γονίδιο M) (Decaro et al., 2004a). Ο τελικός όγκος αντίδρασης (50 ml) αποτελούνταν από 25 µl IQTM Supermix (Bio-Rad Laboratories Srl, Italy), 300 nM από κάθε εκκινητή (CCoV-For και CCoV-Rev), 200 nM του ανιχνευτή Taqman CCoV-Pb και 20 µl του cDNA (η σύνθεση των εκκινητών και του ανιχνευτή έγινε από τη MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής: 95 °C για 10' και 45 κύκλοι αποδιάταξης (95 °C για 15'') και υβριδοποίησης των εκκινητών-επέκτασης (60 °C για 1'). Η αντίδραση έλαβε χώρα σε i-Cycler iQTM Real-Time Detection System (Bio-Rad Laboratories Srl) και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το αντίστοιχο λογισμικό (έκδοση 3.0). Οι εκκινητές και ο ανιχνευτής φαίνονται στον Πίνακα 2. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το RNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός θετικού στον CCoV σκύλου, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το RNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός σκύλου αρνητικού στον CCoV.

Πίνακας 2. Αλληλουχίες των εκκινητών (ανοδικός, CCoV-For και καθοδικός, CCoV-Rev) και του ανιχνευτή (CCoV-Pb) που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση του CCoV. Οι θέσεις των εκκινητών και του ανιχνευτή δίνονται βάσει του στελέχους Insavc-1 (D13096).

Εκκινητές/ Ανιχνευτής	Αλληλουχία (5'-3')	Θέση
CCoV-For	TTGATCGTTTTTATAACGGTCTACAA	6585–6611
CCoV-Rev	AATGGGCCATAATAGCCACATAAT	6660–6683
CCoV-Pb	ACCTCAATTTAGCTGGTTCGTGTATGGCATT- TAMRA	6620–6650

Για τον προσδιορισμό του τύπου του CCoV και την ποσοτικοποίηση του ιικού RNA, έλαβαν χώρα δύο real-time PCRs που ενίσχυαν 111 και 105 νουκλεοτίδια του γονιδίου M του CCoV τύπου I και II αντίστοιχα (Decaro et al., 2005b). Ο τελικός όγκος αντίδρασης (50 ml) αποτελούνταν από 25 μl IQTM Supermix (Bio-Rad Laboratories Srl, Italy), 600 nM από κάθε εκκινητή (CCoVI-F/CCoVI-R ή CCoVII-F/CCoVII-R), 200 nM του ανιχνευτή Taqman CCoV-Pb (CcoVI-Pb ή CCoV-Pb αντίστοιχα) και 20 μl του cDNA. Η σύνθεση των εκκινητών και του ανιχνευτή έγινε από τη MWG Biotech AG (Ebersberg, Germany). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής: 95 °C για 10' και 45 κύκλοι αποδιάταξης (95 °C για 15''), υβριδοποίησης των εκκινητών (53 °C ή 48 °C για 30'', για τους CCoV τύπο I και CCoV τύπο II αντίστοιχα) και επέκτασης (60 °C για 1'). Η αντίδραση έλαβε χώρα σε i-Cycler iQTM Real-Time Detection System (Bio-Rad Laboratories Srl) και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το αντίστοιχο λογισμικό (έκδοση 3.0). Οι εκκινητές και ο ανιχνευτής φαίνονται στους Πίνακες 3 και 4. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα RNA που εκχυλίστηκαν από τα κόπρανα δύο σκύλων, ενός θετικού στον CCoV τύπου I και ενός θετικού στον CCoV τύπου II, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το RNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός σκύλου αρνητικού στον CCoV.

Πίνακας 3. Αλληλουχίες των εκκινητών (ανοδικός, CCoV-F και καθοδικός, CCoV-R) και του ανιχνευτή (CCoVI-Pb) που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για το χαρακτηρισμό του CCoV τύπου I. Οι θέσεις των εκκινητών και του ανιχνευτή δίνονται βάσει του στελέχους 259/01 (AF502583).

Εκκινητές/ Ανιχνευτής	Αλληλουχία (5'-3')	Θέση
CCoVI-F	CGTTAGTGCACTTGGAAGAAGCT	478–499
CCoVI-R	ACCAGCCATTTTAAATCCTTCA	567–588
CCoVI-Pb	FAM-CCTCTTGAAGGTACACCAA-TAMRA	508–526

Πίνακας 4. Αλληλουχίες των εκκινητών (ανοδικός, CCoVII-F και καθοδικός, CCoVII-R) και του ανιχνευτή (CCoVII-Pb) που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για το χαρακτηρισμό του CCoV τύπου II. Οι θέσεις των εκκινητών και του ανιχνευτή δίνονται βάσει του στελέχους Insavc-1 (D13096).

Εκκινητές/Α νιχνευτής	Αλληλουχία (5'-3')	Θέση
CCoVII-F	TAGTGCATTAGGAAGAAGCT	6878–6897
CCoVII-R	AGCAATTTTGAACCCTTC	6966–6982
CCoVII-Pb	FAM-CCTCTTGAAGGTGTGCC-TAMRA	6906–6922

2.9 Τεχνικές για την ανίχνευση άλλων ιών

Η ανίχνευση του ιού της νόσου του Carré (CDV) έγινε με RT-PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές p1 (5'-ACAGGATTGCTGAGGACCTAT-3') και p2 (5'-CAAGATAACCAT GTACGGTGC-3'). Η συγκεκριμένη PCR ενισχύει 287 νουκλεοτίδια του γονιδίου NP του CDV. Για την εφαρμογή της RT-PCR χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen S.R.L.) και το πρωτόκολλο ήταν το εξής: αντίστροφη μεταγραφή στους 50 °C για 30', αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 94 °C για 2' και στη συνέχεια 40 κύκλοι των 94 °C για 30'', 59,5 °C για 30'', 72 °C για 1'. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10' (Frisk et al., 1999). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το RNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός σκύλου θετικού στον CDV, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το RNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός σκύλου αρνητικού στον CDV.

Για την ανίχνευση των δύο τύπων αδενοϊού του σκύλου (CAV-1 και CAV-2), χρησιμοποιήθηκε PCR με ζεύγος εκκινητών τους HA1 (5'-CGCGCTGAACATTACTIONACTTGTGTC-3') και HA2 (5'-CCTAGAGCACTTCGTGTCCGCTT-3'). Η συγκεκριμένη PCR ενισχύει 508 και 1.030 νουκλεοτίδια της περιοχής E3 των CAV-1 και CAV-2 αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit Accuprime Supermix II (Invitrogen S.R.L.) και οι

εξής συνθήκες: 94 °C για 2' και στη συνέχεια 35 κύκλοι των 94 °C για 1', 58 °C για 1', 72 °C για 1'. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10' (Hu et al., 2001). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα DNA που εκχυλίστηκαν από τα κόπρανα δύο σκύλων, ενός θετικού στον CAV-1 και ενός θετικού στον CAV-2, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το DNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός σκύλου αρνητικού στον CAV-1 και στον CAV-2.

Για την ανίχνευση του CPV-2 με PCR, χρησιμοποιήθηκε το δημοσιευμένο ζεύγος εκκινητών Hfor (5'-CAGGTGATGAATTGCCTACA-3') και Hrev (5'-CATTTGGATAAACTGGTGGT-3'), το οποίο στοχεύει στην ενίσχυση τμήματος 630 νουκλεοτιδίων του γονιδίου, που αποτελεί τον κώδικα για την πρωτεΐνη του καψιδίου. Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit Accuprime Supermix II (Invitrogen S.R.L.) και οι εξής συνθήκες: 94 °C για 2' και στη συνέχεια 35 κύκλοι των 94 °C για 1', 55 °C για 1', 68 °C για 1'. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10' (Decaro et al., 2005a). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το DNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός σκύλου θετικού στον CPV-2, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το DNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός σκύλου αρνητικού στον CPV-2.

Για το χαρακτηρισμό του CPV-2, έγινε χρήση real time PCRs, με ειδικούς της κάθε ποικιλίας (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c) ανιχνευτές νέας τεχνολογίας, που έφεραν τη χρωστική φθορισμού FAM ή VIC και ήταν συζευγμένοι με Minor Groove Binder ligands (MGB ανιχνευτές). Οι ανιχνευτές αυτοί είναι μικρότεροι σε μήκος, μεγαλύτερης ειδικότητας, σχηματίζουν ιδιαίτερα σταθερές συνδέσεις με το συμπληρωματικό DNA και χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). Οι ανιχνευτές είναι κατάλληλοι για το χαρακτηρισμό των ποικιλιών του CPV-2, καθώς κύρια διαφορά των ποικιλιών αποτελεί η μονοσημιακή αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου, που οδηγεί σε αντικατάσταση ενός αμινοξέως στη θέση 462 της πρωτεΐνης του καψιδίου. Η θέση αυτή αποτελεί στρατηγικό σημείο για την αντιγονικότητα των στελεχών του CPV-2. Χρησιμοποιήθηκαν δύο real time PCRs, μία ικανή να διαφοροποιεί τις ποικιλίες CPV-2a και CPV-2b και μία για να διαφοροποιεί τις ποικιλίες CPV-2b και CPV-2c. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές φαίνονται στον Πίνακα 5. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής: 95 °C για 10' και 45 κύκλοι, που απαρτίζονταν από 95 °C για 30'' και 60 °C για 1'. Οι παραπάνω μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για να είναι δυνατή, στη συνέχεια, η διαφοροποίηση των στελεχών του CPV-2 που

ανιχνεύθηκαν στα δείγματα κοπράνων από εμβολιακά στελέχη (Decaro et al., 2006b). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα DNA που εκχυλίστηκαν από τα κόπρανα τριών σκύλων, ενός θετικού στον CPV-2a, ενός θετικού στον CPV-2b και ενός θετικού στον CPV-2c, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το DNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός σκύλου αρνητικού στον CPV-2.

Πίνακας 5. Αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν στις μεθόδους αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για τη διάκριση των αντιγονικών ποικιλιών του CPV-2.

Μέθοδος Διάκρισης	Εκκινητές/ Ανιχνευτές	Αλληλουχίες 5'-3'
2a/2b	CPVa/b-For	AGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGA
	CPVa/b-Rev	CCAATTGGATCTGTTGGTAGCAATACA
	CPVa-Pb	VIC—CTTCCTGTAACAAATGATA—MGB
	CPVb1-Pb	FAM—CTTCCTGTAACAGATGATA—MGB
2b/2c	CPVb/c-For	GAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCA
	CPVb/c-Rev	ATGCAGTTAAAGGACCATAAGTATTTAAATATATTAGT ATAGTTAATTC
	CPVb2-Pb	FAM—CCTGTAACAGATGATAAT—MGB
	CPVc-Pb	VIC—CCTGTAACAGAAGATAAT—MGB

Για τη διαφοροποίηση των στελεχών του CPV-2 που ανιχνεύτηκαν, από εκείνα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή εμβολίων, έγινε χρήση real time PCR αντίστοιχης τεχνολογίας με εκείνη που χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό των στελεχών. Στη συγκεκριμένη μέθοδο έγινε χρήση δύο ανιχνευτών, του CPV2-Pb (ειδικού των εμβολιακών στελεχών) και του CPVv-Pb (ειδικού των στελεχών που κυκλοφορούν). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής: 95 °C για 10' και

45 κύκλοι, που απαρτίζονταν από 95 °C για 30'' και 60 °C για 1' (Decaro et al., 2006a). Οι αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών δίνονται στον Πίνακα 6. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα DNA που εκχυλίστηκαν από τα κόπρανα δύο σκύλων, ενός θετικού στον CPV-2a και ενός θετικού σε εμβολιακό στέλεχος, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το DNA που εκχυλίστηκε από τα κόπρανα ενός σκύλου αρνητικού στον CPV-2.

Πίνακας 6. Αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για τη διάκριση των αντιγονικών ποικιλιών του CPV-2 από τα εμβολιακά στελέχη.

Εκκινητές/ Ανιχνευτές	Αλληλουχία 5'-3'	Ειδικότητα
CPV2/v-For	GCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAG	Όλα τα στελέχη
CPV2/v-Rev	TCAACCAATGACCAAGGTGTTACAA	Όλα τα στελέχη
CPV2-Pb	FAM-TGTGCATGAATATCAT-MGB	Τύπος 2 (εμβόλια)
CPVv-Pb	VIC-TTTGTGCATGAGTATCAT-MGB	Αντιγονικές Ποικιλίες

Όλες οι προαναφερόμενες μοριακές τεχνικές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης της παρούσας μελέτης διενεργήθηκαν τρεις φορές προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

2.10 Ηλεκτροφόρηση των πηκτών αγαρόζης

Για την παρασκευή πηκτών αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε αγαρόζη υψηλής καθαρότητας (Applichem GmbH, Germany) διαλυμένη σε διάλυμα 1xTAE [40 mM Tris, 20 mM Acetic acid και 1 mM EDTA, pH 8,3 (FLUKA, Switzerland)] σε συγκέντρωση 1,5%. Για την απεικόνιση των προϊόντων της PCR στις πηκτές αγαρόζης, ενσωματώθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma-Aldrich Chemie

GmbH, Germany) σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml. Για την ηλεκτροφόρηση, οι πηκτές αγαρόζης τοποθετούνταν μέσα σε διάλυμα 1xTAE.

Μετά το πέρας των (RT)-PCRs, ακολουθούσε ανάλυση των προϊόντων σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Για την εν λόγω ανάλυση γινόταν χρήση πηκτής αγαρόζης 1,5% και ρυθμιστικού διαλύματος 1xTAE. Πέντε μl από κάθε προϊόν των (RT)-PCRs, αφού αναμειγνύονταν με 1 μl διαλύματος φόρτωσης (6X Loading Dye Solution, Fermentas, Spain), τοποθετούνταν στα βοθρία της πηκτής αγαρόζης. Σε κάθε πηκτή τοποθετούνταν επίσης ο κατάλληλος DNA δείκτης γνωστών μοριακών βαρών (GeneRuler 100bp DNA Ladder, ready-to-use ή/και Mass Ruler DNA Ladder, ή GeneRuler 1kb, 250-10,000 DNA Ladder, Fermentas, Spain), ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας. Ακολούθως, λάμβανε χώρα εφαρμογή τάσης 90V για 1 ώρα. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης ελεγχόταν σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV transilluminator). Το μέγεθος των προϊόντων προσδιοριζόταν βάσει του δείκτη γνωστών μοριακών βαρών.

2.11 Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων

2.11.1 Απομόνωση των προϊόντων των RT-PCRs

Για τον καθαρισμό των προϊόντων των RT-PCRs, χρησιμοποιήθηκε το QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

Για την εκχύλιση του DNA από την πηκτή αγαρόζης, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης και κάτω από υπεριώδεις ακτίνες, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη λεπίδα νυστεριού μίας χρήσης, διαχωριζόταν το προϊόν της RT-PCR. Στη συνέχεια, εκχυλιζόταν το DNA από το τεμάχιο της πηκτής αγαρόζης με την εφαρμογή της εμπορικής διαδικασίας QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Germany).

2.11.2 Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων των προϊόντων ενίσχυσης των RT-PCRs

Τα προϊόντα των RT-PCRs, μετά τον καθαρισμό ή την εκχύλισή τους από την πηκτή αγαρόζης στάλθηκαν για αλληλούχηση νουκλεοτιδίων. Η αλληλούχηση έγινε με τεχνολογία DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing σε αλληλουχοποιητή

AB3710xl (Applied Biosystems, USA) (Beckman Coulter Genomics, United Kingdom). Στη συνέχεια, ακολούθησε σύγκριση των αλληλουχιών με δημοσιευμένες αλληλουχίες γονιδιωμάτων μέσω της βάσης δεδομένων GenBank database (www.ncbi.nih.gov/GenBank).

2.12 Λογισμικά πολλαπλής στοίχισης και επεξεργασίας αλληλουχιών, φυλογενετικής ανάλυσης και ανάλυσης των πρωτεϊνών

Τα λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πολλαπλή στοίχιση και την επεξεργασία των αλληλουχιών των ελληνικών στελεχών με στελέχη από τη διεθνή βιβλιογραφία, οι αλληλουχίες των οποίων έχουν κατατεθεί στο GenBank του National Center of Biotechnology Information (NCBI) ήταν το BioEdit (Hall, 1999), το GeneDoc και το SimPlot (Lole et al., 1999). Για τη φυλογενετική ανάλυση, έγινε χρήση του λογισμικού MEGA έκδοση 4.0 (Tamura et al., 2007). Για τη διαπίστωση των πιθανών θέσεων N-γλυκοσυλίωσης και των πιθανών πεπτιδίων-σηματοδοτών των πρωτεϊνών των στελεχών, καθώς και των ενδομεμβρανικών τμημάτων των πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε ο NetNGlyk 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>), NetGlyc, SignalIP και TMHMM αντίστοιχα).

2.13 Λογισμικό στατιστικής ανάλυσης αποτελεσμάτων

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρήση του λογισμικού στατιστικής ανάλυσης Statgraphics Plus 4.0. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το τεστ σύγκρισης ποσοστών (έλεγχος υποθέσεων) σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.

2.14 Απομόνωση στελεχών του CCoV σε κυτταροκαλλιέργειες

Για την απομόνωση στελεχών του CCoV που διαπερνούν τον εντερικό φραγμό, χρησιμοποιήθηκε η συνεχής κυτταρική σειρά A72 (προέλευσης από ινοσάρκωμα του σκύλου). Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονταν σε πλαστικές φιάλες των 25cm² και των 75cm² (Greiner bio one, Germany). Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν Dulbecco's MEM (Minimum Essential Medium),

εμπλουτισμένο με ορό εμβρύου μόσχου σε αναλογία 10% και L-Glutamine (200mM) σε αναλογία 1%. Στο θρεπτικό υπόστρωμα προστέθηκε διάλυμα αντιβιοτικών (πενικιλίνη, 1000 IU/ml, και στρεπτομυκίνη, 100 µg/ml) σε αναλογία 1%. Για τις διόδους των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θρυψίνης (Trypsin/EDTA). Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας Lonza (Belgium).

Για την απομόνωση, χρησιμοποιήθηκαν τεμάχια οργάνων και κόπρανα από σκύλους στους οποίους ανιχνεύθηκαν στελέχη του ιού. Τα τεμάχια των οργάνων και τα κόπρανα ομογενοποιούνταν με Dulbecco's MEM σε αναλογία 1/10 και στη συνέχεια φυγοκεντρώνταν στα 8.000g για 10'. Μετά, σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής λαμβανόταν το υπερκείμενο υγρό και τοποθετούταν σε νέο πλαστικό φιαλίδιο των 2 ml (reaction tube, Greiner bio one, Germany), προσθέτονταν διάλυμα αντιβιοτικών (1000 IU/ml πενικιλίνης και 100 µg/ml στρεπτομυκίνης) σε αναλογία 1/10 και ακολουθούσε επώαση για 30'. Μετά το πέρας της επώασης, γινόταν ενοφθαλμισμός των κυτταροκαλλιιεργειών. Σε φιάλες των 25cm², όπου είχε σχηματιστεί ταπήτιο με πληρότητα 70-80%, μετά από απόρριψη του θρεπτικού υποστρώματος ενοφθαλμίζονταν 700 µl παθολογικού υλικού και οι φιάλες τοποθετούνταν στον επωαστήρα, στους 37 °C με 5% CO₂ για 30'. Μετά από την επώαση, προσθέτονταν συμπληρωματική ποσότητα Dulbecco's MEM και οι φιάλες τοποθετούνταν και πάλι στον επωαστήρα. Εκεί παρέμειναν επί 5 ημέρες, όπου παρατηρούνταν καθημερινά για τη διαπίστωση της ύπαρξης κυτταροπαθογόνου αποτελέσματος του ιού. Μετά το πέρας πέντε 24ώρων επώασης, αν δεν διαπιστωνόταν κυτταροπαθογόνος δράση στα κύτταρα, ακολουθούσε δίοδος, αφού είχε προηγηθεί κατάψυξη-απόψυξη της φιάλης, σε νέα κυτταροκαλλιιεργεια (700µl ενοφθαλμίσματος), επαναλαμβάνοντας την ίδια διαδικασία. Σε περίπτωση που και πάλι δεν παρατηρούνταν κυτταροπαθογόνος δράση, ακολουθούσαν η ίδια διαδικασία για τρίτη φορά. Σε περίπτωση που εμφανιζόταν κυτταροπαθογόνος δράση σε μία από τις δύο πρώτες διόδους του ιού, ακολουθούσαν η ίδια διαδικασία μέχρι και την τρίτη δίοδο, με στόχο την αύξηση του τίτλου του ιού. Στις περιπτώσεις όπου διαπιστωνόταν κυτταροπαθογόνος δράση, σε οποιοδήποτε από τα στάδια που προαναφέρθηκαν, το περιεχόμενο των φιαλών των τριών διόδων συλλεγόταν, τοποθετούνταν σε πλαστικά φιαλίδια και αποθηκευόταν στους -80 °C.

2.15 Έμμεσος ανοσοφθορισμός για την επιβεβαίωση της *in vitro* απομόνωσης στελεχών του CCoV

Στη συγκεκριμένη μελέτη, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την επιβεβαίωση της απομόνωσης των στελεχών CCoV. Για το σκοπό αυτό, τοποθετούνταν κύτταρα A72 σε αποστειρωμένες αντικειμενοφόρες πλάκες διαμερισμένες σε θαλάμους (chamber slides), κατάλληλες για την καλλιέργεια κυττάρων (Iwaki, Japan). Κατά τη δεύτερη και τρίτη δίοδο του ιού, ενοφθαλμίζονταν και οι πλάκες αυτές από το περιεχόμενο των φιαλών, με στόχο τη διαπίστωση της παρουσίας του CCoV στα κύτταρα. Μετά το πέρας 2-3 ημερών, το περιεχόμενο των αντικειμενοφόρων απορριπτόταν και ακολουθούσε μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα ακετόνης 80%. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλένονταν με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,04 (Sigma-Aldrich, USA), στεγνώνονταν και πάνω σε αυτά τοποθετούνταν πολυκλωνικός ορός κατά του κοροναϊού της γάτας, ο οποίος εμφανίζει έντονα διασταυρούμενη αντίδραση με τα διάφορα στελέχη του CCoV (ευγενική προσφορά του καθηγητή C. Buonavoglia). Ο ορός χρησιμοποιούταν αραιωμένος 1:100, στο ίδιο φωσφορικό διάλυμα. Μετά από 30' επώασης στους 37 °C, ακολουθούσε πλύσιμο με το παραπάνω φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, στέγνωμα των πλακών και τοποθέτηση πάνω στα κύτταρα IgG αντισωμάτων κατά των αντισωμάτων της γάτας συνδεδεμένων με ισοθειοκυανική φλουοροσεΐνη (anti-cat IgG FITC-antibody, με διέγερση στα 490 nm και εκπομπή στα 525 nm) (Sigma-Aldrich, USA). Ο ορός χρησιμοποιούταν σε αραιώση 1:100. Μετά από 30' επώαση στις ίδιες συνθήκες με το προηγούμενο στάδιο, ακολουθούσε πλύσιμο της πλάκας με PBS. Πάνω στα κύτταρα τοποθετούνταν χρωστική Evan's Blue (Applichem, Germany) για 30'' και στη συνέχεια ακολουθούσε πλύσιμο των κυττάρων. Πάνω στην πλάκα τοποθετούνταν μία σταγόνα γλυκερίνης (Research Organics, USA) και καλυπτρίδα και ακολουθούσε παρατήρηση των κυττάρων της πλάκας σε μικροσκόπιο φθορισμού, για τη διαπίστωση ειδικού ανοσοφθορισμού (immunofluorescence) στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, όπου και ανιχνεύεται ο CCoV.

2.16 Έμμεσος ανοσοφθορισμός για τον αποκλεισμό της *in vitro* απομόνωσης στελεχών του CPV-2

Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε και έμμεσος ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση στελεχών του CPV-2 στις κυτταροκαλλιέργειες, με στόχο τον αποκλεισμό της παράλληλης με τον CCoV *in vitro* απομόνωσής του, σε περίπτωση παρουσίας του στο πρωτογενές υλικό. Ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο με αυτό του έμμεσου ανοσοφθορισμού για CCoV, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε στο πρώτο στάδιο πολυκλωνικός ορός κατά του CPV-2 από κουνέλι (ευγενική προσφορά του καθηγητή C. Buonavoglia) σε αραιώση 1:100, ενώ στο δεύτερο στάδιο IgG αντισώματα κατά των αντισωμάτων του κουνελιού συνδεδεμένα με ισοθιοκυανική φλουοροσεΐνη (anti-cat IgG FITC-antibody) (DAKO-immunoglobulins, Denmark), σε αραιώση 1:100.

2.17 Τιτλοποίηση των στελεχών CCoV

Για την τιτλοποίηση των στελεχών χρησιμοποιήθηκε η ίδια συνεχής κυτταρική σειρά και τα ίδια αντιδραστήρια, όπως παραπάνω. Παράλληλα, έγινε χρήση πλακών των 96 βοθρίων, κατάλληλων για την καλλιέργεια κυττάρων (Greiner bio one, Germany).

Η τιτλοποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν έλαβε χώρα στην τρίτη δίοδο του ιού, με την εφαρμογή της μεθόδου προσδιορισμού της μέσης λοιμογόνου δόσης του ιού. Συγκεκριμένα, σε πλάκες κυτταροκαλλιεργειών των 96 βοθρίων, τοποθετήθηκαν κύτταρα A72. Παράλληλα, σε μία σειρά περιεκτών έγιναν διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις (10^0 έως 10^{-7}) του ιού από την 3^η δίοδο, χρησιμοποιώντας ως αραιωτικό το Dulbecco's MEM. Η τιτλοποίηση γινόταν στην 3^η δίοδο του ιού, με στόχο τον προσδιορισμό του τίτλου του και ενδεχόμενη χρήση αυτού στο μέλλον σε πειραματικές μολύνσεις. Όταν στην πλάκα σχηματιζόταν ταπήτιο πληρότητας 70%-80% γινόταν ο ενοφθαλμισμός του ιού. Από κάθε αραιώση ενοφθαλμιζόνταν 4 βοθρία (50μl/βοθρίο) και ακολουθούσε επώαση σε συνθήκες ανάλογες με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν στην απομόνωση των στελεχών. Σε τέσσερα βοθρία τοποθετήθηκαν 50 μl Dulbecco's MEM, δίχως ιό, για να χρησιμοποιηθούν ως αρνητικός μάρτυρας της μεθόδου. Μετά την επώαση, σε όλα τα βοθρία προσθέτονταν 150 μl Dulbecco's MEM και η πλάκα τοποθετούνταν στον επωαστήρα. Καθημερινά παρατηρούνταν για την ύπαρξη κυτταροπαθογόνου δράσης του ιού, ενώ η εκτίμηση του τίτλου γινόταν μετά το πέρας πέντε 24ώρων. Για την εύρεση του τίτλου του ιού

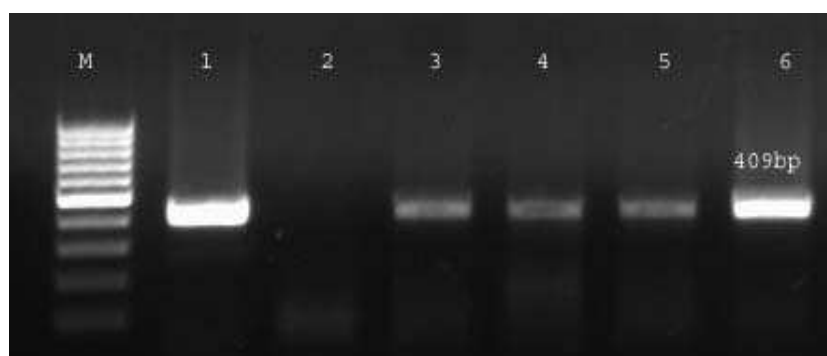
έγινε χρήση του τύπου του Karber. Ο τίτλος του ιού εκφράστηκε ως η μέση λοιμογόνος δόση για την κυτταροκαλλιέργεια (Tissue culture infectious dose₅₀, TCID₅₀).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

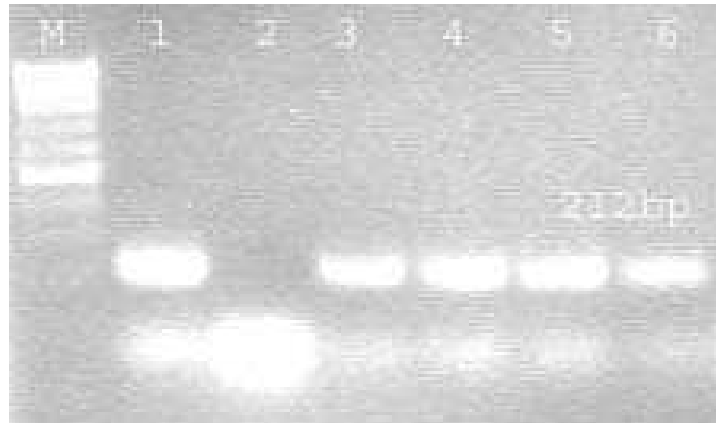
3.1 ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ CCoV ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΣΤΑ ΚΟΠΡΑΝΑ ΤΩΝ ΣΚΥΛΩΝ

3.1.1 Ανίχνευση του CCoV και χαρακτηρισμός των τύπων με RT-PCR

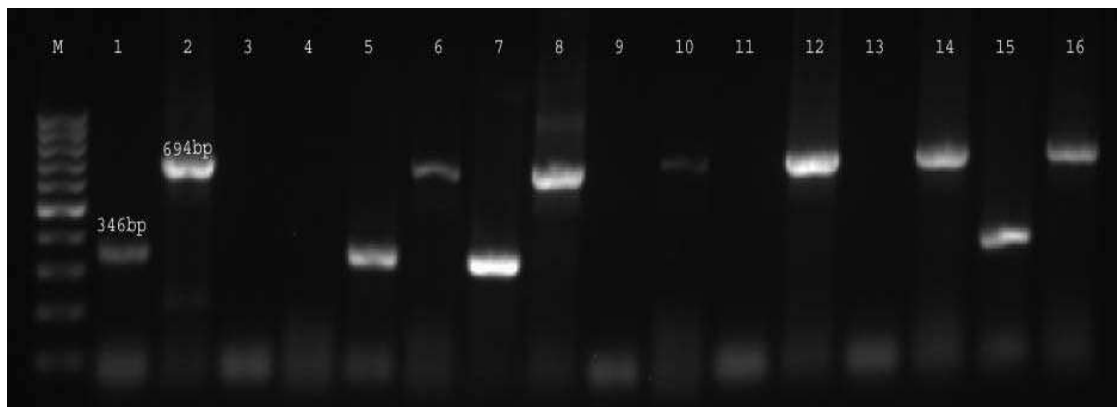
Από το σύνολο 206 δειγμάτων κοπράνων που συλλέχθηκαν από σκύλους με οξεία διάρροια, ο CCoV ανιχνεύθηκε με την ημιένθετη RT-PCR σε 130 δείγματα (Εικόνες 6α και 6β). Με τις ειδικές του τύπου RT-PCRs, ο τύπος I ανιχνεύθηκε σε 91 από τα 130 θετικά δείγματα και ο τύπος II σε 87 (Εικόνα 7) (Πίνακας 1, Παράρτημα).



Εικόνα 6α. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της πρώτης φάσης της ημιένθετης RT-PCR για την ανίχνευση του CCoV. Αριστερά (M) διακρίνεται ο δείκτης μοριακού βάρους ανά 100 ζεύγη βάσεων. Στις διαδρομές 1 και 2 ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας αντίστοιχα, ενώ στις διαδρομές 3, 4, 5 και 6 βρίσκονται 4 θετικά δείγματα. Το προϊόν έχει μήκος 409 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 6β. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της δεύτερης φάσης της ημιένθετης (RT-) PCR για την ανίχνευση του CCoV. Αριστερά (M) διακρίνεται ο δείκτης μοριακού βάρους ανά 100 ζεύγη βάσεων. Στις διαδρομές 1 και 2 ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας αντίστοιχα, ενώ στις διαδρομές 3, 4, 5 και 6 βρίσκονται 4 θετικά δείγματα. Το προϊόν έχει μήκος 212 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 7. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της RT-PCR για το χαρακτηρισμό του τύπου του CCoV. Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους ανά 100 ζεύγη βάσεων. Διαδρομές 1 και 2: θετικοί τύπου I και τύπου II μάρτυρες. Διαδρομές 3-4: αρνητικοί μάρτυρες. Διαδρομές 5-16: δείγματα θετικά στον CCoV ανά ζεύγη (5-6, 1 δείγμα, κ.ο.κ.). Το προϊόν έχει μήκος 346 ζεύγη βάσεων για τον τύπο I και 694 ζεύγη βάσεων για τον τύπο II.

3.1.2 Ανίχνευση του CCoV και χαρακτηρισμός των τύπων με real time (RT-) PCRs σύγκριση αυτών με τις αντίστοιχες RT-PCRs

Από το σύνολο των 206 δειγμάτων κοπράνων που συλλέχθηκαν από σκύλους με οξεία διάρροια, ο CCoV ανιχνεύθηκε σε 132 δείγματα με τη real time (RT-) PCR. Από το σύνολο των 134 θετικών δειγμάτων με RT-PCR ή/και real time (RT-) PCR, 4

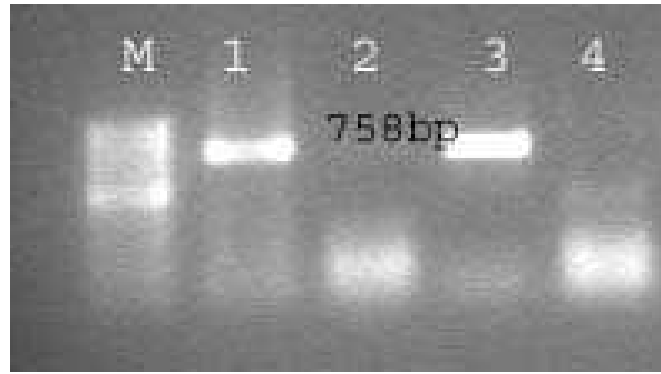
δείγματα βρέθηκαν θετικά μόνο με τη real time (RT-) PCR και 2 μόνο με την RT-PCR, ενώ τα υπόλοιπα 128 ήταν θετικά και με τις δύο μεθόδους (Πίνακας 1, Παράρτημα).

Στο σύνολο των 134 θετικών δειγμάτων [με RT-PCR ή/και real time (RT-) PCR], έγινε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του CCoV τύπου I, με real time (RT-) PCR, σε 97 δείγματα. Από το σύνολο των 99 θετικών, τύπου I, δειγμάτων [με RT-PCR ή/και real time (RT-) PCR], 8 δείγματα βρέθηκαν θετικά για CCoV τύπο I μόνο με τη real time (RT-) PCR, 2 δείγματα μόνο με τη RT-PCR και τα υπόλοιπα 89 ήταν θετικά και με τις δύο μεθόδους (Πίνακας 1, Παράρτημα).

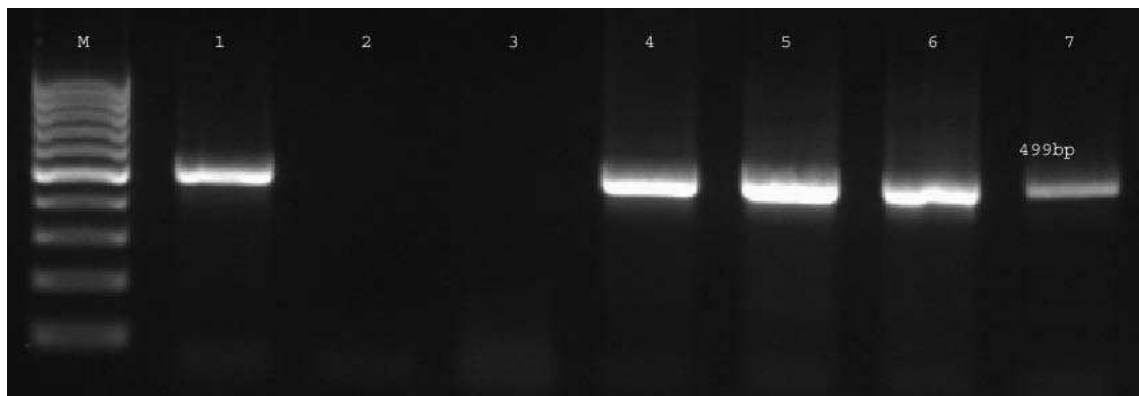
Στα σύνολο των 134 θετικών δειγμάτων [με RT-PCR ή/και real time (RT-) PCR], έγινε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του CCoV τύπου II, με real time (RT-) PCR, σε 87 δείγματα. Από το σύνολο των 94 θετικών, τύπου II, δειγμάτων [με RT-PCR ή/και real time (RT-) PCR], 7 δείγματα βρέθηκαν θετικά για CCoV τύπο II μόνο με τη real time (RT-) PCR, 7 δείγματα μόνο με τη RT-PCR και τα υπόλοιπα 80 ήταν θετικά και με τις δύο μεθόδους (Πίνακας 1, Παράρτημα).

3.1.3 Διαφοροποίηση του υποτύπου CCoVIIa από τον CCoVIIb και του υποτύπου CCoVIIb από τον TGEV με RT-PCR

Στα σύνολο των 94 θετικών δειγμάτων για CCoV τύπο II [με RT-PCR ή/και real time (RT-) PCR], ο υπότυπος CCoVIIa ανιχνεύθηκε σε 72 δείγματα, ο υπότυπος CCoV IIb σε 11 δείγματα, ενώ μεικτές μολύνσεις με τους δύο υποτύπους ήταν παρούσες σε 10 δείγματα. Ένα από τα δείγματα (85/08) δεν χαρακτηρίστηκε. Κατά τη διαφοροποίηση του CCoVIIb από τα TGEV στελέχη με την RT-PCR, διαπιστώθηκε ότι όλα τα δείγματα ήταν CCoVIIb στελέχη. Στελέχη του TGEV δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα δείγμα (Εικόνες 8α, 8β και 8γ) (Πίνακας 1, Παράρτημα).



Εικόνα 8α. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της RT-PCR για την ανίχνευση του υποτύπου CCoVIIa. Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους ανά 100 ζεύγη βάσεων. Διαδρομή 1: θετικός CCoVIIa μάρτυρας. Διαδρομές 2,3: δείγματα. Διαδρομή 4: αρνητικός μάρτυρας. Το προϊόν έχει μήκος 758 ζεύγη βάσεων.



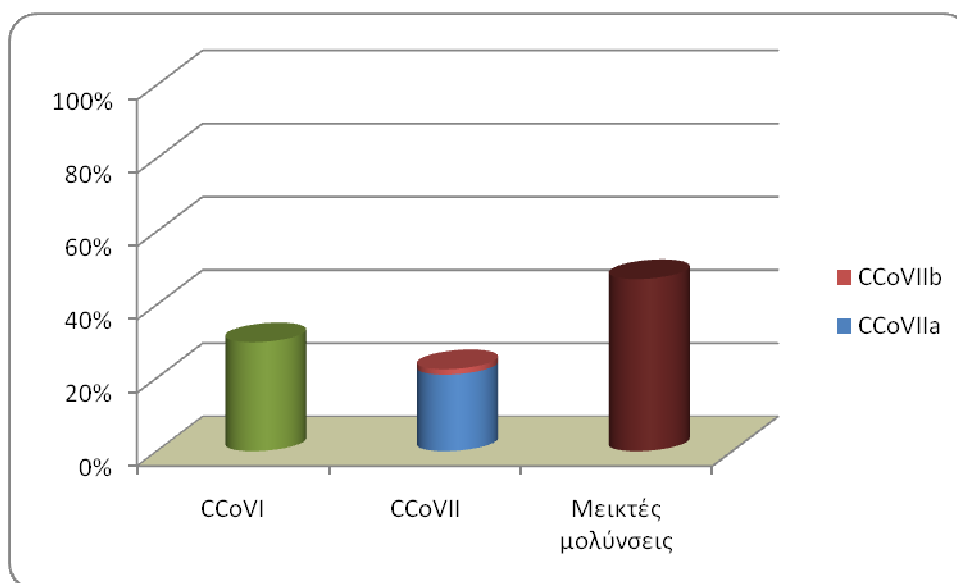
Εικόνα 8β. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της RT-PCR για την ανίχνευση του υποτύπου CCoVIIb. Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους ανά 100 ζεύγη βάσεων. Διαδρομή 1: θετικός CCoVIIb μάρτυρας. Διαδρομή 2: αρνητικός μάρτυρας. Διαδρομές 3-7: δείγματα αρνητικά (3) και θετικά (4-7) για CCoVIIb. Το προϊόν έχει μήκος 499 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 8γ. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της RT-PCR για τη διαφοροποίηση του υποτύπου CCoVIIb από τους TGEV. Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους (250 έως 10.000 ζεύγη βάσεων). Διαδρομή 1: θετικός CCoVIIb μάρτυρας. Διαδρομή 2: θετικός TGEV μάρτυρας. Διαδρομή 3: αρνητικός μάρτυρας. Διαδρομές 4-5: δείγματα θετικά για CCoVIIb.

3.1.4 Παράλληλη ερμηνεία των αποτελεσμάτων των RT-PCRs και των real time (RT-) PCRs

Για την εξαγωγή επιζωοτιολογικών συμπερασμάτων εφαρμόστηκε παράλληλη ερμηνεία των αποτελεσμάτων των παραπάνω μεθόδων, καθώς είναι δυνατό να παρατηρούνται ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, είτε λόγω της συχνής εμφάνισης μεταλλάξεων στο γονιδίωμα του CCoV, είτε λόγω της χαμηλής προγνωστικής αξίας των αρνητικών αποτελεσμάτων των παραπάνω μεθόδων (Πίνακας 1, Παράρτημα). Με παράλληλη λοιπόν ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ο CCoV βρέθηκε σε 134 (65,05%) από τα 206 δείγματα κοπράνων σκύλων. Από τα 134 θετικά δείγματα, τα 40 (29,85%) χαρακτηρίστηκαν ως CCoV τύπος I, τα 30 (22,39%) ως CCoV τύπος II και τα 63 (47,01%) βρέθηκε ότι αποτελούσαν μεικτές μολύνσεις μεταξύ των τύπων και υποτύπων του CCoV (Γράφημα 1). Ένα από τα δείγματα (85/08) δεν χαρακτηρίστηκε (0,75%). Από τα 30 δείγματα που χαρακτηρίστηκαν ως CCoV τύπος II, τα 28 (93,33%) χαρακτηρίστηκαν ως κλασικός κοροναϊός του σκύλου (CCoVIIa) και τα 2 (6,67%) ως CCoVIIb (Πίνακας1, Παράρτημα). Τα ποσοστά ανίχνευσης του κάθε τύπου και υποτύπου, στο σύνολο των θετικών δειγμάτων, φαίνονται στον Πίνακα 7.



Γράφημα 1. Ποσοστά ανίχνευσης CCoV τύπων I και II και μεικτών μολύνσεων στο σύνολο των θετικών δειγμάτων.

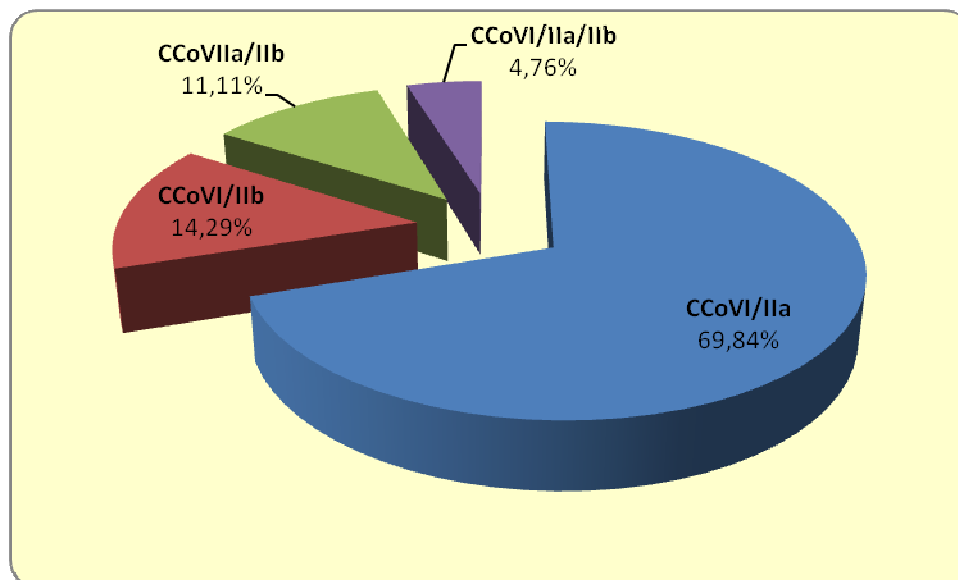
Πίνακας 7. Τιμές και ποσοστά (επί του συνόλου των δειγμάτων) ανίχνευσης του κάθε τύπου και υποτύπου στο σύνολο των δειγμάτων.

	Σύνολο δειγμάτων	CCoV	CCoVI	CCoVIIa	CCoVIIb
Αριθμός θετικών δειγμάτων	206	134	99	82	21
Ποσοστά (%)		65,05	48,05	39,8	10,2

Από το σύνολο των δειγμάτων, τα πρόσφατα αναγνωρισμένα CCoVIIb στελέχη ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό 10,2% του συνολού των θετικών δειγμάτων (Πίνακας 7). Τα συγκεκριμένα στελέχη ανιχνεύτηκαν σε δείγματα που προέρχονταν από τους νομούς Αττικής και Θεσσαλονίκης, από δεσποζόμενα ζώα ή ζώα που διαβιούσαν είτε σε κυνοκομεία είτε σε καταστήματα πώλησης ζώων συντροφιάς (Πίνακας 1, Παράρτημα).

Από το σύνολο των μεικτών μολύνσεων, οι 44 (69,84%) χαρακτηρίζονταν από την παρουσία του CCoV τύπου I και του υποτύπου CCoVIIa, οι 9 (14,29%) από την

παρουσία του CCoV τύπου I και του υποτύπου CCoVIIIb, οι 7 (11,11%) από την παρουσία και των δύο υποτύπων και οι 3 (4,76%) από την παρουσία του CCoV τύπου I και των δύο υποτύπων (CCoVIIa και CCoVIIIb) (Γράφημα 2).



Γράφημα 2. Μεικτές μολύνσεις του CCoV. Διακρίνονται τα ποσοστά των διαφόρων, μεταξύ των τύπων και υποτύπων του CCoV, συνδυασμών.

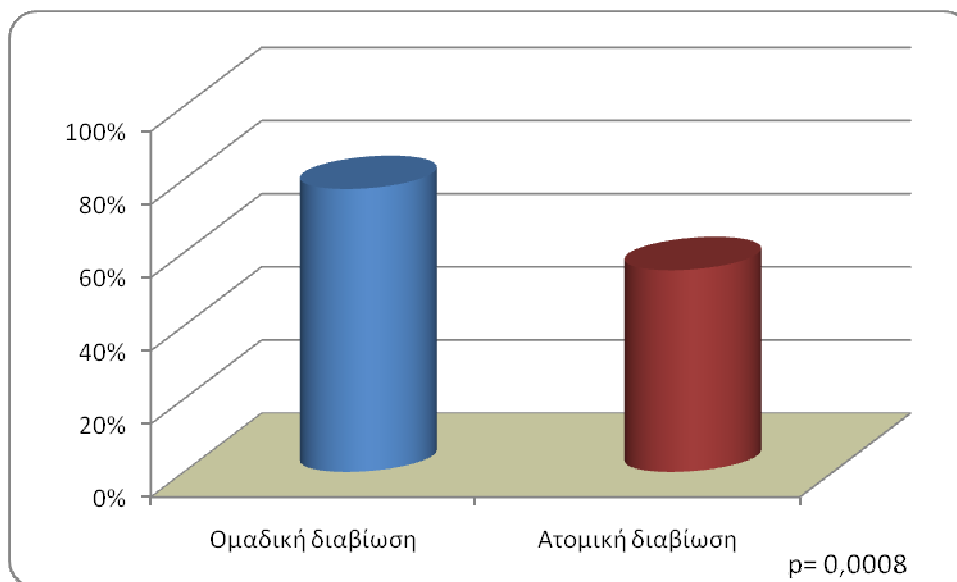
Ένα από τα δείγματα, το 85/08, βάσει του γεγονότος ότι με τη RT-PCR χαρακτηρίζονταν ως CCoV τύπος II και με τη real time RT-PCR ως CCoV τύπος I, δεν χαρακτηρίστηκε, αλλά θεωρήθηκε ότι αποτελούσε προϊόν ανασυνδυασμού μεταξύ των δύο τύπων.

Τέλος, θετικά στον CCoV δείγματα ανιχνεύτηκαν σε όλες τις περιοχές, από τις οποίες έλαβε χώρα η δειγματοληψία (νομός Αττικής, νομοί της βόρειας και της κεντρικής Ελλάδας, καθώς και η Κρήτη) (Πίνακας 1, Παράρτημα).

3.1.5 Ποσοστά ανίχνευσης του ιού σε σκύλους που διαβιούσαν ατομικά ή ομαδικά

Το σύνολο των σκύλων χωρίστηκε σε δύο ομάδες, σε αυτούς που διαβιούσαν ομαδικά κατά την εμφάνιση της οξείας διάρροιας (κνυκομεία, pet shops) και σε αυτούς που διαβιούσαν ατομικά (δεσποζόμενοι σκύλοι ιδιωτών, που προσκομίστηκαν σε κλινικές). Ο CCoV ανιχνεύθηκε στα κόπρανα σε 99 (77,34%) από τους 128 σκύλους που διαβιούσαν ομαδικά και σε 43 (55,13%) από τους 78 δεσποζόμενους

σκύλους. Κατά τη σύγκριση των ποσοστών των θετικών ζώων μεταξύ των δύο ομάδων παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 3).

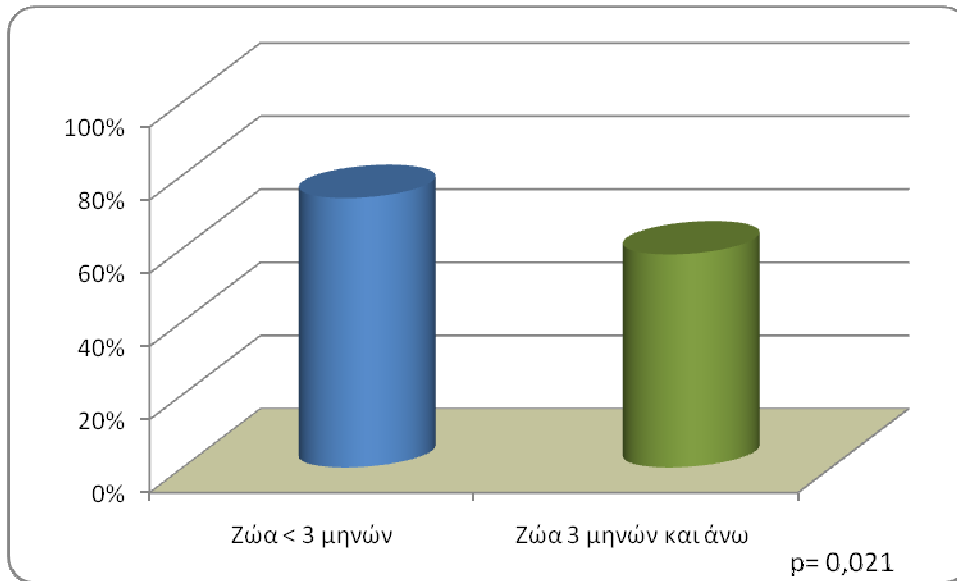


Γράφημα 3. Ποσοστό ανίχνευσης του CCoV στα ζώα που διαβιούσαν ομαδικά και ατομικά

Από το σύνολο των ομαδικών κρουσμάτων οξείας διάρροιας που παρατηρήθηκαν στα κυνοκομεία, μόνο σε μία περίπτωση (κυνοκομείο Αττικής, δείγματα 41/09-57/09, Πίνακας 1, Παράρτημα) δεν ανιχνεύτηκε ο CCoV σε κανένα από τα ζώα.

3.1.6 Ποσοστά ανίχνευσης του ιού σε σκύλους δύο ηλικιακών ομάδων

Το σύνολο των σκύλων χωρίστηκε σε δύο ομάδες, ηλικίας μικρότερης των 3 μηνών και από 3 μηνών και άνω. Ο CCoV ανιχνεύθηκε στα κόπρανα σε 67 (73,63%) από τους 91 σκύλους κάτω των 3 μηνών και σε 67 (58,26%) από τους 115 σκύλους 3 μηνών και άνω. Όπως φαίνεται και στο γράφημα 4, το ποσοστό των σκύλων με οξεία διάρροια στους οποίους ανιχνεύεται ο CCoV μειώνεται με την ηλικία και η μείωση αυτή είναι στατιστικώς σημαντική.



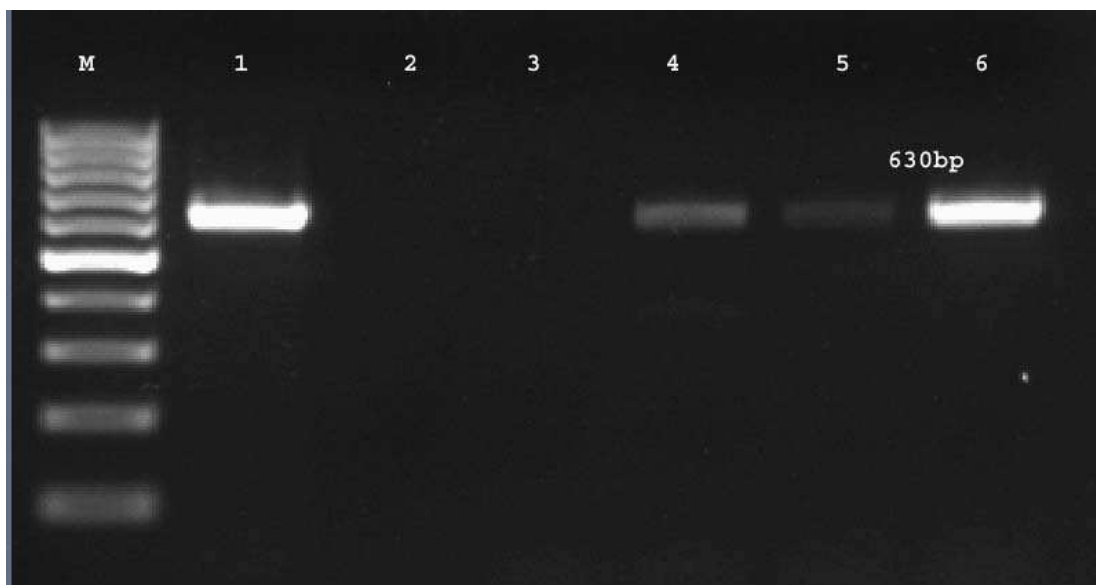
Γράφημα 4. Ποσοστά ανίχνευσης CCoV στα ζώα των δύο ηλικιακών ομάδων.

Το ζώο με τη μεγαλύτερη ηλικία στο οποίο ανιχνεύθηκε ο CCoV (CCoVIIa), σε υψηλή μάλιστα συγκέντρωση, ήταν ο σκύλος 98/08 ηλικίας 12 ετών. Το ζώο διαβιούσε σε pet shop κατά την εκδήλωση επιζωοτικού κρούσματος οξείας διάρροιας (Πίνακας 1, Παράρτημα). Όλα τα υπόλοιπα ζώα της περίπτωσης αυτής ήταν ηλικίας 2 μηνών.

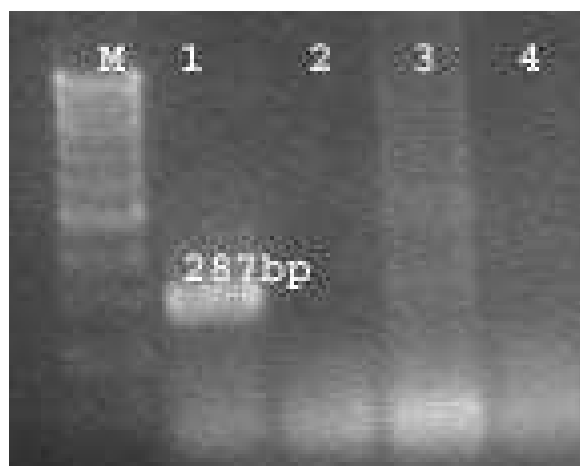
3.1.7 Ανίχνευση άλλων ιών σε ζώα με CCoV στα κόπρανα

Από τα 21 ζώα, που προέρχονταν από τις 3 επαναλαμβανόμενες επιζωοτίες οξείας διάρροιας των νεοεισερχομένων κουταβιών κυνοκομείου των Τρικάλων, ο CPV-2 ανιχνεύθηκε στα κόπρανα όλων των ζώων (01/07, 02/07, 03/07, 04/07, 06/07, 01/08-05/08) των δύο πρώτων επιζωοτιών, ενώ στην 3^η επιζωοτία μόνο σε ένα μόνο ζώο (58/08) (Εικόνα 9) (Πίνακας 1, Παράρτημα). Όλα τα στελέχη του χαρακτηρίστηκαν ως CPV-2a άγρια στελέχη. Ο ιός της νόσου του Carré και οι αδενοϊοί του σκύλου δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα από τα δείγματα (Εικόνες 10 και 11).

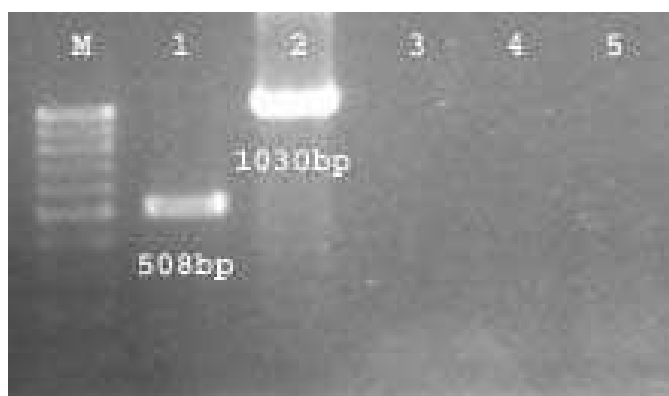
Ο CPV-2, και συγκεκριμένα CPV-2a άγριο στέλεχος, ανιχνεύθηκε και στα κόπρανα ενός άλλου σκύλου, του 99/08, ο οποίος δεν προερχόταν από το κυνοκομείο των Τρικάλων. Ο ιός της νόσου του Carré και οι αδενοϊοί του σκύλου δεν ανιχνεύθηκαν.



Εικόνα 9. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του CPV-2. Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους ανά 100 ζεύγη βάσεων. Διαδρομή 1: θετικός μάρτυρας. Διαδρομή 2: αρνητικός μάρτυρας. Διαδρομές 3-6: δείγματα αρνητικά (3) και θετικά (4-6) στον CPV-2. Το προϊόν έχει μήκος 630 ζεύγη βάσεων.



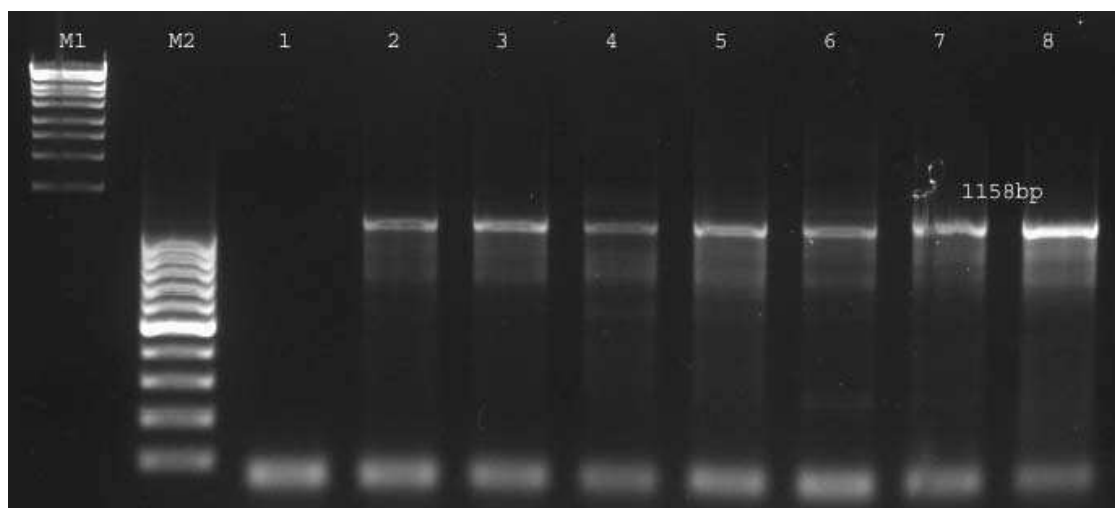
Εικόνα 10. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της RT-PCR για την ανίχνευση του CDV. Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους ανά 100 ζεύγη βάσεων. Διαδρομή 1: θετικός μάρτυρας. Διαδρομή 2: αρνητικός μάρτυρας. Διαδρομές 3-4: δείγματα. Το προϊόν έχει μήκος 287 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 11. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση των CAV-1 και CAV-2. Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους ανά 100 ζεύγη βάσεων. Διαδρομές 1, 2: θετικοί μάρτυρες CAV-1 και CAV-2. Διαδρομή 3: αρνητικός μάρτυρας. Διαδρομές 4, 5: δείγματα. Τα προϊόντα έχουν μήκος 508 και 1.030 ζεύγη βάσεων, αντίστοιχα.

3.1.8 Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών του CCoV τύπου I

Με τη χρήση της RT-PCR και ζεύγος εκκινητών το PolEnd/1060dR, ενισχύθηκε το 3'-άκρο του γονιδίου της πολυμεράσης (ORF1b) και το 5'-άκρο του γονιδίου S 15 στελεχών του CCoV τύπου I (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της RT-PCR για την ενίσχυση του 5'-άκρου του γονιδίου S του τύπου I του CCoV. Διαδρομή M1: δείκτης μοριακού βάρους (1.500 έως 10.000 ζεύγη βάσεων). Διαδρομή M2: δείκτης μοριακού βάρους ανά 100 ζεύγη βάσεων (100 ζεύγη βάσεων -1000 ζεύγη βάσεων). Διαδρομή 1: αρνητικός μάρτυρας. Διαδρομές 2-7: δείγματα θετικά στον CCoV τύπο I. Διαδρομή 8: θετικός μάρτυρας. Το προϊόν έχει μήκος 1.158 ζεύγη βάσεων.

Μετά τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 15 στελεχών CCoV τύπου I, αυτές χαρακτηρίστηκαν ως S γονιδιακές περιοχές του CCoV τύπου I μετά από την εφαρμογή του αλγόριθμου BLAST. Το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας παρατηρήθηκε σε σύγκριση είτε με το 23/03 είτε με το Elmo/02 (στελέχη αναφοράς του CCoV τύπου I). Μετά από πολλαπλή στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και υπολογισμό των ομοιοτήτων σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, διαπιστώθηκαν τα εξής: τα ελληνικά στελέχη εμφάνιζαν μεταξύ τους ομοιότητα 64,1%-99,8% σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (νουκλεοτίδια 1-1.008 του 5'-άκρου του γονιδίου S, στέλεχος 23/03, AY307021) και 60,6%-99,6% σε επίπεδο αμινοξέων (αμινοξέα 1-336 του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης S, στέλεχος 23/03, AY307021) (Παράρτημα, Πίνακας 2).

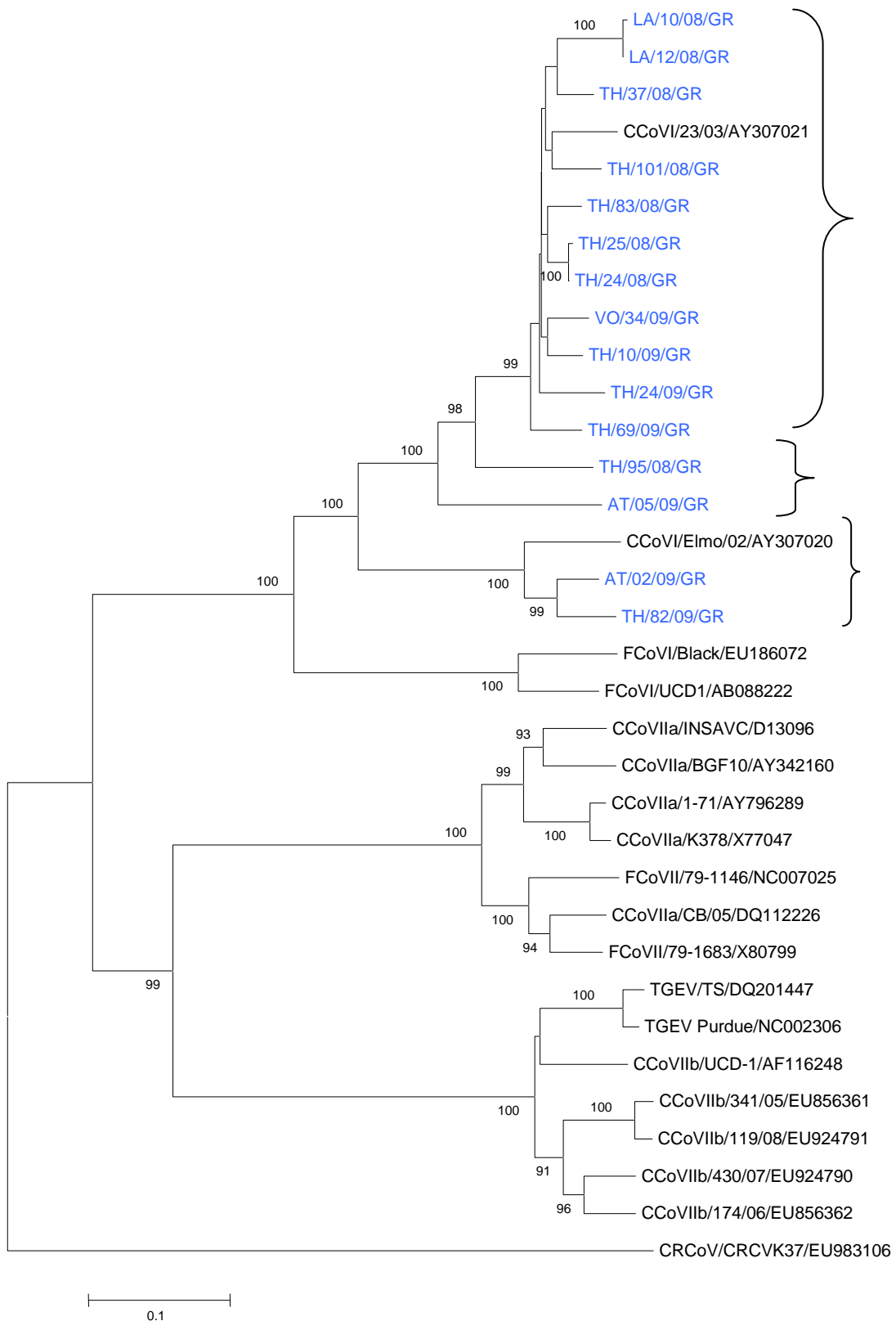
Από τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών με τη μέθοδο «Ένωσης Γειτόνων», το σύνολο των ελληνικών τύπου I CCoV των οποίων έγινε αλληλούχηση χωρίστηκε σε 2 μεγάλες ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλάμβανε τα στελέχη VO/34/09/GR, TH/10/09/GR, TH/24/09/GR, TH83/08/GR, TH/24/08/GR, TH/25/08/GR, TH/37/08/GR, TH101/08/GR, LA/10/08/GR, LA/12/08/GR, TH/69/09/GR και το στέλεχος αναφοράς 23/03 και η δεύτερη τα στελέχη AT/02/09/GR TH/82/09/GR και το στέλεχος αναφοράς Elmo/02. Δύο από τα στελέχη, τα TH/95/08/GR και AT/05/09/GR, διαπιστώθηκε ότι βρίσκονταν ανάμεσα στους κλάδους που σχηματίζονταν με βάση τα δύο τύπου I στελέχη αναφοράς (Εικόνα 13). Από την αλληλούχηση των αμινοξέων του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης S διαπιστώθηκε ότι τα στελέχη αυτά, καθώς και το TH/69/09/GR (το οποίο βρισκόταν στην άκρη του κλάδου) εμφάνιζαν ομοιότητες και με τα δύο στελέχη αναφοράς, σε διαφορετικές περιοχές (Εικόνα 1, Παράρτημα).

Τα στελέχη LA/10/08/GR και LA/12/08/GR, τα οποία ανιχνεύτηκαν σε κουτάβια από το ίδιο κρούσμα επιζωοτικής διάρροιας του κυνοκομείου της Λάρισας (Ιανουάριος 2008) (Πίνακας 1, Παράρτημα), σχηματίζουν ένα μικρότερο κλάδο, μέσα στην ομάδα με στέλεχος αναφοράς το 23/03.

Τα στελέχη AT/02/09/GR και AT/05/09/GR, τα οποία ανιχνεύτηκαν σε κουτάβια από το ίδιο κρούσμα επιζωοτικής διάρροιας σε κατάστημα πώλησης ζώων στην Αθήνα, δεν βρίσκονταν στην ίδια ομάδα (Εικόνα 13). Το στέλεχος AT/05/09/GR, μετά από αλληλούχηση των αμινοξέων του αμινοτελικού άκρου της

πρωτεΐνης S, διαπιστώθηκε ότι εμφάνιζε συντηρημένες περιοχές και με τα δύο στελέχη αναφοράς (23/03 και Elmo/02).

Επίσης, από το φυλογενετικό δέντρο φαίνεται ότι όλα τα στελέχη που ενισχύθηκαν αποτελούν CCoV τύπου I, που συγκροτεί ένα μεγάλο κλάδο με τον FCoV τύπου I. Στο φυλογενετικό δέντρο διακρίνονται δύο ακόμα μεγάλοι κλάδοι, αυτός που περιλαμβάνει τα στελέχη του CCoVIIa και τα στελέχη του FCoV, καθώς και αυτός που περιλαμβάνει στελέχη αναφοράς του TGEV και του CCoVIIb.

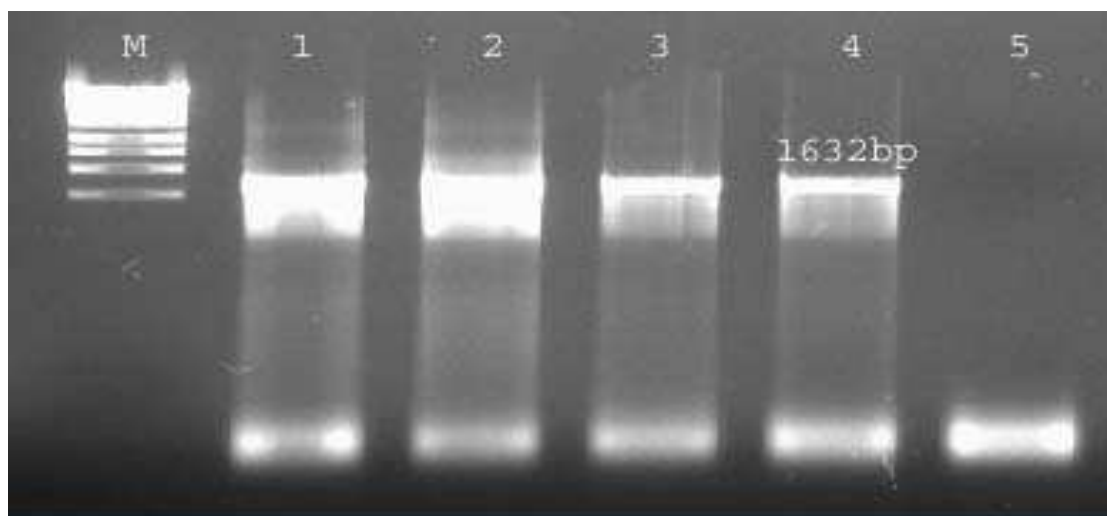


Εικόνα 13. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης S με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0. Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών

αξιολογήθηκε με 1.000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps» οι οποίες αναφέρονται σε ποσοστά επί τοις %, ενώ αναγράφονται όσες είναι πάνω από 60. Τα άγκιστρα έχουν τοποθετηθεί στις δύο ομάδες με τα στελέχη αναφοράς 23/03 και E1mo/02, καθώς και στα 3 ελληνικά στελέχη που βρίσκονται ενδιάμεσα. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανά θέση. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται οι ελληνικοί τύπου I CCoV_s. Η κωδικοποίηση των ελληνικών CCoV_s τύπου I είναι η εξής: TH (Θεσσαλονίκη), AT (Αθήνα), VO (Βόλος), LA (Λάρισα). Στο δέντρο χρησιμοποιήθηκε ως παραομάδα το στέλεχος CRCVK37 του αναπνευστικού κοροναϊού του σκύλου.

3.1.9 Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών του CCoV_{IIa}

Με τη χρήση της RT-PCR και ζεύγος εκκινητών το E1-Ins1/S2 ενισχύθηκε το 3'-άκρο του γονιδίου της πολυμεράσης (ORF1b) και το 5'-άκρο του γονιδίου S, 19 στελεχών του CCoV_{IIa} (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της RT-PCR για την ενίσχυση του 5'-άκρου του γονιδίου S του CCoV_{IIa}. Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους (1.500 έως 10.000 ζεύγη βάσεων). Διαδρομή 1: θετικός μάρτυρας. Διαδρομές 2-4: δείγματα θετικά στον CCoV_{IIa}. Διαδρομή 5: αρνητικός μάρτυρας. Το προϊόν έχει μήκος 1.632 ζεύγη βάσεων.

Μετά τον προσδιορισμό των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών 19 στελεχών CCoV τύπου II (υποτύπου a), αυτές χαρακτηρίστηκαν ως S γονιδιακές περιοχές του CCoV_{IIa}, μετά από την εφαρμογή του αλγόριθμου BLAST. Το υψηλότερο ποσοστό

ομοιότητας το εμφάνιζαν είτε με το στέλεχος του CCoV Πα, CB/05 (DQ12226), είτε με το BGF10 (AY342160). Μετά από πολλαπλή στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και υπολογισμό των ομοιοτήτων σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, διαπιστώθηκαν τα εξής: τα ελληνικά στελέχη εμφάνιζαν μεταξύ τους ομοιότητα 79,8%-100% σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (νουκλεοτίδια 1-1.458 του 5'-άκρου του γονιδίου S, στέλεχος CB/05, DQ12226) και 77,7%-100% σε επίπεδο αμινοξέων (αμινοξέα 1-486 του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης S, στέλεχος CB/05, DQ12226) (Πίνακας 3, Παράρτημα).

Από τα 19 αυτά στελέχη, τα 5 προέρχονταν από το κυνοκομείο των Τρικάλων, και συγκεκριμένα από τις ομαδικές επιζωοτίες οξείας διάρροιας με διαφορά μηνών, που προαναφέρθηκαν. Οι ιοί TR/01/07/GR και TR/02/07/GR ήταν από ζώα του περιστατικού του Δεκέμβρη του 2007, ο ιός TR/01/08/GR από ζώο της επιζωοτίας του Ιανουαρίου του 2008 και οι TR/56/09/GR και TR/59/09/GR από δύο ζώα της επιζωοτίας του Απριλίου του ίδιου έτους. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3 του Παραρτήματος, τα ποσοστά ομοιότητας μεταξύ των στελεχών σε επίπεδο νουκλεοτιδίων ήταν 99,7%-100% και σε επίπεδο αμινοξέων 99,1%-100%.

Τα ελληνικά στελέχη, εξαιρώντας το στέλεχος ED/99/08/GR, εμφάνιζαν υψηλό ποσοστό ομοιότητας μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ τους τόσο σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, όσο και σε αμινοξέων ήταν από 96,9% έως 100%.

Από τα στελέχη, αυτό που παρουσίαζε το χαμηλότερο ποσοστό ομοιότητας, σε επίπεδο νουκλεοτιδίων αλλά και σε επίπεδο αμινοξέων, με τα υπόλοιπα ελληνικά, καθώς και με τα δύο στελέχη αναφοράς, ήταν το ED/99/08/GR. Με την εφαρμογή του αλγόριθμου BLAST, εμφάνιζε το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας (84%) με το στέλεχος CCoV BGF10, το 1-71, το INSAVC (D13096), καθώς και με τα στελέχη GZ43/2003 (raccoon dog, EF192155) και CCoV Giant Panda (AY436637) που ανιχνεύθηκαν στα αντίστοιχα ζώα. Από την αλληλούχιση των νουκλεοτιδίων του στελέχους ED/99/08/GR με τα παραπάνω στελέχη, καθώς και με άλλα στελέχη CCoV Πα και FCoV II προέκυψε ότι το στέλεχος αυτό, σε επίπεδο αμινοξέων εμφάνιζε έντονη παραλλακτικότητα στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης S, καθώς και προσθήκες αμινοξέων σε τρεις θέσεις. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε προσθήκη δύο αμινοξέων στις θέσεις 69-70 [ασπαραγίνη (N) και ισολευκίνη (I)], δύο στις θέσεις

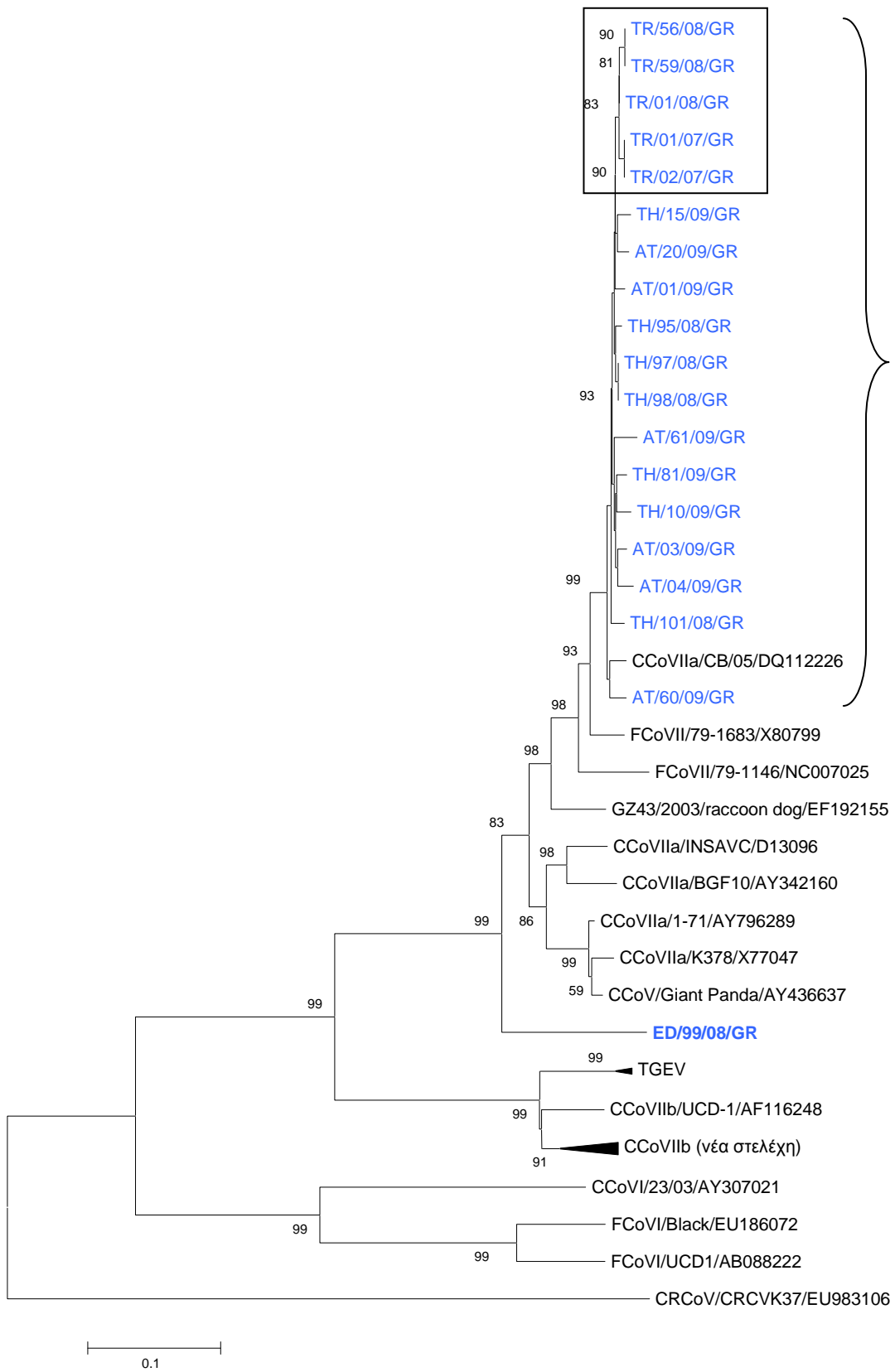
147-148 [προλίνη (P) και σερίνη (S)] και τεσσάρων στις θέσεις 387-390 [θρεονίνη (T), λευκίνη (L), ισολευκίνη (I) και γλουταμινικό οξύ (E)] (Εικόνα 2, Παράρτημα).

Επιπλέον, δύο από τα ελληνικά στελέχη CCoVIIa, εμφάνιζαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην αλληλουχία των αμινοξέων τους. Συγκεκριμένα το στέλεχος AT/03/09/GR εμφάνιζε στη θέση 73 το αμινοξύ προλίνη, ενώ το στέλεχος TH/10/09/GR εμφάνιζε ασπαραγίνη στη θέση 125. Τα αμινοξέα αυτά στις δύο παραπάνω θέσεις έχουν παρατηρηθεί μέχρι στιγμής μόνο στο στέλεχος αναφοράς CB/05 και σε κανένα άλλο ελληνικό στέλεχος (Εικόνα 3, Παράρτημα).

Από τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών με τη μέθοδο «Ένωσης Γειτόνων» (Εικόνα 15), το σύνολο των ελληνικών CCoVIIa σχημάτισε ένα μεγάλο κλάδο στον οποίο συμπεριλαμβανόταν και το στέλεχος αναφοράς CB/05. Μέσα στον κλάδο αυτό διαπιστώθηκε μικρότερος κλάδος, ο οποίος απαρτιζόταν από τους ιούς που ανιχνεύτηκαν στα τρία κρούσματα επιζωοτικής διάρροιας στο κυνοκομείο των Τρικάλων, οι οποίοι επιπλέον σχημάτιζαν μικρότερους κλάδους, ανάλογα με το κρούσμα.

Στο δέντρο διαπιστώθηκαν τρεις κύριοι κλάδοι. Ένας από αυτούς σχηματιζόταν από τα στελέχη FCoV και CCoV τύπου I, ένας από τα TGEV και CCoVIIb και ένας από τα στελέχη CCoVIIa και FCoV τύπου II.

Από τη φυλογενετική ανάλυση, διαπιστώθηκε επίσης, ότι το στέλεχος ED/99/08/GR, παρ' όλο που συμπεριλαμβανόταν στον κλάδο των CCoVIIa και των FCoV στελεχών, αποτελούσε αποκλίνον στέλεχος, γεγονός το οποίο είναι σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις, όσον αφορά στη στοίχιση των αλληλουχιών των αμινοξέων του στελέχους αυτού, με στελέχη αναφοράς.



Εικόνα 15. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης S με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0. Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1.000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps» οι οποίες αναφέρονται σε ποσοστά επί τοις %, ενώ αναγράφονται όσες είναι πάνω από 60. Το άγκιστρο έχει τοποθετηθεί στον κλάδο με τους ελληνικούς CCoVIIa και το στέλεχος αναφοράς CB/05. Στο ορθογώνιο έχουν συμπεριληφθεί οι ιοί που ανιχνεύθηκαν στα τρία κρούσματα επιζωοτικής διάρροιας στα Τρίκαλα. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται οι ελληνικοί CCoVIIa. Με έντονα γράμματα επισημαίνεται το στέλεχος που ανιχνεύθηκε σε σκύλο στην Έδεσσα. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανά θέση. Η κωδικοποίηση των ελληνικών τύπου I CCoV είναι η εξής: TH (Θεσσαλονίκη), AT (Αθήνα), TR (Τρίκαλα), ED (Έδεσσα). Στον κλάδο των TGEV, περιλαμβάνονται τα στελέχη αναφοράς Purdue και TS, ενώ στον κλάδο των CCoVIIb (νέα στελέχη) τα στελέχη αναφοράς 430/07, 174/06, 341/05 και 119/08 της τελευταίας δεκαετίας. Στο δέντρο χρησιμοποιήθηκε ως παραομάδα το στέλεχος CRCVK37 του αναπνευστικού κοροναϊού του σκύλου.

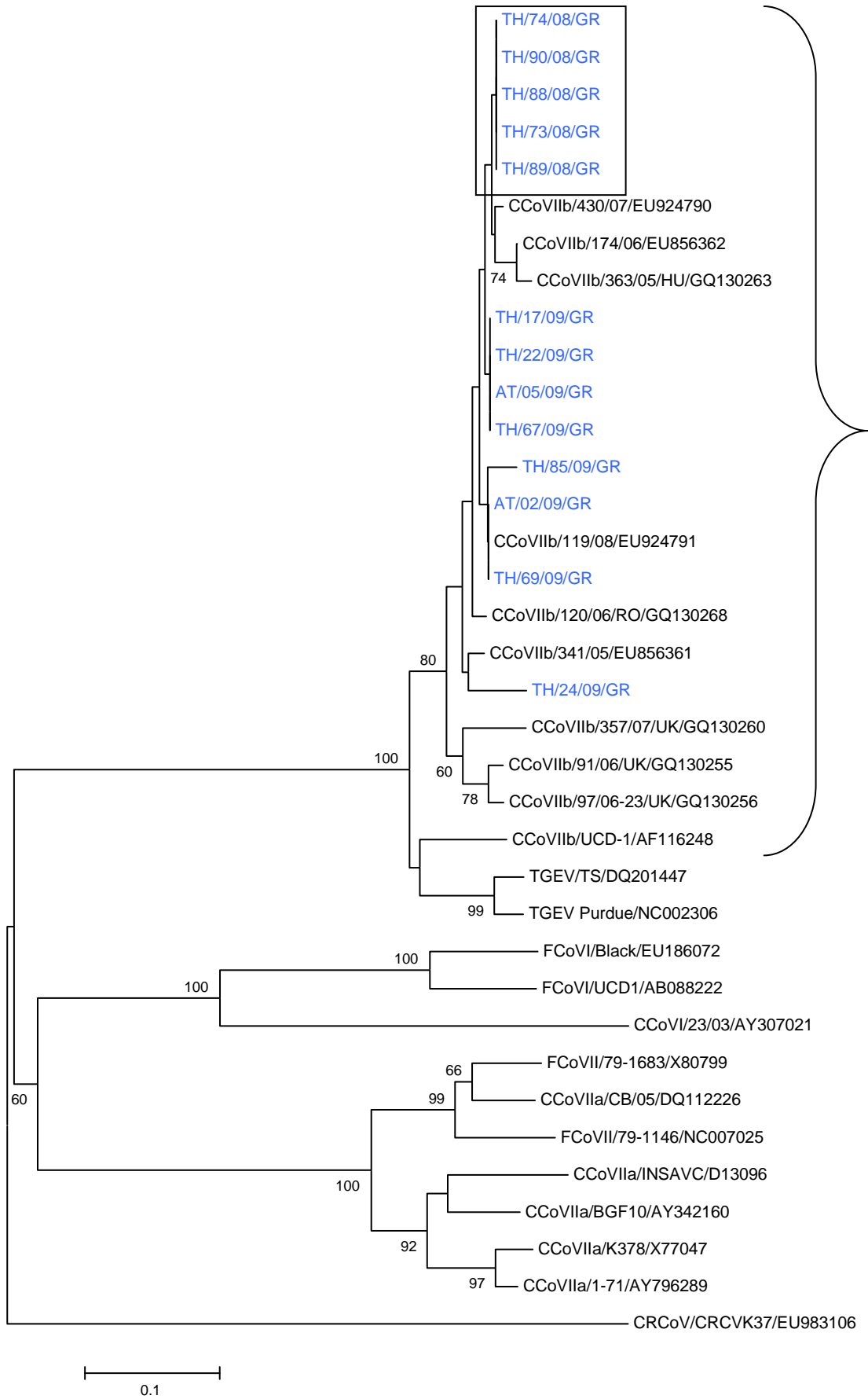
3.1.10 Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών του CCoVIIb

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του 5'-άκρου του γονιδίου S, έλαβε χώρα στα προϊόντα της RT-PCR, με την οποία ανιχνεύονταν οι CCoVIIb. Μετά τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 13 στελεχών CCoV τύπου II (υποτύπου b), αυτές χαρακτηρίστηκαν ως S γονιδιακές περιοχές του CCoVIIb, μετά από την εφαρμογή του αλγόριθμου BLAST. Το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας το εμφάνιζαν είτε με το στέλεχος 119/08 (EU924791) είτε με το 198/07 (GQ130266) του CCoVIIb. Μετά από πολλαπλή στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και υπολογισμό των ομοιοτήτων σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, διαπιστώθηκαν τα εξής: τα ελληνικά στελέχη εμφάνιζαν μεταξύ τους ομοιότητα 94,1%-100% σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (νουκλεοτίδια 1-275 του 5'-άκρου του γονιδίου S, στέλεχος 119/08, EU924791) και 92,3%-100% σε επίπεδο αμινοξέων (αμινοξέα 1-91 του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης S, στέλεχος στέλεχος 119/08, EU924791). Ιδιαίτερα, όσον αφορά στους ιούς TH/73/08/GR, TH/74/08/GR, TH/88/08/GR, TH/89/08/GR και TH/90/08/GR, που ανιχνεύθηκαν στο περιστατικό του κυνοκομείου της Θεσσαλονίκης ήταν όμοιοι 100% σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων (Παράρτημα, Πίνακας 4).

Από τη φυλογενετική ανάλυση των CCoVIIb ιών παρατηρήθηκε ότι αποτελούσαν κοινό κλάδο με τους TGEV (Εικόνα 16). Στο δέντρο παρατηρούνται

δύο ακόμα μεγάλοι κλάδοι, αυτός των στελεχών CCoV τύπου I και FCoV και αυτός των στελεχών CCoV τύπου II και FCoV.

Τα ελληνικά CCoVIIb στελέχη συγκροτούν κλάδο με τα στελέχη που ανιχνεύτηκαν στη Ρουμανία, την Ουγγαρία και την Ιταλία και διαχωρίζονται από εκείνα που ανιχνεύτηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο. Στην άκρη του κλάδου που σχηματίζουν τα CCoVIIb στελέχη, βρίσκεται το παλιό CCoVIIb στέλεχος UCD-1, χωρίς να σχηματίζει ιδιαίτερο κλάδο με κανένα από τα νέα στελέχη. Επίσης, 5 από τα ελληνικά CCoVIIb στελέχη, τα TH/73/08/GR, TH/74/08/GR, TH/88/08/GR, TH/89/08/GR και TH/90/08/GR, που ανιχνεύτηκαν σε επιζωοτικό κρούσμα οξείας διάρροιας στο κυνοκομείο Θεσσαλονίκης, συγκροτούν ένα μονοφυλετικό κλάδο (Πίνακας 4, Παράρτημα).



Εικόνα 16. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης S με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0. Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1.000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps» οι οποίες αναφέρονται σε ποσοστά επί τοις %, ενώ αναγράφονται όσες είναι πάνω από 60. Το άγκιστρο έχει τοποθετηθεί στον κλάδο με τους CCoVIIb ιούς. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται οι ελληνικοί CCoVIIb ιοί. Στο ορθογώνιο έχουν συμπεριληφθεί οι ιοί που ανιχνεύθηκαν σε κρούσμα επιζωοτικής διάρροιας στο κυνοκομείο Θεσσαλονίκης. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανά θέση. Η κωδικοποίηση των ελληνικών τύπου I CCoV είναι η εξής: TH (Θεσσαλονίκη), AT (Αθήνα), UK (Ηνωμένο Βασίλειο), RO (Ρουμανία), HU (Ουγγαρία). Στο δέντρο χρησιμοποιήθηκε ως παραομάδα το στέλεχος CRCVK37 του αναπνευστικού κοροναϊού του σκύλου.

3.1.11 Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων και φυλογενετική ανάλυση του στελέχους THr/85/08

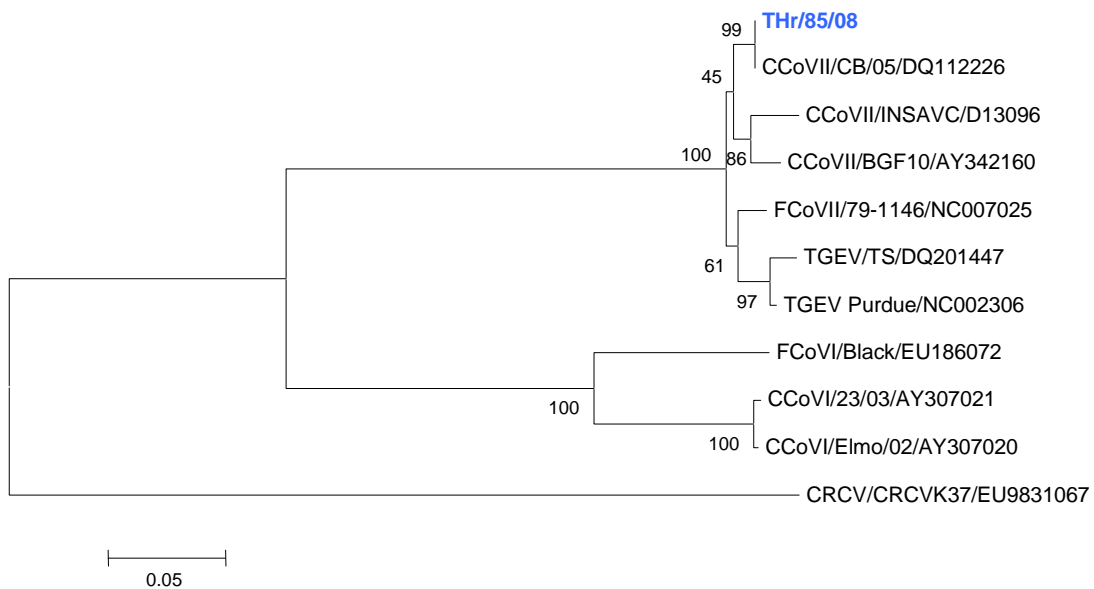
Ένα από τα δείγματα, το 85/08, βάσει του γεγονότος ότι με τη RT-PCR χαρακτηριζόταν ως CCoV τύπος II (γονίδιο S) και με τη real time (RT-) PCR ως CCoV τύπος I (γονίδιο M), δεν χαρακτηρίστηκε. Ωστόσο, ακολούθησε αλληλούχηση και φυλογενετική ανάλυση τμημάτων των γονιδίων S και M, με σκοπό να εξακριβωθεί το αίτιο των αντίθετων αποτελεσμάτων.

Από την ενίσχυση τμήματος 636 νουκλεοτιδίων του γονιδίου S, πλησίον του 3'-άκρου, διαπιστώθηκε μετά από την αλληλούχηση ότι το στέλεχος αυτό έμοιαζε περισσότερο με τα στελέχη αναφοράς του τύπου II CCoV παρά του τύπου I (Εικόνα 4, Παράρτημα). Μάλιστα, σε επίπεδο νουκλεοτιδίων εμφάνιζε 91-99% ομοιότητα με τα τύπου II στελέχη και 62,2-63,6% με τα τύπου I.

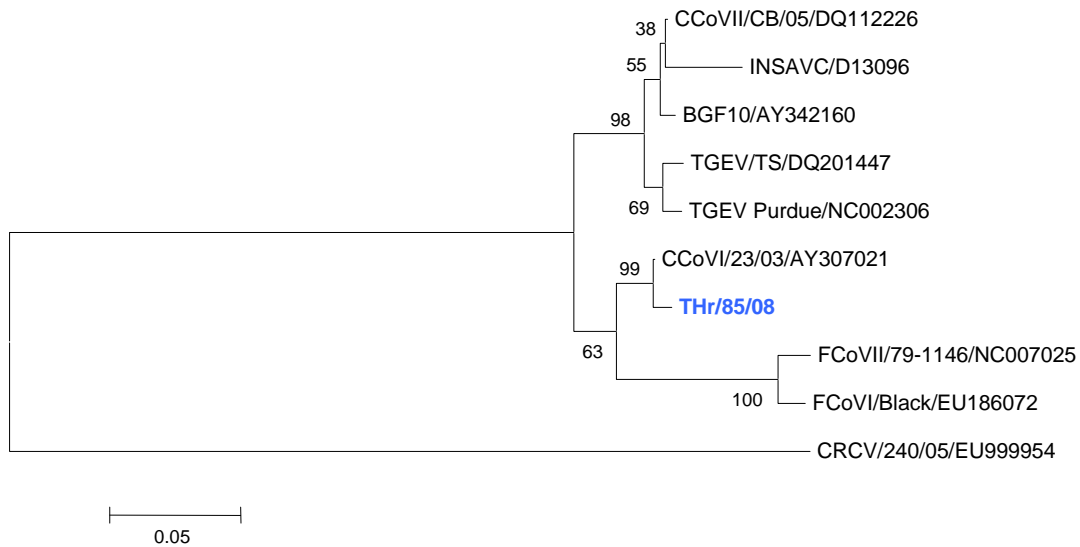
Από τη φυλογενετική ανάλυση, όσον αφορά στο τμήμα της πρωτεΐνης S, διαπιστώθηκε ότι το ελληνικό στέλεχος βρισκόταν στον ίδιο κλάδο με το τύπου II στέλεχος CB/05. Επιπλέον, τα τύπου II στελέχη του CCoV, καθώς και τα στελέχη του FCoV τύπου II και του TGEV σχημάτιζαν 1 κλάδο, ξεχωριστό από εκείνον των στελεχών CCoV τύπου I και του στελέχους του FCoV τύπου I (Εικόνα 17).

Από την ενίσχυση τμήματος 398 νουκλεοτιδίων πλησίον του 3'-άκρου του γονιδίου M, διαπιστώθηκε μετά από την αλληλούχηση ότι το ελληνικό στέλεχος εμφανιζόταν περισσότερο συντηρημένο συγκρινόμενο με το στέλεχος αναφοράς 23/03 του τύπου I του CCoV παρά με εκείνα του τύπου II (Εικόνα 5, Παράρτημα). Μάλιστα, σε επίπεδο νουκλεοτιδίων εμφάνιζε 97,4% ομοιότητα με το στέλεχος 23/03 και 87,9-90,4% με τα τύπου II CCoV στελέχη.

Από τη φυλογενετική ανάλυση όσον αφορά στο τμήμα της πρωτεΐνης Μ διαπιστώθηκε ότι το ελληνικό στέλεχος βρίσκεται στον ίδιο κλάδο με το τύπου Ι στέλεχος 23/03. Επιπλέον τα στελέχη του CCoV τύπου ΙΙ και του TGEV σχηματίζουν Ι κλάδο, ξεχωριστό από εκείνον των στελεχών FCoV και CCoV τύπου Ι (Εικόνα 18).



Εικόνα 17. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στην περιοχή 212 αμινοξέων πλησίον του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης S με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0. Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1.000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps» οι οποίες αναφέρονται σε ποσοστά επί τοις %. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανα θέση. Το ελληνικό στέλεχος επισημαίνεται με έντονα, γαλάζια γράμματα. Στο δέντρο χρησιμοποιήθηκε ως παραομάδα το στέλεχος CRCVK37 του αναπνευστικού κοροναϊού του σκύλου.



Εικόνα 18. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στην περιοχή 132 αμινοξέων πλησίον του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης M με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0. Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1.000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps» οι οποίες αναφέρονται σε ποσοστά επί τοις %. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει αριθμό των αντικαταστάσεων των αμινοξέων. Το ελληνικό στέλεχος επισημαίνεται με έντονα, γαλάζια γράμματα. Στο δέντρο χρησιμοποιήθηκε ως παραομάδα το στέλεχος CRCVK37 του αναπνευστικού κοροναϊού του σκύλου.

3.2 ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ CCoV ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΣΤΑ ΟΡΓΑΝΑ ΤΩΝ ΣΚΥΛΩΝ

3.2.1 Ανίχνευση του CCoV και χαρακτηρισμός των τύπων με RT-PCR

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, από το σύνολο των 31 νεκρών σκύλων με οξεία διάρροια, ο CCoV ανιχνεύτηκε, με την ημιένθετη RT-PCR, στα κόπρανα 21 ζώων. Από τους 21 αυτούς σκύλους, χρησιμοποιώντας με την ίδια μέθοδο, ο ιός ανιχνεύθηκε στα όργανα 3 και συγκεκριμένα στους 13/09, 66/09 και 68/09 (Πίνακας 1, Παράρτημα). Αναλυτικότερα, ο ιός ανιχνεύθηκε στο ήπαρ, στο σπλήνα, στους νεφρούς, στο πάγκρεας, στην καρδιά και στους πνεύμονες. Επιπλέον, ανιχνεύτηκε και στον εγκέφαλο των σκύλων 13/09 και 68/09.

Όσον αφορά στο χαρακτηρισμό των τύπων του CCoV, στα όργανα και των τριών διαπιστώθηκε η παρουσία του CCoV τύπου II.

3.2.2 Ανίχνευση του CCoV και χαρακτηρισμός των τύπων με real time (RT-) PCRs και σύγκριση αυτών με τις αντίστοιχες RT-PCRs

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, από το σύνολο των 31 νεκρών σκύλων με οξεία διάρροια, ο CCoV ανιχνεύτηκε, με τη real time (RT-) PCR, στα κόπρανα των ίδιων (21) ζώων, όπως και με την ημιένθετη RT-PCR. Τα αποτελέσματα της real time (RT-) PCR για την ανίχνευση του CCoV στα όργανα των 21 από τους 31 νεκρούς σκύλους, ήταν σε απόλυτη αντιστοιχία με τα παραπάνω αποτελέσματα της ημιένθετης RT-PCR.

Όσον αφορά στους τρεις σκύλους, που ο ιός ανιχνεύθηκε στα όργανα, τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού με τη real time (RT-) PCR ήταν σε απόλυτη αντιστοιχία με εκείνα της RT-PCR. Η συγκέντρωση των αντιγράφων του ιικού RNA στα κόπρανα και στα όργανα των τριών αυτών σκύλων, η οποία προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη real time (RT-) PCR παρουσιάζεται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Χαρακτηρισμός του ιού και συγκέντρωση του ιικού RNA (μέση συγκέντρωση αντίγραφων /μl RNA) στα κόπρανα και στα όργανα των σκύλων 13/09, 66/09 και 68/09.

	13/09		66/09	68/09
	CCoVI	CCoVII	CCoVII	CCoVII
ΚΟΠΡΑΝΑ	$5,3 \times 10^3$	$6,13 \times 10^5$	$3,59 \times 10^3$	$7,22 \times 10^5$
ΗΠΑΡ	-	$5,11 \times 10^3$	$4,64 \times 10^4$	$3,21 \times 10^5$
ΣΠΛΗΝΑΣ	-	$1,06 \times 10^5$	$5,20 \times 10^5$	$1,55 \times 10^7$
ΠΑΓΚΡΕΑΣ	-	$7,03 \times 10^1$	$2,75 \times 10^2$	$2,03 \times 10^4$
ΝΕΦΡΟΙ	-	$1,21 \times 10^3$	$1,23 \times 10^5$	$3,37 \times 10^6$
ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ	-	$7,68 \times 10^4$	$5,99 \times 10^6$	$4,10 \times 10^6$
ΚΑΡΔΙΑ	-	$8,20 \times 10^4$	$1,14 \times 10^5$	$7,08 \times 10^6$
ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ	-	$2,03 \times 10^2$	-	$2,47 \times 10^3$

3.2.3 Διαφοροποίηση του υποτύπου CCoVIIa από τον CCoVIIb και του CCoVIIb από τους TGEV με RT-PCR

Στο σκύλο 13/09, ο CCoVII που ανιχνεύθηκε στα όργανα χαρακτηρίστηκε ως υπότυπος CCoVIIa, ο κλασικός δηλαδή CCoV, ενώ στους σκύλους 66/09 και 68/09 χαρακτηρίστηκε ως CCoVIIb, στέλεχος που ανήκει στα ανασυνδυασμένα TGEV-like στελέχη.

3.2.4 Παθολογοανατομικά ευρήματα

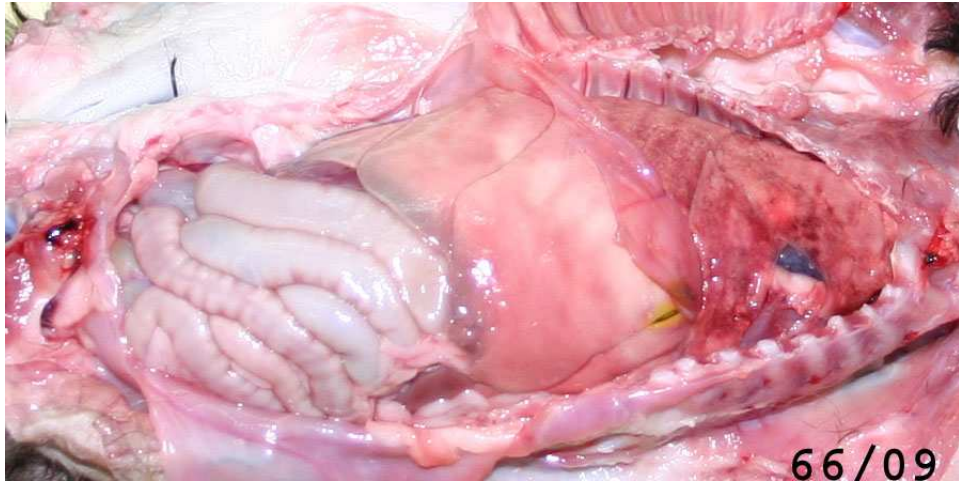
Οι σκύλοι των οποίων τα όργανα ανιχνεύθηκε ο CCoV, ανήκαν στις φυλές Maltese (13/09), Yorkshire terrier (66/09) και Pomeranian (68/09). Κατά τη νεκροτομική εξέταση, και στους τρεις διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα: Οι πνεύμονες εμφάνιζαν μικρές έως μεγάλες εμφυσηματικές περιοχές και συμφόρηση. Στην καρδιά δεν διαπιστώθηκε η παρουσία αλλοιώσεων τόσο στο μυοκάρδιο, όσο και στο ενδοκάρδιο. Το ήπαρ εμφανιζόταν ελαφρά διογκωμένο, αποχρωματισμένο και ιδιαίτερα εύθρυπτο. Στο λεπτό έντερο παρατηρήθηκε πάχυνση και παρουσία γραμμοειδών αιμορραγιών στο τοίχωμα. Κατά τη διάνοιξή του διαπιστώθηκε, ιδιαίτερα στο δωδεκαδάκτυλο, η παρουσία οροαιμορραγικού περιεχομένου καθώς και ορισμένων ελκωτικών περιοχών. Οι συγκεκριμένες αλλοιώσεις εξαντλούνταν στη νήστιδα του λεπτού εντέρου. Επιπλέον, στην κοιλιακή κοιλότητα του σκύλου 68/09, διαπιστώθηκε η παρουσία οροαιματηρής συλλογής. Στον εγκέφαλο όλων των σκύλων, τέλος, παρατηρήθηκε ελαφρά υπεραϊμία των αγγείων της σκληρής μήνιγγας (Εικόνες 19 έως 23).



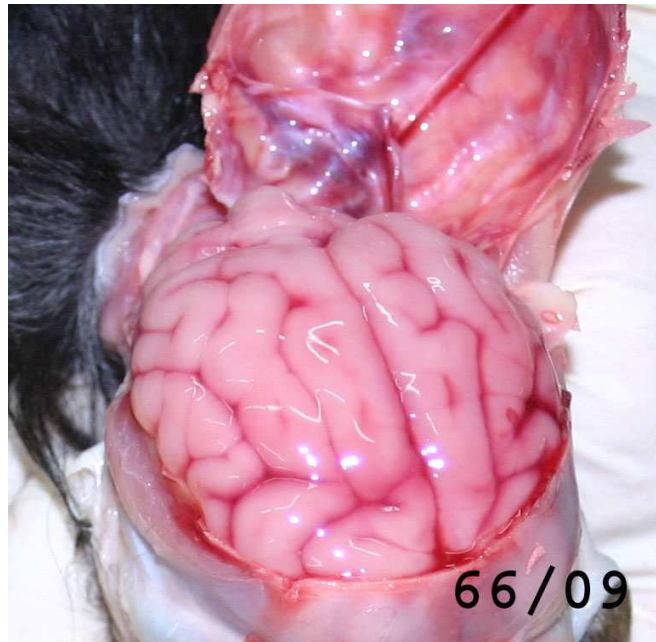
Εικόνα 19. Σκύλος 13/09. Έντονος αποχρωματισμός του ήπατος και γραμμοειδείς αιμοραγίες στην εξωτερική επιφάνεια του εντέρου.



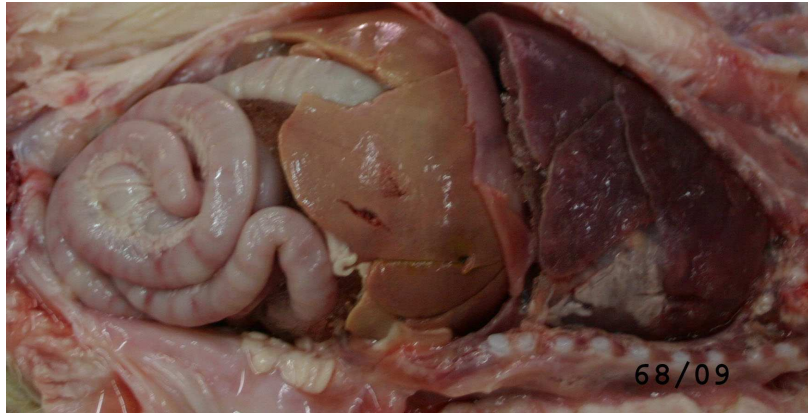
Εικόνα 20. Σκύλος 66/09. Παρουσία αιμορραγικού περιεχομένου και ελκωτικών περιοχών στο δωδεκαδάκτυλο και την πρώτη μοίρα της νήστιδας.



Εικόνα 21. Σκύλος 66/09. Έντονος αποχρωματισμός του ήπατος και γραμμοειδείς αιμορραγίες στην εξωτερική επιφάνεια του εντέρου.



Εικόνα 22. Σκύλος 66/09. Υπεραιμία, ιδιαίτερα των αγγείων της σκληρής μήνιγγας, στην κρανιακή κοιλότητα.



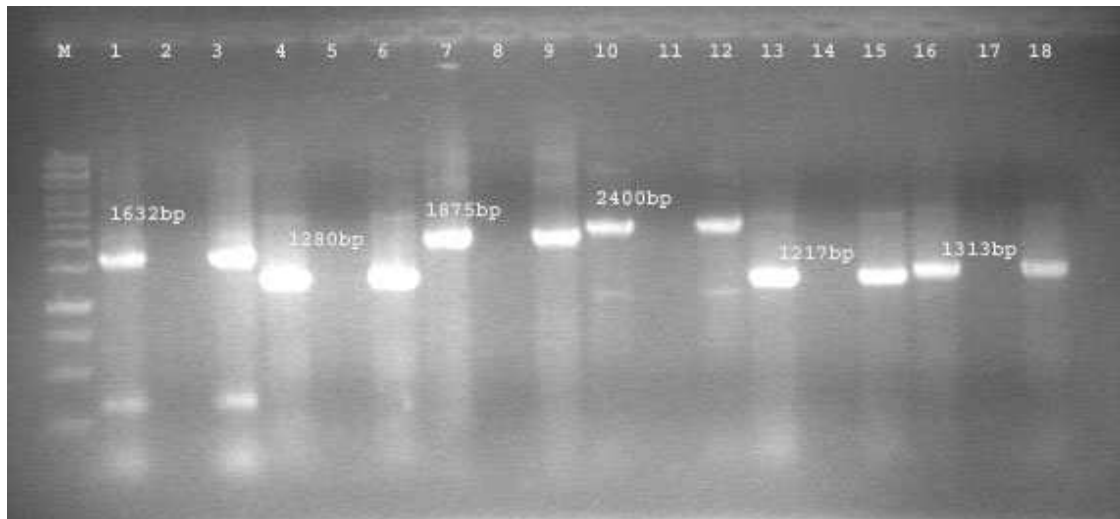
Εικόνα 23. Σκύλος 68/09. Έντονος αποχρωματισμός του ήπατος και γραμμοειδείς αιμορραγίες στην εξωτερική επιφάνεια του εντέρου.

3.2.5 Ανίχνευση άλλων ιών στα ζώα με CCoV στα όργανα

Και στα τρία ζώα ανιχνεύθηκε ο CPV-2. Όλα τα στελέχη CPV-2 χαρακτηρίστηκαν ως CPV-2a άγρια στελέχη. Ο ιός της νόσου του Carré και οι αδενοϊοί του σκύλου δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα από τα δείγματα.

3.2.6 Αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών που διαπερνούν τον εντερικό φραγμό

Το 3'-άκρο του γονιδιώματος (περιλαμβάνει όλα τα γονίδια εκτός της πολυμεράσης) των στελεχών που διαπέρασαν τον εντερικό φραγμό και ανιχνεύτηκαν στα όργανα των 3 νεκρών σκύλων ενισχύθηκε με RT-PCR (Εικόνα 24). Για το στέλεχος NA/09 (σκύλος 13/09) που χαρακτηρίστηκε ως CCoVIIa, ενισχύθηκε μία περιοχή 8.909 νουκλεοτιδίων. Για τα στελέχη 66/09 και 68/09 που διαπιστώθηκε ότι ανήκαν στον υπότυπο CCoVIIb ενισχύθηκαν περιοχές μήκους 8.822 και 8.828 νουκλεοτιδίων, αντίστοιχα. Οι τρεις αυτές περιοχές εμπεριέχουν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δομικές (S, E, M, N) και μη (ORF3a, ORF3b, ORF3c, ORF7a, ORF7b) πρωτεΐνες του ιού.



Εικόνα 24. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων των έξι RT-PCR για την ενίσχυση του 3'-άκρου του γονιδιώματος των στελεχών που ανιχνεύθηκαν σε όργανα των σκύλων. Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους (250 έως 10.000 ζεύγη βάσεων). Διαδρομές 1, 4, 7, 10, 13, 16: θετικοί μάρτυρες. Διαδρομές 2, 5, 8, 11, 14, 17: αρνητικοί μάρτυρες. Διαδρομές 3, 6, 9, 12, 15, 18: δείγματα θετικά.

Κατά την αλληλούχηση και πολλαπλή στοίχιση, διαπιστώθηκε ότι το στέλεχος NA/09 (σκύλος 13/09), σε μία περιοχή μήκους 8.767 νουκλεοτιδίων, εμφάνιζε το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας, σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, με το παντρόπο στέλεχος CB/05 (97,7%). Το ποσοστό ομοιότητας με άλλα στελέχη του υποτύπου CCoVIIa ήταν 89,4% με το INSAVC και 89,1% με το BGF10. Χαμηλότερα ποσοστά ομοιότητας παρατηρήθηκαν με το στέλεχος Purdue του TGEV (79,7%) καθώς και με το στέλεχος τύπου I του CCoV, το 23/03 (66%).

Αντίθετα, τα στελέχη 66/09 και 68/09, σε μία περιοχή μήκους 8.772 και 8.778 νουκλεοτιδίων, αντίστοιχα, εμφάνιζαν τα υψηλότερα ποσοστά ομοιότητας, σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, με το στέλεχος αναφοράς 119/08 (EU924791) του υποτύπου CCoVIIb (98,2% και 98,9% αντίστοιχα). Η ομοιότητα μεταξύ τους άγγιζε το 98%, ενώ με τα στελέχη του υποτύπου CCoVIIa ήταν χαμηλότερη (91-91,9% με το NA/09 και 90,4-91% με το CB/05). Το ποσοστό ομοιότητας σε επίπεδο νουκλεοτιδίων ήταν χαμηλότερο με τον TGEV Purdue (82,7-82,9%) καθώς και με το στέλεχος 23/03 (CcoVI, 64,3-64,4%).

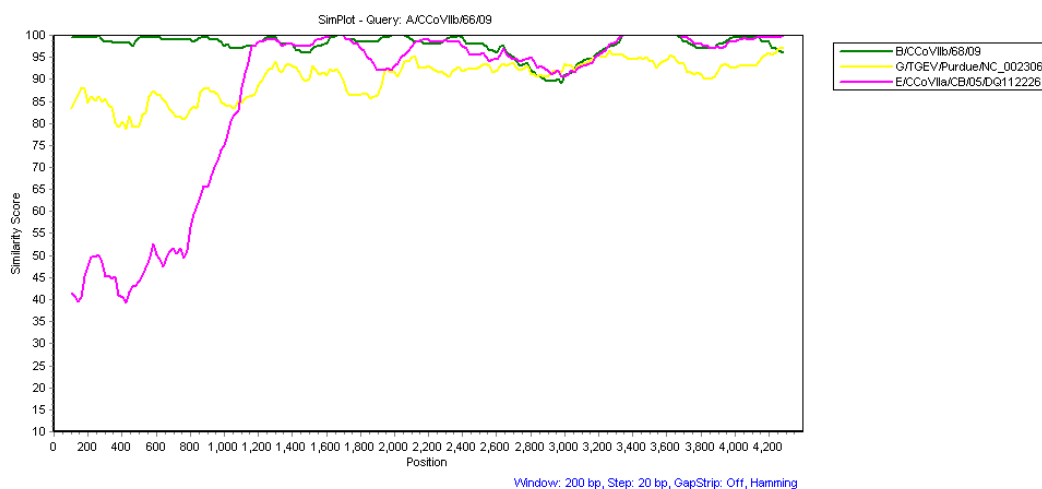
3.2.6.α ORF2

Το γονίδιο S του στελέχους NA/09 είχε μήκος 4.365 νουκλεοτιδίων και κωδικοποιούσε την πρωτεΐνη S που απαρτίζονταν από 1.454 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη του NA/09 είχε ίδιο μήκος με εκείνη του CB/05, ενώ ήταν κατά ένα (K378, 1-71, BGF10) ή και δύο (INSAVC) αμινοξέα μεγαλύτερη, σε σχέση με τα στελέχη αναφοράς του υποτύπου CCoVIIa. Με ανάλυση της πρωτεΐνης από το NetNGlyc server επισημάνθηκαν 31 πιθανές θέσεις N-γλυκοσυλίωσης και ένα πιθανό πεπτιδιο-σηματοδότης [με θέση διάσπασης στα αμινοξέα 19-20 (σερίνη, S-θρεονίνη, T)], όπως και στο στέλεχος αναφοράς CB/05. Το ενδομεμβρανικό τμήμα διαπιστώθηκε μεταξύ των αμινοξέων 1.394 με 1.416. Σε επίπεδο αμινοξέων, το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας διαπιστώθηκε με το στέλεχος CB/05 (98,2%) (Πίνακας 5, Εικόνα 6, Παράρτημα). Τριάντα ένα νουκλεοτίδια πριν την έναρξη του γονιδίου, διαπιστώθηκε η παρουσία της διαγονιδιακής αλληλουχίας CTAAAC.

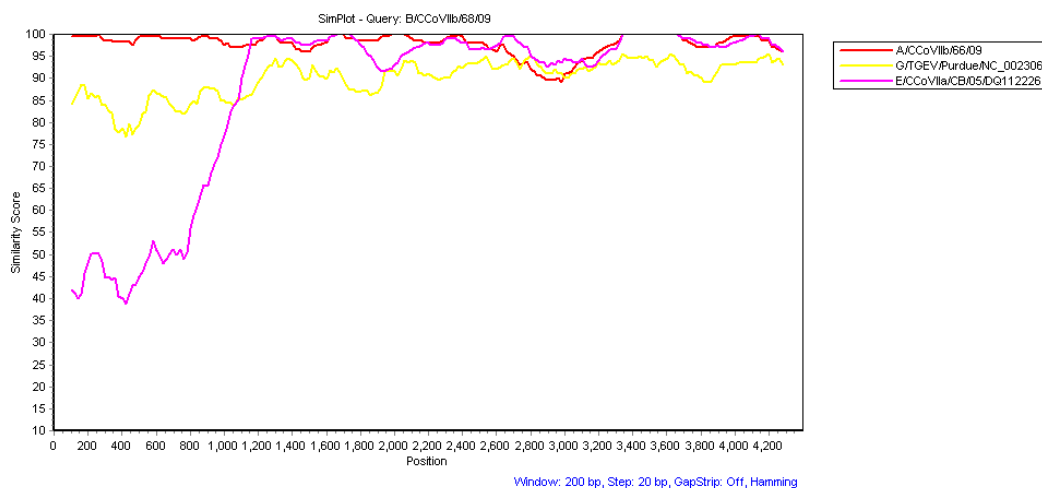
Το γονίδιο S των στελεχών 66/09 και 68/09 είχε μήκος 4.374 νουκλεοτιδίων και η πρωτεΐνη που κωδικοποιούσε απαρτίζονταν από 1.457 αμινοξέα. Μετά από ανάλυση του γονιδίου με χρήση του SimPlot, διαπιστώθηκε ότι το πρώτο τμήμα του γονιδίου εμφάνιζε υψηλό ποσοστό ομοιότητας με το στέλεχος Purdue του TGEV, ενώ το δεύτερο τμήμα με το στέλεχος CB/05 του υποτύπου CCoVIIa (Γραφήματα 5 και 6). Η πρωτεΐνη είχε το ίδιο μήκος με εκείνη των τεσσάρων στελεχών αναφοράς του CCoVIIIb (430/07, 119/08, 174/06 και 341/05). Με ανάλυση της πρωτεΐνης από το NetNGlyc server επισημάνθηκαν 27 (66/09) και 28 (68/09) πιθανές θέσεις N-γλυκοσυλίωσης και ένα πιθανό πεπτιδιο-σηματοδότης [με θέση διάσπασης στα αμινοξέα 15-16, (γλυκίνη, G-ασπαραγινικό οξύ, D)]. Το ενδομεμβρανικό τμήμα διαπιστώθηκε μεταξύ των αμινοξέων 1.397 με 1.419. Σε επίπεδο αμινοξέων, τα δύο στελέχη εμφάνιζαν μεταξύ τους ποσοστό ομοιότητας 97,6%, ενώ το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας, κατά τη σύγκριση με τα στελέχη αναφοράς του CCoV, διαπιστώθηκε με το στέλεχος 119/08 του υποτύπου CCoVIIIb (98,3%) (Πίνακας 5, Παράρτημα). Τριάντα δύο νουκλεοτίδια πριν την έναρξη του γονιδίου, διαπιστώθηκε η παρουσία της διαγονιδιακής αλληλουχίας CTAAAC.

Από τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών με τη μέθοδο «Ένωσης Γειτόνων» διαπιστώθηκε ότι το ελληνικό στέλεχος NA/09 σχημάτιζε έναν κλάδο με το CB/05. Παράλληλα, τα ελληνικά στελέχη 66/09 και 68/09, μαζί με τα

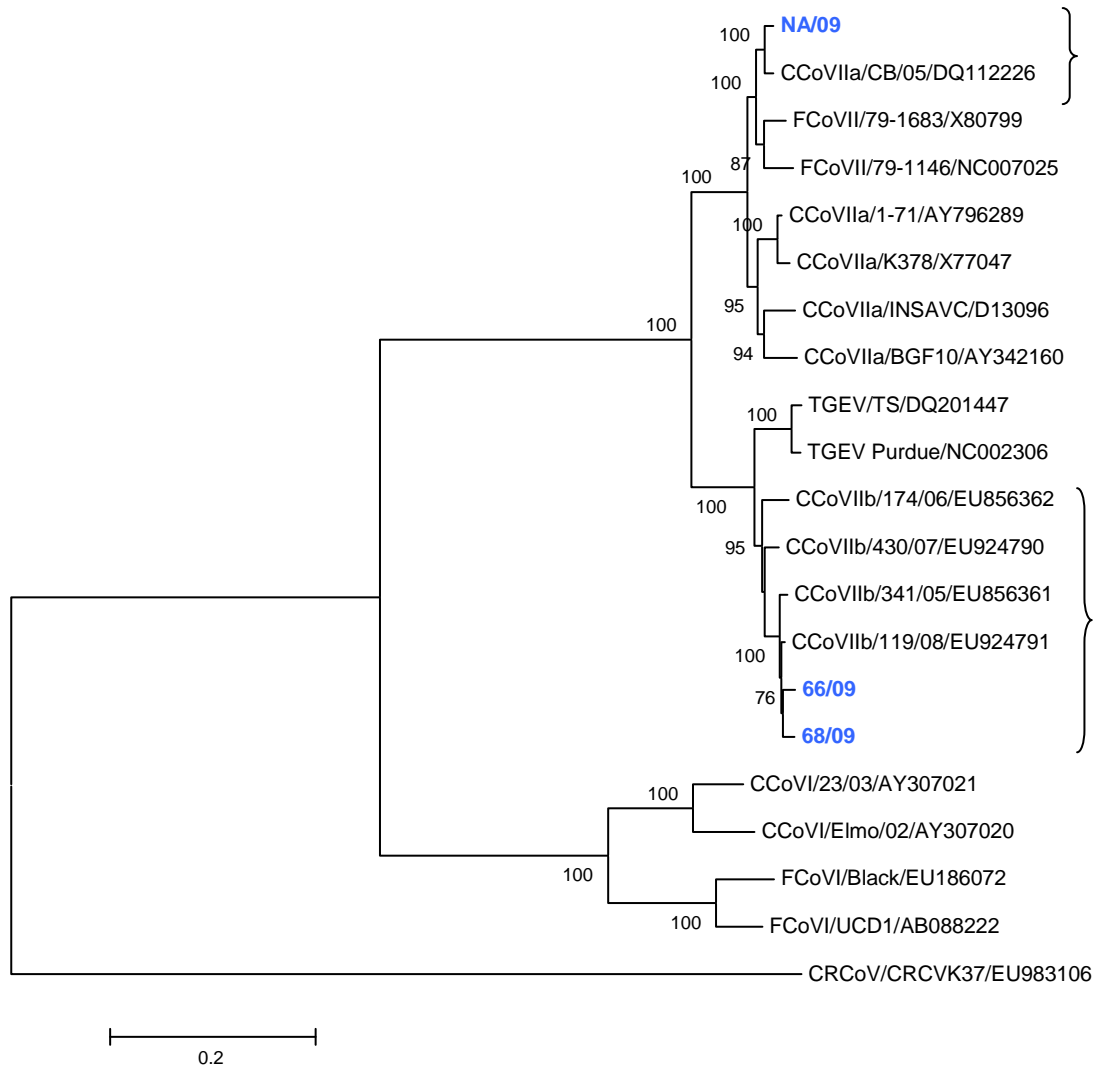
προαναφερθέντα στελέχη αναφοράς του CCoVIIb συγκροτούσαν άλλο κλάδο, (Εικόνα 25).



Γράφημα 5. Ομοιότητα του γονιδίου S του στελέχους 66/09 με χρήση του SimPlot, με τα στελέχη Purdue, CB/05 και 68/09. Διακρίνεται η ομοιότητα του πρώτου τμήματος του γονιδίου με το στέλεχος Purdue του TGEV (1.050-1.100 περίπου νουκλεοτίδια) και του δεύτερου τμήματος με το CCoVIIa στέλεχος CB/05.



Γράφημα 6. Ομοιότητα του γονιδίου S του στελέχους 68/09 με χρήση του SimPlot, με τα στελέχη Purdue, CB/05 και 66/09. Διακρίνεται η ομοιότητα του πρώτου τμήματος του γονιδίου με το στέλεχος Purdue του TGEV (1.050-1.100 περίπου νουκλεοτίδια) και του δεύτερου τμήματος με το CCoVIIa στέλεχος CB/05.



Εικόνα 25. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στην πρωτεΐνη S με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0. Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1.000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps» οι οποίες αναφέρονται σε ποσοστά επί τοις %. Διακρίνονται οι τιμές αυτοδυναμίας που είναι μεγαλύτερες του 60. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανά θέση. Τα ελληνικά στελέχη επισημαίνονται με έντονα, γαλάζια γράμματα. Με άγκιστρο επισημαίνεται ο κλάδος των ελληνικών στελεχών 66/09 και 68/09 με τα διεθνή CCoVIIb στελέχη, καθώς και ο κλάδος του στελέχους NA/09 με το CB/05 CCoVIIa στέλεχος. Στο δέντρο χρησιμοποιήθηκε ως παραομάδα το στέλεχος CRCVK37 του αναπνευστικού κοροναϊού του σκύλου.

3.2.6.β ORF3

Στα ελληνικά στελέχη, το ORF3a, αποτελούνταν από 237 νουκλεοτίδια υπεύθυνα για τη σύνθεση της μη δομικής πρωτεΐνης 3a. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελούνταν από 78 αμινοξέα, όπως και στα υπόλοιπα στελέχη αναφοράς. Εξαιρέση

αποτελεί το στέλεχος 1-71, στο οποίο, λόγω πλαισιοτροπικής μετάλλαξης, η πρωτεΐνη 3a έχει μήκος 94 αμινοξέων (Εικόνα 7, Παράρτημα). Επτά νουκλεοτίδια πριν την έναρξη του γονιδίου, διαπιστώθηκε η παρουσία της διαγονιδιακής αλληλουχίας CTA AAC.

Το ORF3b άρχιζε 182 νουκλεοτίδια μετά το κωδικόνιο έναρξης του ORF3a. Η παρουσία της διαγονιδιακής αλληλουχίας, όπως αναμενόταν, δεν διαπιστώθηκε. Στο ORF3b των ελληνικών στελεχών δεν διαπιστώθηκε μετάλλαξη προσθήκης ή απάλειψης, μετά από αλληλούχηση των 216 νουκλεοτιδίων του με στελέχη αναφοράς (Εικόνα 8, Παράρτημα). Η μη δομική πρωτεΐνη που κωδικοποιούσε είχε μέγεθος 71 αμινοξέων και για τα τρία στελέχη.

Το ORF3c, όπως αναμενόταν, άρχιζε 4 νουκλεοτίδια πριν τη λήξη του ORF3b και 394 νουκλεοτίδια μετά το κωδικόνιο έναρξης του 3a. Πριν την έναρξή του, όπως ήταν αναμενόμενο, δεν διαπιστώθηκε παρουσία διαγονιδιακής αλληλουχίας. Αποτελούνταν από 735 νουκλεοτίδια και η μη δομική πρωτεΐνη που κωδικοποιούσε είχε μήκος 244 αμινοξέων. Το μέγεθος του ORF3c στα στελέχη του CCoVIIb που ανιχνεύθηκαν στα όργανα των σκύλων ήταν ακριβώς ίδιο με το μέγεθος που είχε το αντίστοιχο ORF στο στέλεχος CB/05. Στη μη δομική πρωτεΐνη 3c επισημάνθηκαν 2 πιθανές θέσεις N- γλυκοσυλίωσης, όσες και στο CB/05, στα CCoVIIb στελέχη αναφοράς που ανιχνεύθηκαν στα όργανα, αλλά και στο κλασικό στέλεχος INSAVC. Η παραλλακτικότητα που παρατηρήθηκε ήταν μικρή (Εικόνα 9, Παράρτημα).

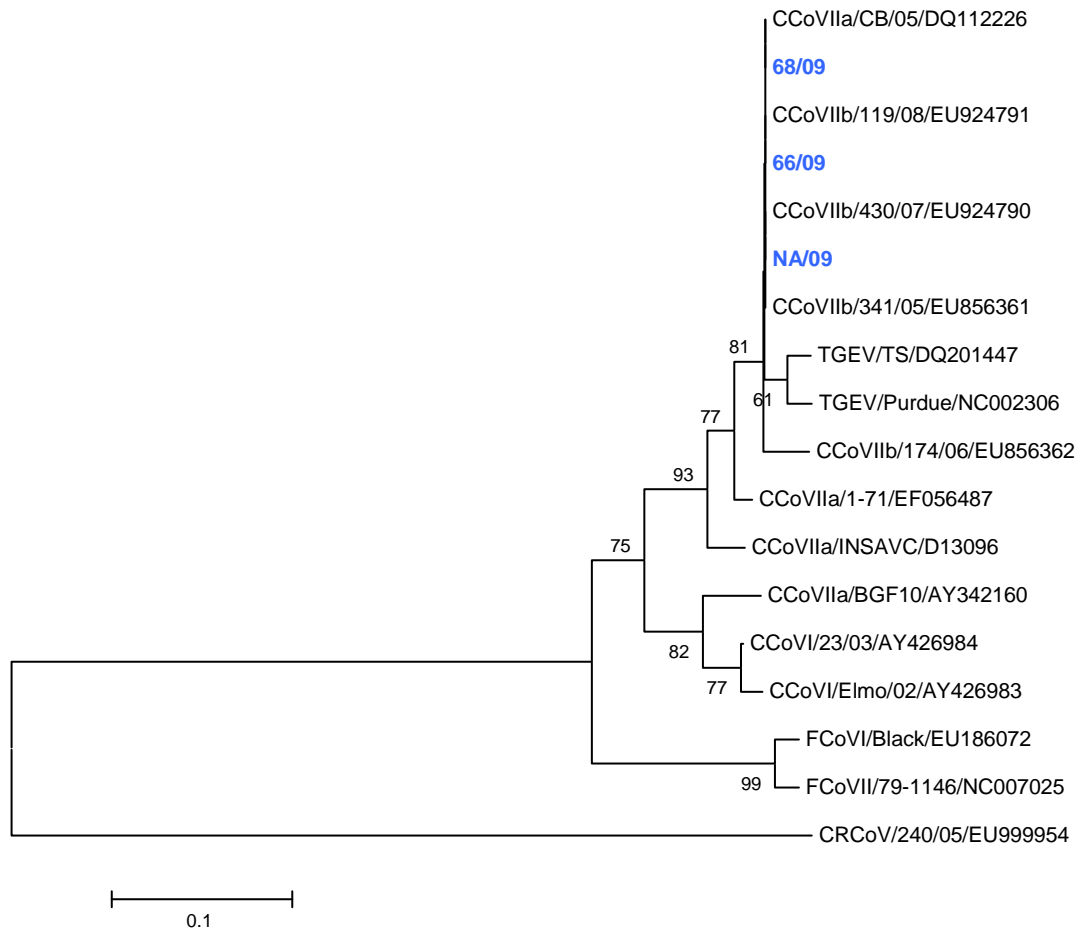
3.2.6.γ ORF4

Το γονίδιο E του στελέχους NA/09 είχε μήκος 249 νουκλεοτιδίων και κωδικοποιούσε την αντίστοιχη πρωτεΐνη που απαρτιζόταν από 82 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη του NA/09 είχε ίδιο μήκος με εκείνη των CB/05, 1-71, BGF10 και INSAVC (στελέχη αναφοράς CCoVIIa). Το ενδομεμβρανικό της τμήμα διαπιστώθηκε μεταξύ των αμινοξέων 15 και 37. Σε επίπεδο αμινοξέων, η πρωτεΐνη E ήταν 100% όμοια με εκείνη του CB/05, αλλά και των CCoVIIb 66/09, 341/05 και 119/08 (Πίνακας 6, Παράρτημα). Σαράντα τρία νουκλεοτίδια πριν την έναρξη του γονιδίου, διαπιστώθηκε η παρουσία της διαγονιδιακής αλληλουχίας CTA AAC.

Το γονίδιο E των στελεχών 66/09 και 68/09 είχε μήκος 249 νουκλεοτιδίων και κωδικοποιούσε την αντίστοιχη πρωτεΐνη που απαρτιζόταν από 82 αμινοξέα. Η

πρωτεΐνη είχε το ίδιο μήκος με εκείνη των τριών στελεχών αναφοράς του υποτύπου CCoVIIb (119/08, 174/06 και 341/05), με εξαίρεση αυτή του 430/07 που εμφανιζόταν κατά 7 αμινοξέα μικρότερη (27 νουκλεοτίδια). Το ενδομεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης διαπιστώθηκε μεταξύ των αμινοξέων 15 και 37. Σε επίπεδο αμινοξέων, τα δύο στελέχη εμφάνιζαν μεταξύ τους ποσοστό ομοιότητας 98,7%. Το ίδιο ποσοστό ομοιότητας παρατηρήθηκε και με τα CCoVIIb στελέχη 341/05 και 119/08, αλλά και με το CB/05 (CCoVIIa) (Πίνακας 6, Παράρτημα). Σαράντα τρία νουκλεοτίδια πριν την έναρξη του γονιδίου, διαπιστώθηκε η παρουσία της διαγονιδιακής αλληλουχίας CTAAAC.

Από τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών με τη μέθοδο «Ένωσης Γειτόνων» διαπιστώθηκε ότι τα προαναφερθέντα ελληνικά στελέχη σχημάτιζαν έναν κλάδο με τα στελέχη αναφοράς του CCoV τύπου II που ανιχνεύθηκαν στα όργανα και τα στελέχη του TGEV. Σε ένα μεγαλύτερο κλάδο του δέντρου συγκεντρώνονται όλοι οι CCoVs και οι TGEVs, ξεχωριστά από τους FCoVs, οι οποίοι σχηματίζουν το δικό τους κλάδο (Εικόνα 26).



Εικόνα 26. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στην πρωτεΐνη E με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0. Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1.000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps» οι οποίες αναφέρονται σε ποσοστά επί τοις %. Διακρίνονται οι τιμές αυτοδυναμίας που είναι μεγαλύτερες του 60. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανά θέση. Τα ελληνικά στελέχη επισημαίνονται με έντονα, γαλάζια γράμματα. Στο δέντρο χρησιμοποιήθηκε ως παραομάδα το στέλεχος 240/05 του αναπνευστικού κοροναϊού του σκύλου.

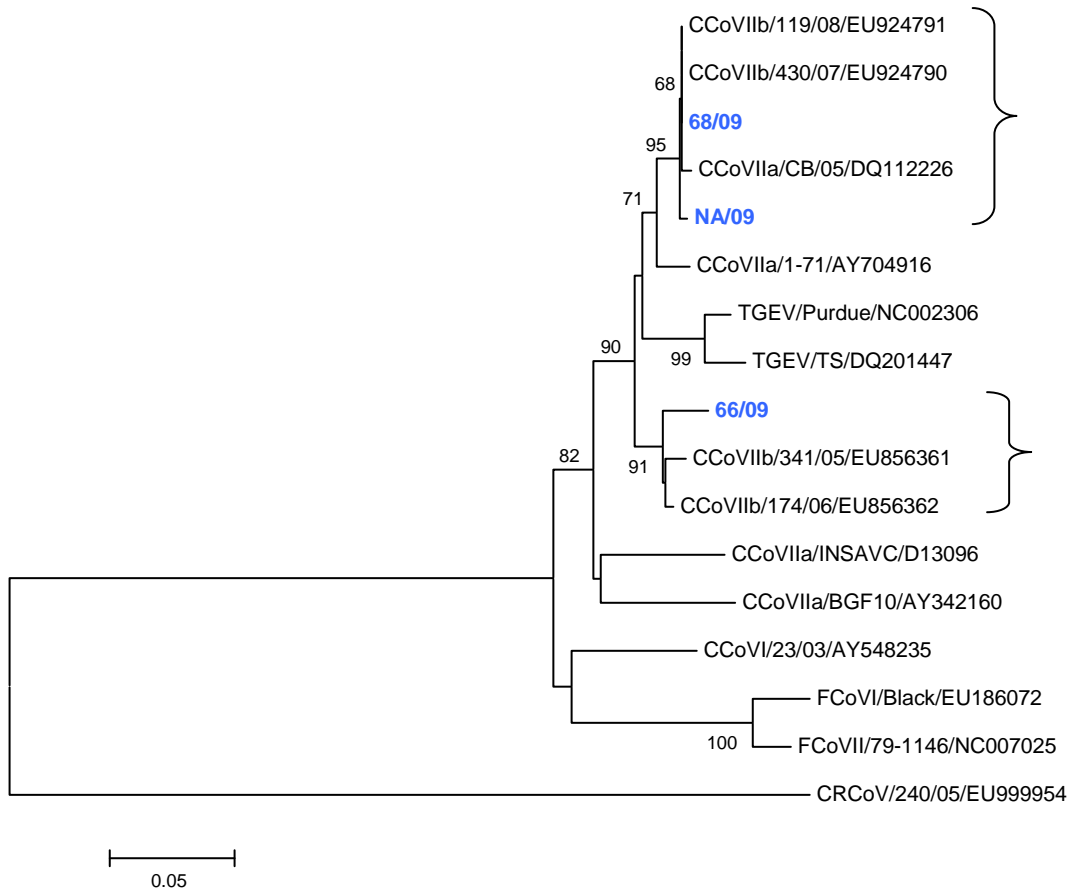
3.2.6.δ ORF5

Το γονίδιο M του στελέχους NA/09 είχε μήκος 789 νουκλεοτιδίων και κωδικοποιούσε την πρωτεΐνη M που απαρτίζονταν από 262 αμινοξέα. Η M πρωτεΐνη του NA/09 είχε ίδιο μήκος με εκείνη των στελεχών αναφοράς του υποτύπου CCoVIIa (CB/05, INSAVC, 1-71 και BGF10). Στο αμινοτελικό άκρο της παρατηρήθηκε έντονη ομοιότητα με το CB/05, σε σχέση με τα υπόλοιπα CCoVIIa στελέχη (Εικόνα 10, Παράρτημα). Με ανάλυση της πρωτεΐνης από το NetNGlyc server επισημάνθηκαν

3 πιθανές θέσεις N- γλυκοσυλίωσης, όσες και στο CB/05 και ένα πιθανό πεπτιδιο-σηματοδότης [με θέση διάσπασης στα αμινοξέα 16-17, (γλυκίνη, G-γλουταμινικό οξύ, E)]. Τα τρία ενδομεμβρανικά τμήματα της πρωτεΐνης διαπιστώθηκαν μεταξύ των αμινοξέων 47-69, 76-98 και 113-135. Σε επίπεδο αμινοξέων, το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας (99,6%) διαπιστώθηκε με τα CCoVIIIb στελέχη. Από τα CCoVIIa στελέχη, το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας εμφανιζόταν σε σχέση με το CB/05 (99,2%). Με τα υπόλοιπα CCoVIIa στελέχη εμφανίζονταν ποσοστά ομοιότητας 90,1%-97,3% (Πίνακας 7, Παράρτημα). Εννέα νουκλεοτίδια πριν την έναρξη του γονιδίου, διαπιστώθηκε η παρουσία της διαγονιδιακής αλληλουχίας CTAAAC.

Το γονίδιο M των στελεχών 66/09 και 68/09 είχε μήκος 783 και 789 νουκλεοτιδίων, αντίστοιχα, και κωδικοποιούσε την πρωτεΐνη M. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελούνταν από 260 (66/09) και 262 (68/09) αμινοξέα. Από το στέλεχος 66/09, σε σχέση με το στέλεχος 68/09, απουσίαζαν δύο αμινοξέα, που αντιστοιχούσαν στις θέσεις 24 (σερίνη, S) και 36 (θρεονίνηT). Τα ίδια αμινοξέα απουσίαζαν και από τα στελέχη αναφοράς 174/06 και 341/05 του CCoVIIIb (Εικόνα 10, Παράρτημα). Με ανάλυση της πρωτεΐνης από το NetNGlyc server επισημάνθηκαν 2 (66/09) και 3 (68/09) πιθανές θέσεις N- γλυκοσυλίωσης και ένα πιθανό πεπτιδιο-σηματοδότης [με θέση διάσπασης στα αμινοξέα 16-17, (γλυκίνη, G-γλουταμινικό οξύ, E)]. Τα τρία ενδομεμβρανικά τμήματα της πρωτεΐνης διαπιστώθηκαν μεταξύ των αμινοξέων 45-67, 76-98 και 113-132 για το 66/09, καθώς και μεταξύ των αμινοξέων 47-69, 76-98 και 113-135 για το 68/09. Σε επίπεδο αμινοξέων, τα δύο στελέχη εμφάνιζαν μεταξύ τους ποσοστό ομοιότητας 94,6 %, ενώ το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας σε σύγκριση με τα στελέχη αναφοράς διαπιστώθηκε με τα CCoVIIIb στελέχη (97,3% για το 66/09 και 100% για το 68/09) (Πίνακας 7, Παράρτημα). Εννέα νουκλεοτίδια πριν την έναρξη του γονιδίου, διαπιστώθηκε η παρουσία της διαγονιδιακής αλληλουχίας CTAAAC.

Από τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών με τη μέθοδο «Ένωσης Γειτόνων» διαπιστώθηκε ότι το ελληνικό στέλεχος NA/09 σχημάτιζε έναν κλάδο με το στέλεχος CB/05 και τα CCoVIIIb στελέχη 119/08, 430/07 και 68/09. Το ελληνικό στέλεχος 66/09 σχημάτιζε έναν άλλο κλάδο, μαζί με τα στελέχη αναφοράς του CCoVIIIb. Οι εν λόγω κλάδοι περιλάμβαναν στελέχη που είχαν ανιχνευθεί στα όργανα σκύλων (Εικόνα 27).



Εικόνα 27. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στην πρωτεΐνη Μ με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0. Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1.000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps» οι οποίες αναφέρονται σε ποσοστά επί τοις %. Διακρίνονται οι τιμές αυτοδυναμίας που είναι μεγαλύτερες του 60. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανά θέση. Τα ελληνικά στελέχη επισημαίνονται με έντονα, γαλάζια γράμματα. Με άγκιστρα επισημαίνονται οι κλάδοι όπου περιλαμβάνονται τα ελληνικά στελέχη και στελέχη αναφοράς που ανιχνεύθηκαν σε όργανα σκύλων. Στο δέντρο χρησιμοποιήθηκε ως παραομάδα το στέλεχος 240/05 του αναπνευστικού κοροναϊού του σκύλου.

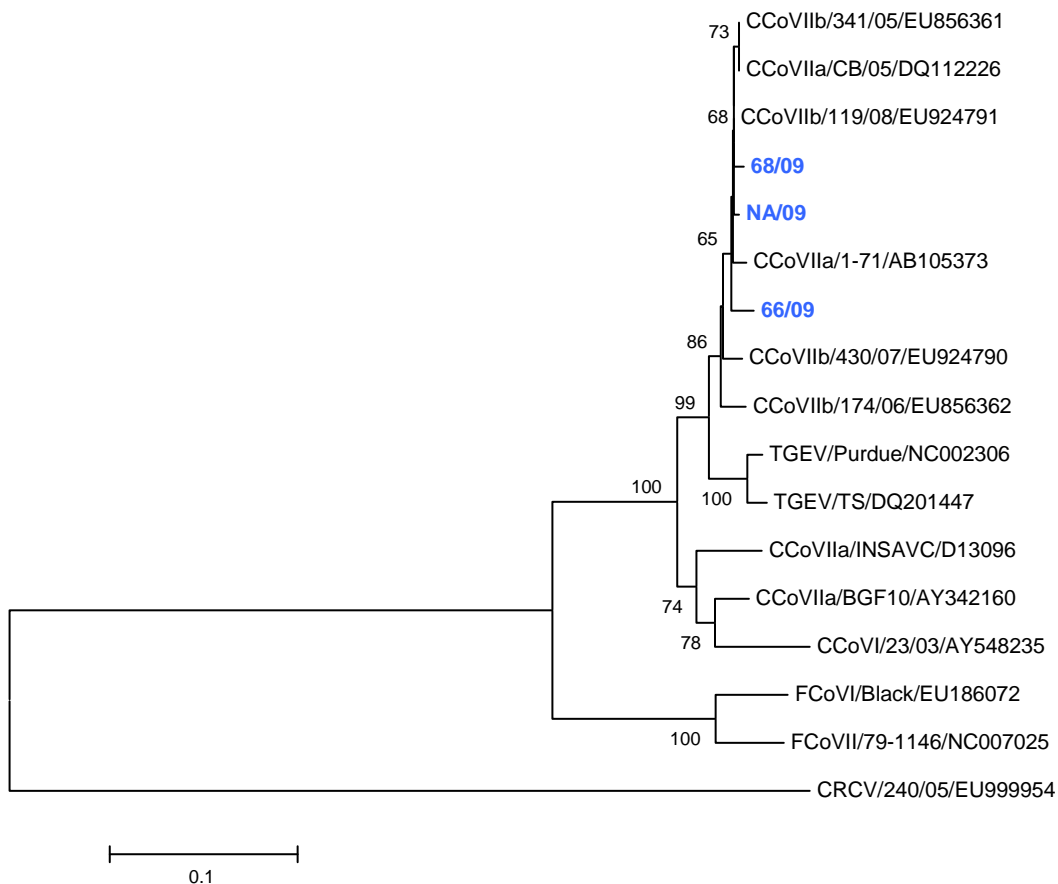
3.2.6.ε ORF6

Το γονίδιο Ν του στελέχους NA/09 είχε μήκος 1.149 νουκλεοτιδίων και κωδικοποιούσε την πρωτεΐνη Ν που απαρτιζόταν από 382 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη του NA/09 είχε ίδιο μήκος με εκείνη των στελεχών αναφοράς του CCoVIIa (CB/05, 1-71 και BGF10) με εξαίρεση το INSAVC (361). Με ανάλυση της πρωτεΐνης από το NetNGlyc server επισημάνθηκαν 5 πιθανές θέσεις Ν- γλυκοσυλίωσης, όσες και του

CB/05. Σε επίπεδο αμινοξέων, το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας (99,7%) διαπιστώθηκε σε σύγκριση με το CCoVIIIb στέλεχος 119/08. Από τα CCoVIIa στελέχη, το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας εμφανιζόταν σε σχέση με το CB/05 (99,4%). Με τα υπόλοιπα CCoVIIa στελέχη επισημάνθηκαν ποσοστά ομοιότητας 92,4%-98,9% (Πίνακας 8, Παράρτημα). Δώδεκα νουκλεοτίδια πριν την έναρξη του γονιδίου, διαπιστώθηκε η παρουσία της διαγονιδιακής αλληλουχίας CTAAAC.

Το γονίδιο N των στελεχών 66/09 και 68/09 είχε μήκος 1.149 νουκλεοτιδίων και κωδικοποιούσε την πρωτεΐνη N, που αποτελούνταν από 382 αμινοξέα. Με ανάλυση της πρωτεΐνης από το NetNGlyc server επισημάνθηκαν 4 (66/09) και 5 (68/09) πιθανές θέσεις N- γλυκοσυλίωσης. Σε επίπεδο αμινοξέων, τα δύο στελέχη εμφάνιζαν μεταξύ τους ποσοστό ομοιότητας 98,1 %, ενώ το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας παρατηρούνταν σε σχέση με το CCoVIIIb στέλεχος 119/08 (98,6% για το 66/09 και 99,4% για το 68/09,) (Πίνακας 8, Παράρτημα). Δώδεκα νουκλεοτίδια πριν την έναρξη του γονιδίου, διαπιστώθηκε η παρουσία της διαγονιδιακής αλληλουχίας CTAAAC.

Από τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών με τη μέθοδο «Ένωσης Γειτόνων» διαπιστώθηκε ότι τα ελληνικά στελέχη σχημάτιζαν έναν κλάδο, ο οποίος περιλάμβανε στελέχη αναφοράς τόσο του υποτύπου CCoVIIa, όσο και του υποτύπου CCoVIIIb. Τα στελέχη του CCoV και του TGEV σχημάτιζαν έναν μεγαλύτερο κλάδο, όπως αντίστοιχα και τα στελέχη του FCoV (Εικόνα 28).



Εικόνα 28. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στην πρωτεΐνη N με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0. Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1.000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps» οι οποίες αναφέρονται σε ποσοστά επί τοις %. Διακρίνονται οι τιμές αυτοδυναμίας που είναι μεγαλύτερες του 60. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανά θέση. Τα ελληνικά στελέχη επισημαίνονται με έντονα, γαλάζια γράμματα. Στο δέντρο χρησιμοποιήθηκε ως παραομάδα το στέλεχος 240/05 του αναπνευστικού κοροναϊού του σκύλου.

3.2.6.στ ORF7

Το ORF7 των ελληνικών στελεχών είχε μήκος 952 νουκλεοτιδίων και αποτελούνταν από δύο μικρότερα τμήματα, το ORF7a και το ORF7b. Επτά νουκλεοτίδια πριν το κωδικόνιο έναρξης του ORF 7, διαπιστώθηκε η παρουσία της διαγονιδιακής αλληλουχίας CTAAAC. Το ORF7a είχε μήκος 306 νουκλεοτίδια και για τα τρία στελέχη και κωδικοποιούσε τη μη δομική πρωτεΐνη 7a με μήκος 101 αμινοξέων. Στην πρωτεΐνη αυτή επισημάνθηκε 1 πιθανή θέση N- γλυκοσυλίωσης, όπως και στο CB/05, στα CCoVb στελέχη αναφοράς που ανιχνεύθηκαν στα όργανα,

αλλά και στο κλασικό στέλεχος INSAVC. Το ORF7a ήταν συντηρημένο με τα ελληνικά στελέχη να εμφανίζουν μεταξύ τους 99-99,6% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και 100% σε επίπεδο αμινοξέων (Πίνακας 9, Παράρτημα).

Το ORF7b άρχιζε 5 νουκλεοτίδια μετά τη λήξη του ORF7a. Η παρουσία της διαγονιδιακής αλληλουχίας, όπως αναμενόταν, δεν διαπιστώθηκε πριν την έναρξή του. Στο ORF7b παρατηρήθηκε μεγαλύτερη παραλλακτικότητα σε σύγκριση με τα στελέχη αναφοράς. Τα ελληνικά στελέχη, ωστόσο μεταξύ τους εμφάνιζαν ομοιότητα 99,2-99,3% σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και 98,5-100% σε επίπεδο αμινοξέων (Πίνακας 10, Παράρτημα). Στη μη δομική πρωτεΐνη 7b (213 αμινοξέα) δεν επισημάνθηκε καμία πιθανή θέση N- γλυκοσυλίωσης, όπως και στο CB/05, στα CCoVb στελέχη αναφοράς που ανιχνεύθηκαν στα όργανα, αλλά και στο κλασικό στέλεχος 1-71. Αντίθετα, στα στελέχη BGF10 και INSAVC, επισημάνθηκε 1 πιθανή θέση.

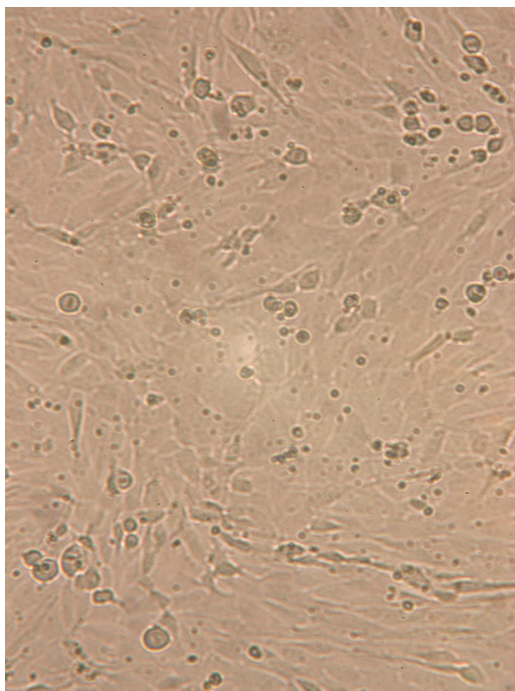
3.2.7 Απομόνωση στελεχών του CCoV σε κυτταροκαλλιέργειες, έμμεσος ανοσοφθορισμός και τιτλοποίηση του ιού

Με τη χρήση της συνεχούς κυτταρικής σειράς A72, επιτεύχθηκε η απομόνωση των δύο από τα τρία στελέχη που διαπερνούσαν τον εντερικό φραγμό.

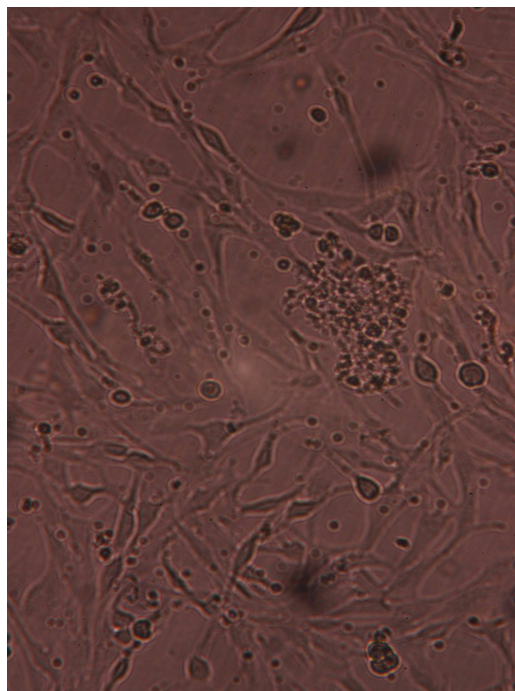
Όσον αφορά στο στέλεχος NA/09, μετά από τρεις διόδους στην κυτταρική σειρά A72, δεν διαπιστώθηκε κυτταροπαθολογικός δράση του ιού. Παράλληλα, χρησιμοποιώντας έμμεσο ανοσοφθορισμό, επιβεβαιώθηκε ότι τόσο τα όργανα, όσο και τα κόπρανα του ζώου ήταν αρνητικά για CCoV, ακόμα και μετά από 3 διόδους στα κύτταρα.

Όσον αφορά στα CCoVb στελέχη, 66/09 και 68/09, η κυτταροπαθολογικός δράση διαπιστώθηκε στη δεύτερη και τρίτη δίοδο, αντίστοιχα (Εικόνες 30 και 32), αποκλειστικά στις κυτταροκαλλιέργειες που ενοφθαλμίστηκαν με πνεύμονα ως παθολογικό υλικό. Στις Εικόνες 29 και 31 διακρίνονται φυσιολογικά, μη μολυσμένα, κύτταρα A72, με στόχο να γίνει αντιληπτή η κυτταροπαθολογικός δράση του ιού στις Εικόνες 30 και 32. Παράλληλα, η απομόνωση των παραπάνω στελεχών επιβεβαιώθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό (Εικόνες 33, 34). Με έμμεσο ανοσοφθορισμό αποδείχθηκε, επίσης, ότι οι κυτταροκαλλιέργειες οι οποίες είχαν ενοφθαλμιστεί με τα προαναφερθέντα στελέχη ήταν αρνητικές για CPV-2.

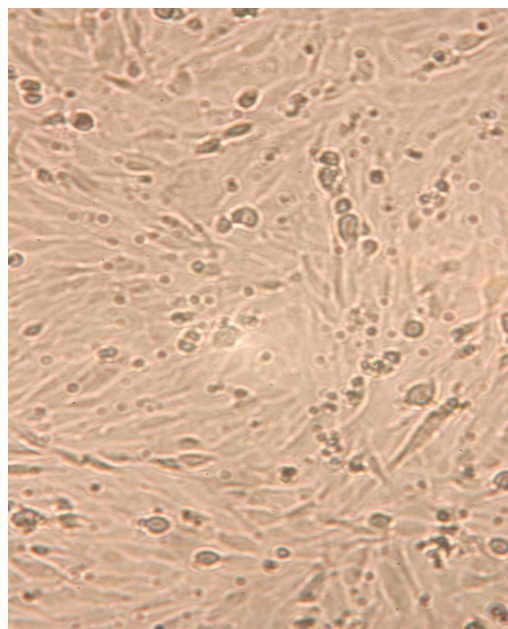
Από την τιτλοποίηση των δύο στελεχών που απομονώθηκαν, προέκυψε ότι ο τίτλος του 66/09 στην τρίτη δίοδο ήταν $10^{5.55}$ TCID₅₀/ml και του 68/09 $10^{5.3}$ TCID₅₀/ml.



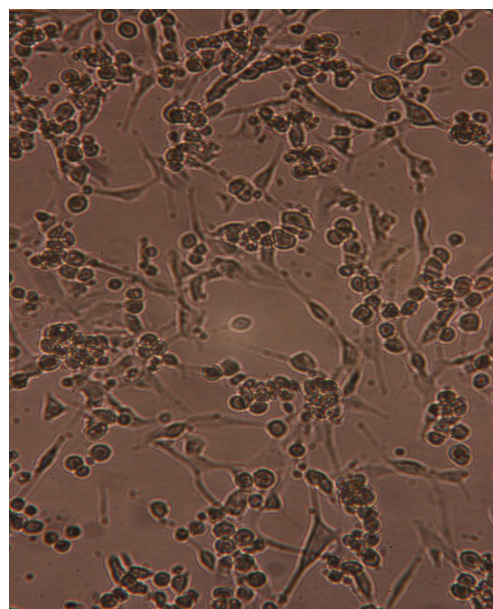
Εικόνα 29. Κυτταρική σειρά A72, 24 ώρες μετά τη δίοδο. Κύτταρα μη μολυσμένα (Μεγέθυνση x10).



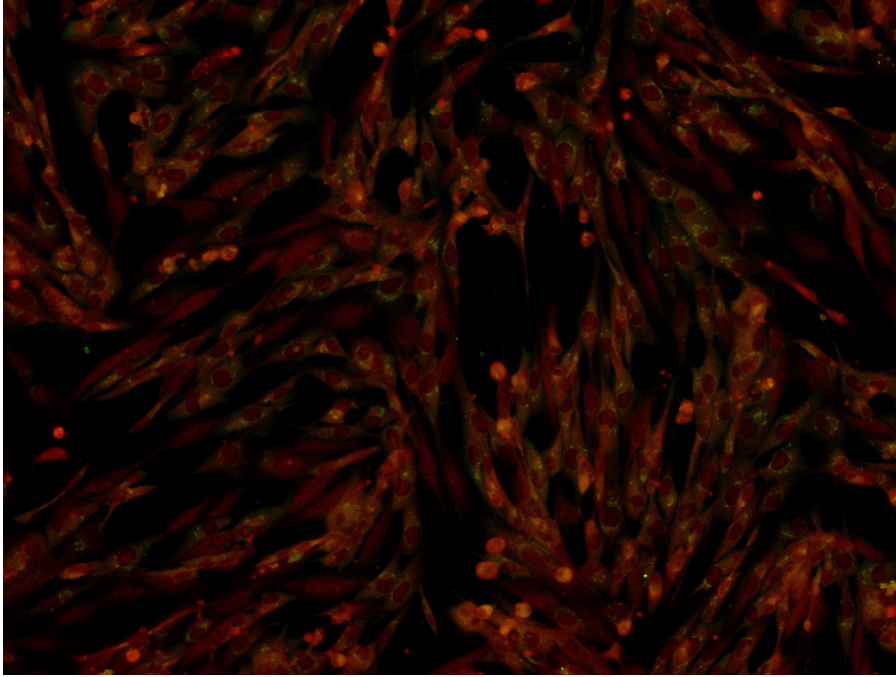
Εικόνα 30. Κυτταρική σειρά A72, 24 ώρες μετά τη δεύτερη δίοδο του ιού 66/09. Διακρίνεται το κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα (Μεγέθυνση x10).



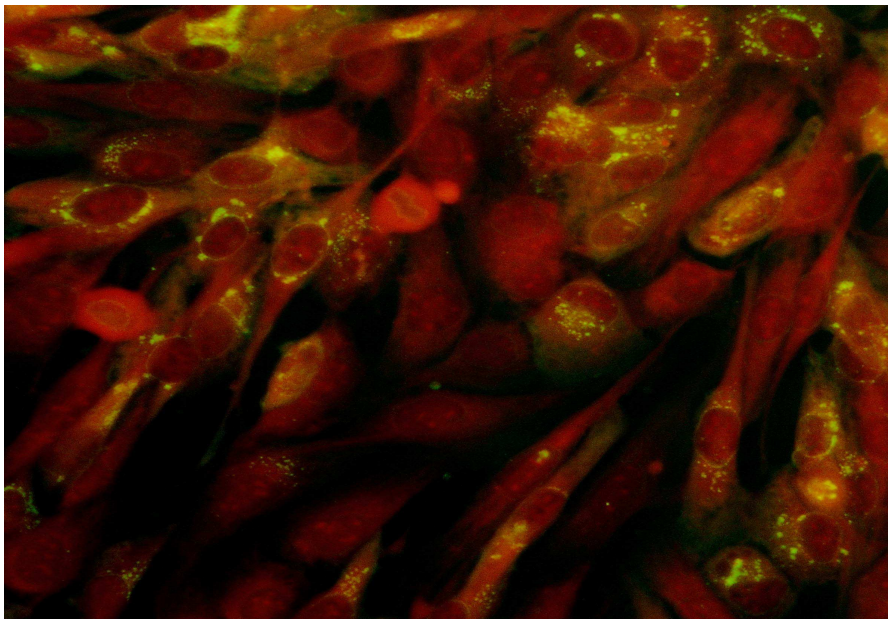
Εικόνα 31. Κυτταρική σειρά A72, 24 ώρες μετά τη δίοδο. Κύτταρα μη μολυσμένα (Μεγέθυνση x10).



Εικόνα 32. Κυτταρική σειρά A72, 24 ώρες μετά την τρίτη δίοδο του ιού 68/09. Διακρίνεται το κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα (Μεγέθυνση x10).



Εικόνα 33. Έμμεσος ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση του CCoV (στέλεχος 66/09) στην κύτταρική σειρά A72 (Μεγέθυνση x10).



Εικόνα 34. Έμμεσος ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση του CCoV (στέλεχος 68/09). Στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων διακρίνεται ειδικός φθορισμός στις περιοχές που συγκεντρώνονται τα ιικά σωματίδια. Από τα κύτταρα φθορίζει ειδικά το κυτταρόπλασμα και όχι ο πυρήνας, καθώς ο CCoV πολλαπλασιάζεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα και δεν εμφανίζει ενδοπυρηνική εντόπιση (Μεγέθυνση x40).

E. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο κοροναϊός του σκύλου αποτελεί έναν από τους κύριους παθογόνους παράγοντες που οδηγούν στην εμφάνιση οξείας διάρροιας στους σκύλους. Η ύπαρξή του διαπιστώθηκε για πρώτη φορά πριν από τρεις περίπου δεκαετίες (Binn et al., 1974). Έκτοτε, και με διάφορες μεθόδους, αποδείχτηκε προοδευτικά η παγκόσμια εξάπλωση του ιού (Pollock and Carmichael, 1979; Carmichael and Binn, 1981; Appel, 1987; Bandai et al., 1999; Naylor et al., 2001b). Στην Ελλάδα, ωστόσο, μέχρι πρόσφατα, δεν είχαν γίνει μελέτες που αφορούσαν στην παρουσία του, με εξαίρεση την περιορισμένου εύρους έρευνα σε κρούσμα επιζωοτικής οξείας διάρροιας που συσχετίστηκε με την ανίχνευση του CCoV και αφορούσε σε ένα κυνοκομείο της Θεσσαλίας το 2008 (Ντάφης κ.ά., 2008).

Αποτέλεσμα της απουσίας εμπειριστατωμένης έρευνας μέχρι πρόσφατα στο πεδίο αυτό, είναι ότι πολλοί κτηνίατροι θεωρούν ότι ο CCoV δεν υπάρχει ή δεν εμφανίζεται συχνά στους σκύλους στην Ελλάδα (Ντάφης, προσωπική παρατήρηση). Στη συγκεκριμένη μελέτη, με χρήση μοριακών μεθόδων, ο CCoV ανιχνεύθηκε σε υψηλό ποσοστό (65,05%) των ζώων που εμφάνιζαν οξεία διάρροια. Το ποσοστό αυτό είναι υψηλότερο από εκείνα που καταγράφηκαν με χρήση μοριακών τεχνικών σε άλλες χώρες, όπως η Ιταλία, η Τουρκία, η Αγγλία, η Ιαπωνία και η Πορτογαλία, αλλά χαμηλότερο από το αντίστοιχο της Ουγγαρίας (78%) (Bandai et al., 1999; Yesilbag et al., 2004; Decaro et al., 2010). Από τα παραπάνω καταδεικνύεται η παρουσία του CCoV και στην Ελλάδα και γίνεται σαφές ότι ο ιός αυτός εμπλέκεται σε υψηλό ποσοστό στην εκδήλωση οξείας διάρροιας. Παράλληλα, η διασπορά του στη χώρα είναι εκτεταμένη, εφόσον ανιχνεύθηκε σε όλες τις περιοχές από τις οποίες εξετάστηκαν σκύλοι.

Επίσης, με βάση τα ευρήματα της παρούσας έρευνας είναι φανερό ότι ο CCoV ανευρίσκεται σε υψηλότερο ποσοστό στα ζώα τα οποία διαβιούν ομαδικά (σε κυνοκομεία και καταστήματα πώλησης ζώων συντροφιάς), σε σχέση με τα οικόσιτα. Το υψηλό ποσοστό που καταγράφηκε στα ομαδικώς διαβιούντα σκυλιά μπορεί να αποδοθεί στον τρόπο μετάδοσης του CCoV από ζώο σε ζώο, στη στενή επαφή των ζώων καθώς και στην υψηλή μεταδοτικότητά του. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο θεωρητικό μέρος της διατριβής, η πιο σημαντική πηγή μόλυνσης θεωρούνται τα μολυσμένα κόπρανα, με τον CCoV να μεταδίδεται κυρίως μέσω της πεπτικής και της

αναπνευστικής οδού (Enjuanes et al., 2000). Ο ιός μπορεί να αποβάλλεται για μέρες έως και μήνες με τα κόπρανα (Keenan et al., 1976, Pratelli et al., 2001a και Pratelli et al., 2002b) μολύνοντας ζώα, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις πυκνών πληθυσμών (συνωστισμού). Άλλωστε, και σε διεθνείς έρευνες έχουν αναφερθεί υψηλότερα ποσοστά ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του CCoV στα ζώα που διαβιούν ομαδικά, σε σχέση με εκείνα που ζουν μεμονωμένα (Rimmelzwaan et al., 1991; Naylor et al., 2001b). Σε κάποιες περιπτώσεις μάλιστα, έχει αναφερθεί ότι η οροθετικότητα σε σκύλους κυνοκομείων μπορεί να φτάσει σε πολύ υψηλά επίπεδα (94,2%-100%), υποδηλώνοντας ότι ο ιός κυκλοφορεί στους χώρους αυτούς και μεταδίδεται εύκολα, σχεδόν σε όλα τα ζώα (Tennant et al., 1993; Yesilbag et al., 2004). Στην παρούσα μελέτη, ο CCoV ανιχνεύτηκε σε όλα τα κρούσματα που καταγράφηκαν στα κυνοκομεία με την εξαίρεση μόνο ενός (κυνοκομείο Αττικής). Παρά τα υψηλά ποσοστά ανίχνευσης του ιού στους χώρους αυτούς, γίνεται αντιληπτό ότι δεν αποτελεί πάντα ένα από τα αίτια της εμφάνισης επιζωοτιών οξείας διάρροιας. Φαίνεται, λοιπόν, ότι παρ' όλο που στα κυνοκομεία ο CCoV είναι συνήθως παρών, δεν μπορεί να αποκλειστεί η απουσία του, είτε λόγω μη εισόδου του στους χώρους αυτούς (είσοδος αρνητικών στον CCoV ζώων), είτε λόγω εφαρμογής ικανοποιητικών μέτρων πρόληψης και ελέγχου, με αποτέλεσμα την εκρίζωσή του. Αντίστοιχα αποτελέσματα άλλωστε έχουν καταγραφεί διεθνώς και στο παρελθόν, όπου με χρήση ορολογικών μεθόδων ανιχνεύθηκαν οροαρνητικά κυνοκομεία, σε πολύ χαμηλό, ωστόσο, ποσοστό (Naylor et al., 2001b).

Επιπλέον, ο CCoV ανιχνεύτηκε σε υψηλότερο ποσοστό στα κουτάβια κάτω των τριών μηνών, σε σύγκριση με τα ζώα μεγαλύτερης ηλικίας. Όσον αφορά στα νεαρά ζώα, έχει παρατηρηθεί ότι είναι πιο ευπαθή σε σχέση με τα ενήλικα (Appel, 1987). Η συγκεκριμένη διαφορά στη συχνότητα προσβολής των ζώων μπορεί να αποδοθεί στη φυσική μητρική ανοσία. Τα μητρικά αντισώματα προστατεύουν συνήθως τα κουτάβια για περίπου 4-5 εβδομάδες μετά τη γέννησή τους, ωστόσο ο τίτλος τους είναι χαμηλός σε όλο το προαναφερθέν διάστημα (Appel, 1987). Μετά την πτώση του εν λόγω τίτλου και χωρίς την εφαρμογή εμβολιασμών, τα ζώα είναι ιδιαίτερα ευπαθή στη λοίμωξη από CCoV. Αντίθετα, στις μεγαλύτερες ηλικίες, είναι πιθανόν η ανοσία από προηγούμενη φυσική λοίμωξη να προστατεύει τα ζώα ή ακόμα η λοίμωξη να μη γίνει αντιληπτή, λόγω της μικρότερης ευπάθειας που εμφανίζουν. Παρ' όλα αυτά στην παρούσα μελέτη, ανάμεσα στα θετικά με οξεία διάρροια ζώα,

υπήρχε κι ένα ηλικίας 12 ετών (98/08), υποδεικνύοντας ότι ο CCoV, παρά το ότι έχει συσχετιστεί κυρίως με πρόκληση εντερίτιδας σε νεαρά ζώα, είναι δυνατό να ανιχνευθεί ακόμα και σε ζώα πολύ μεγάλης ηλικίας.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό του CCoV χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι RT-PCR και real-time (RT-) PCR. Τα αποτελέσματα τους ωστόσο δεν ήταν σε απόλυτη αντιστοιχία, διότι υπήρχαν στελέχη που ανιχνεύτηκαν (4/206) ή/και χαρακτηρίστηκαν (8/134 τύπου I CCoV, 7/134 τύπου II CCoV) μόνο με τη real time (RT-) PCR. Το γεγονός αυτό δεν αποτελεί έκπληξη, εφόσον είναι γνωστό ότι η real-time (RT-) PCR χαρακτηρίζεται από υψηλότερη ευαισθησία (Decaro et al., 2004a; Decaro et al., 2005b). Ωστόσο, υπήρχαν στελέχη που ανιχνεύθηκαν (2/206) ή/και χαρακτηρίστηκαν (2/134 τύπου I CCoV και 7/134 τύπου II CCoV) μόνο με τη RT-PCR. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στο ότι οι παραπάνω μέθοδοι ενισχύουν διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος του CCoV. Συγκεκριμένα, οι ειδικές του τύπου RT-PCRs που χρησιμοποιήθηκαν ενίσχυαν τμήμα του γονιδίου S, ενώ οι αντίστοιχες real time (RT-) PCRs τμήμα του γονιδίου M. Με βάση το γεγονός ότι ο κοροναϊός του σκύλου εμφανίζει αρκετά συχνά μεταλλάξεις, είναι φανερό ότι δεν αποκλείεται η πιθανότητα ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, λόγω έλλειψης συμπληρωματικότητας των εκκινητών και του cDNA. Φαίνεται λοιπόν, ότι όσον αφορά στον CCoV, δεν υπάρχει μέθοδος που να αποτελεί το χρυσό πρότυπο, καθώς η real (RT-) time, παρά την αυξημένη, σε σχέση με την RT-PCR, ευαισθησία που εμφανίζει, μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Με συνδυασμό, ωστόσο των δύο μεθόδων και παράλληλη ερμηνεία των αποτελεσμάτων επιτυγχάνεται η ορθότερη εξαγωγή συμπερασμάτων.

Σε διεθνές επίπεδο, σχετικά με τους τύπους και τους υποτύπους του CCoV, φαίνεται ότι τα ευρήματα εναλλάσσονται, με αποτέλεσμα να μη μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σε σχέση με την κατανομή τους στον πληθυσμό των σκύλων. Σε έρευνα με χρήση μοριακών μεθόδων που έλαβε χώρα στην Ιταλία το 2004, σε κουτάβια που εμφάνιζαν διάρροια, διαπιστώθηκε ότι στη συντριπτική πλειοψηφία (76,8%) υπήρχε μεικτή μόλυνση, με ταυτόχρονη παρουσία και των δύο τύπων (Pratelli et al., 2004a). Ωστόσο, ένα χρόνο μετά, διαπιστώθηκε ότι ο τύπου I CCoV ανιχνευόταν σε υψηλότερο ποσοστό (47,8%), σε σχέση με τον CCoV τύπο II (28,6%) ή τις μεικτές, με παρουσία και των δύο τύπων, μολύνσεις (23,6%) (Decaro et al., 2005b). Κάτι ανάλογο έχει παρατηρηθεί και στους δύο τύπους του κοροναϊού της

γάτας, με τον τύπο I να ανιχνεύεται με μεγαλύτερη συχνότητα από τον τύπο II στις γάτες (Hohdatsu et al., 1992, Benetka et al., 2004). Στην Τουρκία, έχει παρατηρηθεί η κυριαρχία του CCoV τύπου II (Yesilbag et al., 2004). Από τα δεδομένα, αυτό που γίνεται σαφές, από επιζωοτιολογικής άποψης, είναι ότι κυκλοφορούν και οι δύο τύποι και είναι δυνατό να προκαλέσουν μεικτές μολύνσεις σε αυξημένη συχνότητα.

Όσον αφορά στο χαρακτηρισμό των τύπων και των υποτύπων του CCoV που ανιχνεύθηκαν στην Ελλάδα, φαίνεται ότι ο τύπος I είναι αυτός που εμφανίζεται συχνότερα, σε σύγκριση με τον CCoVIIa και τον CCoVIIb. Ανάμεσα στους δύο τύπους όμως, αθροίζοντας τα αποτελέσματα των δύο υποτύπων, είναι ο II αυτός που κυριαρχεί, γεγονός που είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από τις υπόλοιπες ευρωπαϊκές χώρες και την Τουρκία, όπου έχει λάβει χώρα αντίστοιχη έρευνα (Yesilbag et al., 2004; Decaro et al., 2010). Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τις μεικτές μολύνσεις που διαπιστώθηκαν στην παρούσα έρευνα, γίνεται εμφανές ότι στην πλειοψηφία των θετικών δειγμάτων (47,01%) ανιχνεύονταν παραπάνω από ένας CCoV. Μάλιστα, ανιχνεύτηκε μεικτή των δύο υποτύπων μόλυνση (CCoVIIa/IIb) ή ακόμα και ταυτόχρονη παρουσία των δύο τύπων και των δύο υποτύπων (CCoVI/IIa/IIb), σε χαμηλά ωστόσο ποσοστά ((11,11% και 4,76% επί του συνόλου των μεικτών μολύνσεων, αντίστοιχα). Οι μεικτές μολύνσεις CCoV/IIa/IIb αναφέρονται πρώτη φορά σε διεθνές επίπεδο, καθώς μέχρι στιγμής, οι αντίστοιχες αναφορές αφορούν σε I/IIa, I/IIb και IIa/IIb μολύνσεις (Decaro et al., 2009; Erles and Brownlie, 2009; Decaro et al., 2010). Οι μεικτές από CCoV μολύνσεις είναι συχνές στους σκύλους (Pratelli et al., 2004a), χωρίς ωστόσο ο ρόλος τους να είναι απόλυτα αποσαφηνισμένος. Από διεθνείς προκαταρκτικές μελέτες, έχει διαπιστωθεί ότι οι μολύνσεις από τον CCoV τύπο I και II σχετίζονται με δριμύτερη συμπτωματολογία, σε σχέση με εκείνες που οφείλονται σε προσβολή από τον ένα από τους δύο τύπους (Decaro et al., 2005b). Εντούτοις, το γεγονός ότι δεν έχει επιτευχθεί ακόμα η απομόνωση του τύπου I CCoV σε κυτταροκαλλιέργειες, δυσχεραίνει την εκτενή έρευνα, σχετικά με την παθογένεια, τόσο αυτού, όσο και των μεικτών μολύνσεων κατ'επέκταση.

Τελευταία, έλαβε χώρα και ο διαχωρισμός του τύπου II σε δύο νέους υποτύπους, τον CCoVIIa, όπου ανήκουν τα κλασικά CCoV στελέχη και τον CCoVIIb, όπου περιλαμβάνονται τα πρόσφατα αναγνωρισμένα TGEV-like ανασυνδυασμένα στελέχη (Decaro et al., 2009; Erles and Brownlie, 2009). Στην

παρούσα μελέτη, στο σύνολο των θετικών για CCoV δειγμάτων, ο νέος αυτός υπότυπος ανιχνεύτηκε σε ένα σημαντικό ποσοστό (10,2%). Το ποσοστό αυτό είναι χαμηλότερο συγκρινόμενο με αντίστοιχα ποσοστά των TGEV-like στελεχών σε άλλες χώρες της Ευρώπης, όπως η Αγγλία, η Ιταλία και η Ουγγαρία. Το υψηλότερο ποσοστό ανίχνευσης τέτοιων στελεχών στις ευρωπαϊκές χώρες στις οποίες έχει λάβει χώρα μελέτη, συγκεντρώνει συγκεκριμένα η Ουγγαρία (96,87%) (Decaro et al., 2010). Στην παρούσα μελέτη, η ανίχνευση των TGEV-like στελεχών σε δείγματα προερχόμενα από τους νομούς Αττικής και Θεσσαλονίκης, καθώς και σε δείγματα τόσο από κλινικές, όσο και από κυνοκομεία και καταστήματα πώλησης ζώων συντροφιάς, υποδηλώνει την παρουσία τους στη χώρα, σε αρκετά σημαντικό ποσοστό.

Σχετικά με τη φυλογενετική σχέση των κοροναϊών, καθώς και με τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένειά τους, φαίνεται ότι η μοριακή ανάλυση του ιικού RNA στελεχών του CCoV αποτελεί ένα από τα εργαλεία εκλογής. Στη συγκεκριμένη μελέτη, για τη μοριακή και φυλογενετική ανάλυση επιλέχτηκε το αμινοτελικό άκρο της γλυκοπρωτεΐνης S. Το γονίδιο S που την κωδικοποιεί, αποτελεί μία από τις περιοχές του ιικού γονιδιώματος στην οποία εμφανίζονται μεταλλάξεις και ανασυνδυασμοί με μεγάλη συχνότητα (Horsburgh and Brown, 1993; Wang and Lu, 2009). Η γλυκοπρωτεΐνη S μπορεί να χωριστεί σε τρεις δομικές περιοχές, μία εξωτερική, μία ενδομεμβρανική και μία μικρή καρβοξυτελική περιοχή. Από αυτές, η πρώτη χωρίζεται σε δύο μικρότερες περιοχές, την S1, που αντιστοιχεί στο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης και στο σφαιρικό αντίστοιχα τμήμα της αιχμής και στο τμήμα της S2, που αντιστοιχεί στο μίσχο της αιχμής. Οι μεταλλάξεις στην S1 περιοχή είναι πάρα πολύ συνηθισμένες και συνδέονται με αλλαγές στην αντιγονικότητα και στην παθογένεια του ιού, ενώ αντιθέτως η S2 περιοχή είναι πιο συντηρημένη. Επιπλέον, η περιοχή που συνδέεται με τους υποδοχείς των κυττάρων φαίνεται να βρίσκεται στην S1 περιοχή. Συνεπώς, η αλληλουχία των αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης S φαίνεται να καθορίζει και τον τροπισμό των ιών προς συγκεκριμένα κύτταρα-στόχο, δίνοντας ιδιαίτερη βαρύτητα στην εν λόγω περιοχή (Suzuki et al., 1996; Sanchez et al., 1999; Lai and Holmes, 2001).

Από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης των νουκλεοτιδίων, της πολλαπλής στοίχισης και της φυλογενετικής ανάλυσης των στελεχών του CCoV τύπου I που ανιχνεύτηκαν στα κόπρανα των ζώων, καταδεικνύεται η έντονη παραλλακτικότητα

των ελληνικών στελεχών στη συγκεκριμένη περιοχή τόσο μεταξύ τους, όσο και σε σχέση με τα στελέχη αναφοράς. Η παραλλακτικότητα, όμως, των ελληνικών στελεχών σε σχέση με τα στελέχη αναφοράς μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι στην GenBank είναι διαθέσιμα τα αντίστοιχα γονιδιωματικά τμήματα μόνο από δύο στελέχη αναφοράς τύπου I. Ωστόσο, η έντονη παραλλακτικότητα που παρατηρήθηκε κατά τη σύγκριση των ελληνικών στελεχών μεταξύ τους, αποδεικνύει ότι η συγκεκριμένη περιοχή του CCoV τύπου I δεν εμφανίζει συντήρηση. Τα περισσότερα ελληνικά στελέχη φάνηκε ότι ομοιάζουν με το στέλεχος αναφοράς 23/03 και μόνο δύο από αυτά με το στέλεχος Elmo/02. Εντύπωση, ωστόσο, προκάλεσε η ανεύρεση 3 στελεχών που εμφάνιζαν στο εν λόγω τμήμα συντηρημένες περιοχές και με τα δύο στελέχη, υποδηλώνοντας την παρουσία «ενδιάμεσων» στελεχών. Επιπλέον, από την ανάλυση δύο στελεχών από κρούσμα επιζωοτικής οξείας διάρροιας σε κατάσταση πώλησης ζώων (AT/02/09/GR και AT/05/09/GR), διαπιστώθηκε η ύπαρξη δύο διαφορετικών τύπου I CCoVs, καταδεικνύοντας ότι στην εμφάνιση ανάλογων κρουσμάτων είναι δυνατή η εμπλοκή περισσότερων του ενός από κάθε τύπο στελεχών.

Από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης των νουκλεοτιδίων, της πολλαπλής στοίχισης και της φυλογενετικής ανάλυσης των στελεχών CCoV υποτύπου IIa που ανιχνεύτηκαν στα κόπρανα των ζώων, φάνηκε ότι η παραλλακτικότητά τους ήταν μικρότερη σε σύγκριση με εκείνη που διαπιστώθηκε στα στελέχη τύπου I. Προς το παρόν, θεωρείται ότι ο CCoVIIa εμφανίστηκε μεταγενέστερα του CCoV I (Lorusso et al., 2007). Λαμβάνοντας αυτό υπόψη, είναι εμφανές ότι ο CCoVIIa εξελίσσεται, μέσω μεταλλάξεων και κάτω από την πίεση που του ασκεί το ανοσοποιητικό σύστημα των σκύλων, για μικρότερο χρονικό διάστημα. Οι ελληνικοί CCoVIIa ιοί εμφάνιζαν υψηλό ποσοστό ομοιότητας μεταξύ τους, καθώς και με το παντρόπο στέλεχος CB/05 (στέλεχος αναφοράς των CCoVIIa). Δύο μάλιστα από τα ελληνικά στελέχη (AT/03/09/GR και TH/10/09/GR) εμφάνιζαν στην πρωτεΐνη S αμινοξέα (θέσεις 73 και 125 αντίστοιχα), τα οποία στο παρελθόν είχαν θεωρηθεί ως μοναδικά του στελέχους CB/05 (Decaro et al., 2007b). Βάσει του γεγονότος ότι οι σκύλοι στους οποίους ανιχνεύτηκαν τα εν λόγω στελέχη δεν πέθαναν, μπορεί να θεωρηθεί ότι ενδεχομένως οι μεταλλάξεις αυτές δεν σχετίζονται άμεσα με την ανάδυση παντρόπων στελεχών, υψηλής λοιμογόνου δύναμης.

Από το σύνολο των ζώων που εξετάστηκαν, εντύπωση προκάλεσε η εμφάνιση τριών ομαδικών επιζωοτιών οξείας διάρροιας σε ζώα του κυνοκομείου των Τρικάλων. Οι επιζωοτίες αυτές εμφανίστηκαν με διαφορά μηνών και αφορούσαν μόνο τα νεαρά νεοεισερχόμενα ζώα, που εισήχθησαν στο κυνοκομείο εκείνο το διάστημα. Στο κυνοκομείο παράλληλα, διαβιούσαν ενήλικοι σκύλοι, οι οποίοι δεν εμφάνισαν συμπτώματα. Οι επιζωοτίες σημειώθηκαν το Δεκέμβριο του 2007 (σκύλοι 01/07, 02/07, 03/07, 04/07, 06/07) τον Ιανουάριο του 2008 (σκύλοι 01/08-05/08) και τον Απρίλιο του ίδιου έτους (σκύλοι 54/08-56/08) (Παράρτημα, Πίνακας 1). Από το ιστορικό προέκυψε ότι τα ζώα των δύο πρώτων επιζωοτιών ήταν ανεμβολίαστα, ενώ τα ζώα της τρίτης είχαν εμβολιαστεί 1 φορά έναντι της παρβοϊώσης, της νόσου του Carré, της λοιμώδους ηπατίτιδας, της λεπτοσπείρωσης και της παραγρίπης, πέντε ημέρες πριν την εμφάνιση του κλινικού περιστατικού. Όλα τα ζώα είχαν λάβει αντιπαρασιτική αγωγή.

Από τη φυλογενετική ανάλυση φαίνεται ότι πρόκειται για το ίδιο στέλεχος που παρέμεινε στο χώρο για 5 μήνες (Δεκέμβριος 2007-Απρίλιος 2008), χωρίς στα μεσοδιαστήματα των επιζωοτιών να παρατηρούνται συμπτώματα στα ζώα. Στις δύο πρώτες επιζωοτίες, ανιχνεύτηκε παράλληλη μόλυνση με CPV-2, ενώ στην τρίτη ο CPV-2 ανιχνεύτηκε μόλις σε 1 από τα 11 ζώα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο CCoV σχετιζόταν άμεσα με την εμφάνιση αυτής (Ntafis et al., 2010b). Το γεγονός ότι το ίδιο στέλεχος CCoV ανιχνεύτηκε τρεις φορές μέσα σε διάστημα 5 μηνών μπορεί να οφείλεται στο ότι ο κοροναϊός είναι δυνατό να αποβάλλεται από ένα ζώο για μεγάλο χρονικό διάστημα (Pratelli et al., 2001a; 2002b). Όμως, δεν μπορεί να αποκλειστεί μία ενδεχόμενη αφανής ή απαρατήρητη μόλυνση των ενηλίκων κατά τα μεσοδιαστήματα, που οδήγησε στη συνεχή παραμονή του ιού στο χώρο του κυνοκομείου, διότι όπως είναι γνωστό αφενός τα ενήλικα ζώα είναι λιγότερο ευπαθή από τα νεαρά (Appel, 1987; Carmichael and Binn, 1981) και αφετέρου ο CCoV έχει ανιχνευθεί σε ζώα τα οποία δεν εμφανίζουν συμπτώματα (Rimmelzwaan et al., 1991; Tennant et al., 1993). Ακόμη, πρέπει να ληφθεί υπόψη και η περίπτωση επανεισόδου του ιού στο κυνοκομείο με τα νέα ζώα που εισήχθησαν, αλλά το γεγονός ότι τα κρούσματα εκδηλώθηκαν λίγες ημέρες μετά την είσοδο των σκύλων, συνηγορεί υπέρ μιας πιθανής επίμονης μόλυνσης, με αποτέλεσμα την παραμονή του CCoV στο κυνοκομείο. Βέβαια, η επιβίωση του ιού στο χώρο του κυνοκομείου κατά τα μεσοδιαστήματα, χωρίς να αποβάλλεται εκ νέου από τα ζώα, θεωρείται απίθανη λόγω

της αυξημένης ευαισθησίας του στις συνθήκες του περιβάλλοντος (Tennant et al., 1994). Κλείνοντας, αξίζει να σημειωθεί ότι και άλλοι ιοί του πεπτικού συστήματος, όπως ο ροταϊός, είναι δυνατό να παραμένουν σε ένα χώρο κατά τα μεσοδιαστήματα των κρουσμάτων (Ntafis et al., 2010a).

Η παρουσία του CPV-2 σε ένα μόνο δείγμα κατά τη διάρκεια της 3^{ης} επιζωοτίας δικαιολογείται, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα ζώα είχαν εμβολιαστεί πριν την εκδήλωση των συμπτωμάτων. Επομένως, η μόλυνση στο εν λόγω ζώο μπορεί να οφείλεται είτε σε μη σωστή εφαρμογή του εμβολιασμού, είτε σε αδυναμία ανοσοποίησης του ζώου, λόγω της εξουδετέρωσης του εμβολιακού ιού από τα μητρικά αντισώματα. Η παρουσία των μητρικών αντισωμάτων, ο τίτλος των οποίων ποικίλλει ακόμα και ανάμεσα στα ζώα της ίδιας τοκετοομάδας, αποτελεί σύνηθες αίτιο αποτυχίας ανοσοποίησης των ζώων με εμβολιασμό (Buonavoglia et al., 1992; Waner et al., 1996).

Από τα CCoVIIa στελέχη, έντονο επίσης ενδιαφέρον προκάλεσε το ED/99/08/GR, το οποίο ανιχνεύθηκε σε σκύλο από το νομό Πέλλας. Το συγκεκριμένο στέλεχος εμφάνιζε το χαμηλότερο ποσοστό ομοιότητας με τα υπόλοιπα ελληνικά στελέχη, ενώ ιδιαίτερα χαμηλό ήταν και το ποσοστό ομοιότητας που εμφάνιζε με τα διεθνή στελέχη αναφοράς. Αιτία αυτής της παραλλακτικότητας ήταν οι αντικαταστάσεις αμινοξέων στις πρώτες 24 θέσεις του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης S, καθώς και η προσθήκη 6 αμινοξέων στο τμήμα που αλληλουχίστηκε. Έχει βρεθεί ότι ακόμα και πολύ μικρές αλλαγές σε επίπεδο αμινοξέων της πρωτεΐνης S, μπορεί να προκαλέσουν μεταβολές της λοιμογόνου δύναμης ακόμα και πολύ συγγενικών φυλογενετικά στελεχών (Sanchez et al., 1999). Επίσης, κατά καιρούς έχουν ανιχνευθεί διάφορα αποκλίνοντα, μη τυπικά στελέχη του κοροναϊού του σκύλου, υποδηλώνοντας τη γενετική ποικιλομορφία του συγκεκριμένου ιού (Benetka et al., 2006; Escutenaire et al., 2007a). Ένα από αυτά είναι και το στέλεχος UWSMN-1, το οποίο ανιχνεύθηκε στην Αυστραλία και βρέθηκε να έχει 13,9-17% διαφορά σε επίπεδο νουκλεοτιδίων από τα στελέχη αναφοράς του CCoV τύπου II (Naylor et al., 2002), αλλά και το BGF10 που ανιχνεύτηκε στη Μεγάλη Βρετανία. Τα δύο αυτά στελέχη συνδέθηκαν με κρούσματα επιζωοτικής οξείας γαστρεντερίτιδας και τους αποδόθηκε υψηλή λοιμογόνος δύναμη (Naylor et al., 2001a; Naylor et al., 2002; Sanchez-Morgado et al., 2004). Στην παρούσα μελέτη, το στέλεχος ED/99/08/GR ανιχνεύθηκε σε σκύλο με οξεία αιμορραγική διάρροια, που οδήγησε σε θάνατο.

Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι στο ζώο ανιχνεύθηκε παράλληλα και ο CPV-2, ο οποίος προκαλεί παρόμοια συμπτωματολογία και είναι γνωστό ότι σε ανάλογες μεικτές μολύνσεις τα συμπτώματα που εμφανίζει το ζώο είναι δριμύτερα (McCaw and Hoskins, 2006). Λόγω της ταυτόχρονης μόλυνσης από τον CPV-2, δεν είναι δυνατό να ισχυριστεί κανείς ότι το εν λόγω στέλεχος χαρακτηρίζεται από υψηλή λοιμογόνο δύναμη, αυτό όμως που μπορεί να ειπωθεί είναι ότι η ύπαρξή του αποτελεί άλλη μία απόδειξη της έντονης παραλλακτικότητας που εμφανίζει ο CCoV.

Όσον αφορά στα στελέχη CCoVb που ανιχνεύθηκαν στα κόπρανα των ζώων, τα αποτελέσματα της αλληλούχησης των νουκλεοτιδίων, της πολλαπλής στοίχισης και της φυλογενετικής ανάλυσης έδειξαν ακόμα μικρότερη παραλλακτικότητα σε σύγκριση με εκείνη που διαπιστώθηκε στον τύπο I και στον υπότυπο Πα. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι τα νέα ανασυνδυασμένα στελέχη διαπιστώθηκε ότι κυκλοφορούν την τελευταία δεκαετία, με το παλαιότερο δείγμα στο οποίο έχουν ανιχνευτεί να χρονολογείται από το 2001 (Decaro et al., 2010). Έτσι, το χρονικό διάστημα το οποίο είχαν στη διάθεσή τους να εξελιχθούν μέσω μεταλλάξεων, ενώ βρίσκονται κάτω από την πίεση των ανοσολογικών μηχανισμών ήταν πολύ μικρότερο απ' ότι εκείνο του τύπου I και του υποτύπου Πα. Από τη μοριακή ανάλυση έγινε εμφανές ότι σε κρούσμα που εκδηλώθηκε σε κυνοκομείο της Θεσσαλονίκης, οι CCoVb ιοί που ανιχνεύθηκαν ανήκαν στο ίδιο στέλεχος. Παράλληλα, οι ελληνικοί CCoVb ιοί βρέθηκαν να ομοιάζουν φυλογενετικά με τα νέα TGEV-like στελέχη και όχι με το «παλαιό» (δεκαετίας '70) αμερικάνικο στέλεχος UCD-1, για το οποίο κυριαρχεί η άποψη ότι προήλθε από ανασυνδυασμό σε διαφορετική χρονική στιγμή, πολύ παλιότερα από το 2001 (Decaro et al., 2010). Οι ελληνικοί επίσης ιοί φυλογενετικά βρέθηκαν πιο κοντά με στελέχη που προέρχονται από τις χώρες της ανατολικής Ευρώπης και πιο απομακρυσμένα με τα στελέχη που έχουν ανιχνευθεί στο Ηνωμένο Βασίλειο. Στην Ιταλία, δύο από τα τέσσερα «ιταλικά» στελέχη αναφοράς, το 174/06 και το 119/08, ανιχνεύθηκαν σε σκύλους που μόλις είχαν εισαχθεί από την Ουγγαρία (Decaro et al., 2009). Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι τόσο στην Ελλάδα (Ντάφης, προσωπική παρατήρηση), όσο και στην Ιταλία, γίνεται σε μεγάλο βαθμό εισαγωγή καθαρόαιμων φυλών σκύλων για εμπόριο από τις χώρες της ανατολικής Ευρώπης, και μάλιστα στην Ουγγαρία και τη Ρουμανία η συχνότητα ανίχνευσης των CCoVb είναι αυξημένη, σε σχέση με άλλες ευρωπαϊκές χώρες (Decaro et al., 2010). Άλλωστε, στην Ιταλία υπάρχουν αναφορές

που έχουν συνδέσει την εισαγωγή σκύλων από τις παραπάνω χώρες με την εμφάνιση κι άλλων νοσημάτων, όπως είναι η λοιμώδης ηπατίτιδα και η νόσος του Carré (Decaro et al., 2007a; Martella et al., 2007).

Ανάμεσα στα αποτελέσματα, αυτό που αξίζει ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι εκείνο που αφορά στο στέλεχος THr/85/08. Το συγκεκριμένο στέλεχος είναι αποτέλεσμα ανασυνδυασμού μεταξύ των δύο τύπων του CCoV. Ανασυνδυασμοί στους κοροναϊούς έχουν διαπιστωθεί και στο παρελθόν και θεωρείται ότι αποτελούν έναν από τους κύριους λόγους εμφάνισης μεγάλης ποικιλομορφίας στη συγκεκριμένη οικογένεια. Όσον αφορά στον CCoVII, έχει ήδη αποδειχτεί ότι ο υπότυπος CCoVIIb αποτελεί προϊόν ανασυνδυασμού ανάμεσα στον CCoVII και στον TGEV, με τον ανασυνδυασμένο ιό να χαρακτηρίζεται από ένα αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης S παρόμοιο με εκείνο των TGEV. Η εμφάνιση ανασυνδυασμού στην υπερμεταβλητή αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης S και η επικράτηση και διασπορά των στελεχών αυτών (TGEV-like) μπορεί να εξηγηθεί και βάσει του γεγονότος ότι οι δομικές αλλαγές στην περιοχή αυτή είναι πιο ανεκτές για την επιβίωση των στελεχών (Lai, 1992). Σχετικά με τους ανασυνδυασμούς ανάμεσα στους δύο τύπους, υπάρχει μία αναφορά για στελέχη που ανιχνεύθηκαν στη Σουηδία και τα οποία, στο 5'- και στο 3'-άκρο του γονιδίου S, έμοιαζαν με τον τύπο I και τον τύπο II αντίστοιχα, υποδηλώνοντας την πιθανή προέλευσή τους από ανασυνδυασμό (Escutenaire et al., 2007a). Στην παρούσα μελέτη το στέλεχος THr/85/08 χαρακτηρίστηκε ως τύπος II πλησίον του 3'-άκρου του γονιδίου S και ως τύπος I στο γονίδιο M. Γίνεται αντιληπτό λοιπόν, ότι το σημείο ανασυνδυασμού βρίσκεται ανάμεσα στα δύο αυτά γονίδια, δηλαδή μπορεί να βρίσκεται στο τέλος του γονιδίου S, στο ORF3, στο ORF4 ή και στο 5'-άκρο του γονιδίου M. Πιο πιθανές είναι η δεύτερη και η τέταρτη περιοχή, οι οποίες αποτελούν θέσεις όπου οι ανασυνδυασμοί, οι προσθήκες αλλά και οι απαλείψεις νουκλεοτιδίων συμβαίνουν με μεγαλύτερη συχνότητα (Horsburgh et al., 1992). Το εν λόγω στέλεχος αποτελεί άλλη μία απόδειξη της εξέλιξης που λαμβάνει χώρα στον CCoV, οδηγώντας στην ανάδυση νέων στελεχών, των οποίων μια πιθανή επικράτηση θα οδηγούσε σε εκ νέου αλλαγή της ταξινόμησης. Παράλληλα, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η διαπίστωση του ανασυνδυασμού βασίστηκε αρχικά στα αντίθετα αποτελέσματα των RT-PCR και real time (RT-) PCR κατά το χαρακτηρισμό των τύπων, γίνεται αντιληπτό ότι με χρήση μόνο της μίας από

τις δύο μεθόδους είναι πιθανή η απώλεια σημαντικών πληροφοριών, όσον αφορά στην επιζωοτιολογία του CCoV.

Πέραν των στελεχών που προαναφέρθηκαν, προσέλκυσαν το ενδιαφέρον και τρία στελέχη (NA/09, 66/09, 68/09) του CCoV, τα οποία διαπιστώθηκε ότι διαπέρασαν τον εντερικό φραγμό και ανιχνεύθηκαν στα όργανα των ζώων. Τα τελευταία χρόνια, έχει αναφερθεί η ύπαρξη τέτοιων στελεχών, που αντίθετα με τη θεωρία που ισχυρίζεται ότι ο CCoV προκαλεί αποκλειστικά τοπική μόλυνση του εντέρου, αυτά ανιχνεύθηκαν σε όργανα των ζώων, μετά την εκδήλωση θανατηφόρας γαστρεντερίτιδας. Στην παρούσα μελέτη, τέτοιου είδους στελέχη διαπιστώθηκαν σε 3 από τους 21 θετικούς στον CCoV νεκρούς σκύλους που εξετάστηκαν, υποδηλώνοντας ότι ενδεχομένως δεν είναι τόσο σπάνια η παρουσία τους στους σκύλους. Παρόμοιες αλλαγές στον τροπισμό των ιών, παρατηρούνται και στον FCoV, ο οποίος ταξινομείται πλέον στο ίδιο είδος (*Alphacoronavirus 1*) με τον CCoV. Συγκεκριμένα, ο εντερικός βιότυπος του κοροναϊού της γάτας, FCoV, προκαλεί επίμονη λοίμωξη του εντέρου και φαίνεται ότι με την εμφάνιση σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο S, αλλά και απαλείψεων στα γονίδια 3c, 7b (Vennema et al., 1998) ή και 7a (Kennedy et al., 2001) αποκτά την ικανότητα να μολύνει μονοκύτταρα/μακροφάγα και να προκαλεί συστηματική θανατηφόρο νόσο, τη λοιμώδη περιτονίτιδα.

Από το ιστορικό προέκυψε ότι τα ζώα, στα οποία ανιχνεύτηκαν τα παραπάνω στελέχη, εμφάνισαν οξεία διάρροια και έμετο καταλήγοντας σε θάνατο μία ημέρα μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων, παρά την υποστηρικτική αγωγή. Τα ζώα 13/09 και 66/09 ήταν εμβολιασμένα για πρώτη φορά έναντι της παρβοϊώσης και του ιού της νόσου του Carré. Το ζώο 68/09 είχε επίσης λάβει ένα εμβολιασμό (έναντι της παρβοϊώσης, της νόσου του Carré, της λοιμώδους ηπατίτιδας, της λεπτοσπείρωσης και της παραγρίπης). Οι εμβολιασμοί είχαν λάβει χώρα εντός του τελευταίου δεκαημέρου πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων.

Από τη νεκροτομική εξέταση των προαναφερθέντων τριών σκύλων, πέραν του οροαιμορραγικού περιεχομένου του εντέρου, ιδιαίτερη εντύπωση προκάλεσε ο έντονος αποχρωματισμός του ήπατος, εύρημα το οποίο δεν διαπιστώθηκε στις υπόλοιπες νεκροτομές (18 ζώα). Μέχρι σήμερα, τα δύο αυτά παθολογοανατομικά ευρήματα έχουν διαπιστωθεί σε δύο ανάλογες περιπτώσεις (Buonavoglia et al., 2006; Zappuli et al., 2008). Επιπλέον, στις περιπτώσεις αυτές (Buonavoglia et al., 2006;

Zappuli et al., 2008) διαπιστώθηκε και η παρουσία οροαιματηρής συλλογής, που παρατηρήθηκε σε ένα από τα τρία ζώα, στην παρούσα έρευνα. Οι αλλοιώσεις στο ήπαρ φαίνεται να συνοδεύουν την ανίχνευση στελεχών που διαπερνούν τον εντερικό φραγμό, χωρίς ωστόσο να μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, παρά μόνο μέσω πειραματικών μολύνσεων και παθολογοανατομικών εξετάσεων.

Το CCoVIIa στέλεχος NA/09 ανιχνεύθηκε με PCRs σε όλα τα όργανα που εξετάστηκαν. Αντίστοιχη ανίχνευση έλαβε χώρα και στο παρελθόν με ένα άλλο στέλεχος που διαπερνά τον εντερικό φραγμό, το CB/05, του οποίου μάλιστα η συγκέντρωση στα όργανα ήταν μεγάλη (Buonavoglia et al., 2006). Το ίδιο συνέβη και μετά από πειραματική μόλυνση με το CB/05. Στην παρούσα μελέτη ωστόσο, αναφέρεται για πρώτη φορά η ανίχνευση του ιού στο πάγκρεας και στην καρδιά (Ntafis et al., 2010c). Όσον αφορά στα CCoVIIb στελέχη (66/09, 68/09), αυτά ανιχνεύθηκαν στα ίδια όπως και το NA/09 όργανα, με εξαίρεση την απουσία του 66/09 από τον εγκέφαλο. Για τους συγκεκριμένους υποτύπους γίνεται πρώτη φορά αναφορά για την κατανομή τους στα διάφορα όργανα, καθώς στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι έχουν ανιχνευθεί σε ιστούς πέραν του εντερικού σωλήνα, χωρίς ωστόσο να γίνεται αναλυτική αναφορά στα όργανα και στις συγκεντρώσεις των ιών (Decaro et al., 2009). Από τα παραπάνω ευρήματα της παρούσας μελέτης γίνεται εμφανής η ανίχνευση και η κατανομή των ιών σε όλα τα όργανα που εξετάστηκαν, υποδηλώνοντας τη δυνατότητα ορισμένων στελεχών να διαπερνούν τον εντερικό φραγμό. Η πιθανότητα κυκλοφορίας των εν λόγω στελεχών με το αίμα με αποτέλεσμα την ανίχνευση αυτών στα τριχοειδή των οργάνων δεν μπορεί να αποκλειστεί. Ωστόσο, η ανίχνευση τους στα όργανα με ανοσοϊστοχημεία (Zappuli et al., 2008), καθώς και οι ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις που έχουν διαπιστωθεί στο αίμα (Decaro et al., 2009), συνηγορούν υπέρ της διασποράς τους στους ιστούς.

Από την αλληλούχηση και την πολλαπλή στοίχιση του στελέχους NA/09, διαπιστώθηκε το ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό ομοιότητας που εμφάνιζε με το παντρόπο στέλεχος CB/05. Αντίθετα, τα ποσοστά ομοιότητας ήταν πολύ χαμηλότερα, όταν συγκρίθηκε με στελέχη αναφοράς που έχουν ανιχνευθεί αποκλειστικά στο έντερο των ζώων. Ομοίως, για τα στελέχη 66/09 και 68/09, το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας διαπιστώθηκε με το CCoVIIb στέλεχος αναφοράς 119/08, το οποίο ανιχνεύθηκε επίσης στα όργανα των σκύλων. Τα υψηλά ποσοστά ομοιότητας υποδηλώνουν ότι τα

παραπάνω ελληνικά στελέχη ομοιάζουν με τα αντίστοιχα αναφοράς, στηρίζοντας τη διαπίστωση ότι μολύνουν και όργανα, πέραν του εντέρου.

Κατά την πολλαπλή στοίχιση και τη φυλογενετική ανάλυση της πρωτεΐνης S του στελέχους NA/09, διαπιστώθηκε ότι, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εντερικά στελέχη, το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας εμφανιζόταν με το CB/05. Η εν λόγω πρωτεΐνη, ενώ εμφανίζει υψηλή παραλλακτικότητα, επιτρέποντας έτσι τη διαφυγή στελεχών του ιού από τους μηχανισμούς της ανοσίας, σχετίζεται άμεσα και με την παθογόνο δράση του ιού, με τις διαφορές που παρατηρούνται να αντικατοπτρίζουν πιθανότατα, πέραν των σφαλμάτων της πολυμεράσης, το διαφορετικό τροπισμό των ιών (Horsburgh et al., 1992; Enjuanes et al., 2000; Lai and Holmes, 2001; Balasuriya and Stott, 2004). Ωστόσο, η πρωτεΐνη S εμφανίζεται να είναι ιδιαίτερα συντηρημένη ανάμεσα στο στέλεχος NA/09 και το CB/05, σε αντιδιαστολή με τα υπόλοιπα εντερικά στελέχη αναφοράς. Είναι πιθανό λοιπόν, να παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην ανάδυση στελεχών με παντροπισμό. Αντίστοιχα στα CCoVb στελέχη, η πρωτεΐνη S εμφάνιζε το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας με το CCoVb στέλεχος 119/08. Το γονίδιο S εμφάνιζε υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας με το TGEV στέλεχος Purdue, παρά με το CB/05, στα πρώτα 1.050-1.100 περίπου νουκλεοτίδια, γεγονός που είναι σε συμφωνία με την προτεινόμενη από τους Decaro και συν., (2009) θέση ανασυνδυασμού για τα υπόλοιπα στελέχη αναφοράς (Decaro et al., 2009).

Σχετικά με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες (E, M, N, 7a, 7b), παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη NA/09, 66/09 και 68/09 εμφάνιζαν υψηλά ποσοστά ομοιότητας με το CB/05, αλλά και τα υπόλοιπα CCoVb στελέχη, σε σχέση με τα λοιπά εντερικά στελέχη. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, πέραν της πρωτεΐνης S, τα TGEV-like στελέχη που ανιχνεύθηκαν στα όργανα, εμφάνιζαν το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας, στις υπόλοιπες δομικές πρωτεΐνες (E, M και N) με το CB/05, σε σύγκριση με τα στελέχη αναφοράς (Decaro et al., 2009). Το παντρόπο στέλεχος CB/05 (CCoVIIa) χαρακτηρίζεται από την πρόκληση λεμφοπενίας, εύρημα το οποίο δεν έχει παρατηρηθεί στα TGEV-like στελέχη αναφοράς (Decaro et al., 2009). Γίνεται κατανοητό ότι η υψηλή λοιμογόνος δύναμη των στελεχών που διαπερνούν τον εντερικό φραγμό μπορεί να οφείλεται τόσο στην ομοιότητα που εμφανίζουν στις δομικές πρωτεΐνες E, M, και N, όσο και στις ιδιαίτερες σε σχέση με τα εντερικά στελέχη πρωτεΐνες S. Οι διαφορές στην πρωτεΐνη S, μεταξύ του CB/05 και των

TGEV-like στελεχών, μπορεί να είναι υπεύθυνες και για τις διαφορετικές τους ιδιότητες (πρόκληση λεμφοπενίας).

Όσον αφορά στο ORF3, έχουν παρατηρηθεί κατά καιρούς διάφορες μεταλλάξεις, οι οποίες μπορεί να είναι πλαισιοτροπικές και να οδηγούν στη σύνθεση μη τυπικών πρωτεϊνών (Sanchez et al., 2004; Ma et al., 2008). Στο στέλεχος CB/05 έχει παρατηρηθεί μία μεγάλη απάλειψη από το γονίδιο της μη δομικής πρωτεΐνης 3b, που οδηγεί στη σύνθεση μικρότερου μήκους πρωτεΐνης (Buonavoglia et al., 2006; Decaro et al., 2007). Αντίστοιχες όμως μεταλλάξεις έχουν παρατηρηθεί και σε στελέχη όπως το 1-71, που δεν προκαλούν συστηματικές λοιμώξεις (Ma et al., 2008). Στα ελληνικά στελέχη στη συγκεκριμένη περιοχή δεν παρατηρήθηκαν προσθήκες ή απαλειφές, με αποτέλεσμα οι μη δομικές πρωτεΐνες να έχουν το αναμενόμενο μέγεθος, όπως αντίστοιχα και στα TGEV-like στελέχη αναφοράς. Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι στη συγκεκριμένη περιοχή και ιδιαίτερα στο ORF3b, απαλείψεις νουκλεοτιδίων έχουν συσχετιστεί και με ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης στελέχη (Wesley et al., 1990; Horshburgh et al., 1992). Το γεγονός ότι στελέχη με μειωμένου μήκους ORF3b μπορούν και επιβιώνουν, αποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο ORF δεν είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Ο τρόπος με τον οποίο σχετίζεται η έκφρασή του με την παθογόνο δράση και τη λοιμογόνο δύναμη των ιών θα πρέπει να μελετηθεί με χρήση αντίστροφης γενετικής, ώστε να εξαχθούν ορθά συμπεράσματα.

Το ελληνικό στέλεχος NA/09 ανιχνεύθηκε στο σκύλο σε μεικτή μόλυνση με τον CPV-2a αλλά και τον τύπου I CCoV. Ωστόσο, η ανίχνευση του τύπου I περιορίστηκε μόνο στο εντερικό περιεχόμενο, αποδεικνύοντας τη διαφορετική λοιμογόνο δύναμη των στελεχών. Μέχρι σήμερα, εκτενής μελέτη σχετική με την παθογόνο δράση και τη λοιμογόνο δύναμη των CCoV_{IIa} έχει γίνει σε ένα μόνο στέλεχος, το CB/05, από τους Decaro και συν. (2008). Σύμφωνα με τους ερευνητές αυτούς, μετά από πειραματική μόλυνση αποδείχτηκε η ικανότητα του CB/05 να διαπερνά τον εντερικό φραγμό, να προκαλεί συστηματική λοίμωξη, αλλά λεμφοπενία. Παράλληλα, αποδείχτηκε ότι η ισχυρή χυμική ανοσία έναντι εντερικών στελεχών του CCoV, δεν ήταν ικανή να παρεμποδίσει την εκδήλωση της νόσου, παρά μόνο να μειώσει τη δριμύτητα της συμπτωματολογίας, με τη λεμφοπενία να παραμένει σταθερό εργαστηριακό εύρημα (Decaro et al., 2010a). Αφού η κυκλοφορία τέτοιων στελεχών δεν περιορίζεται από την ανοσία που αναπτύσσεται έναντι των κλασικών

στελεχών, ενδεχομένως και έναντι των εμβολιακών στελεχών που κυκλοφορούν, οι παντρώποι ιοί είναι δυνατό να μολύνουν τα ζώα και να αποτελέσουν προδιαθέτοντα παράγοντα, μέσω της λεμφοπενίας, τόσο για την επικράτηση ευκαιριακά παθογόνων μικροβίων, όσο και για τη νόσηση από σοβαρούς παθογόνους παράγοντες.

Όσον αφορά στους TGEV-like ιούς, 66/09 και 68/09, αυτοί ανιχνεύθηκαν σε σκύλους με μεικτή μόλυνση από CCoVIIa και CPV-2a, την πιο κοινή CPV-2 αντιγονική ποικιλία στην Ελλάδα (Ntafis et al., 2010d). Και στις δύο περιπτώσεις, οι CCoVIIa δεν ανιχνεύθηκαν πέραν του εντερικού σωλήνα, αποδεικνύοντας τη διαφορετική παθογόνο δράση και λοιμογόνο δύναμη των TGEV-like ιών. Σχετικά με τα τέσσερα TGEV-like στελέχη αναφοράς, που αναφέρουν οι Decaro και συν. (2009), αυτά ανιχνεύθηκαν στα όργανα παρουσία μεικτής μόλυνσης με τον CPV-2, ενώ σε πειραματική μόλυνση κατά την οποία είχε απομακρυνθεί ο CPV-2, δεν προκάλεσαν παρά ήπια διάρροια, χωρίς να συνοδεύεται από λεμφοπενία (Decaro et al., 2009). Επομένως, είναι πιθανό τα TGEV-like στελέχη να προκαλούν συστηματική λοίμωξη μόνο παρουσία του CPV-2. Η απομόνωση των δύο ελληνικών στελεχών σε υψηλούς τίτλους δίνει τη δυνατότητα να διερευνηθεί περαιτέρω η παθογόνος δράση των στελεχών αυτών και τα συμπτώματα που προκαλούν τόσο σε απλές, όσο και σε μεικτές, παρουσία του CPV-2, μολύνσεις. Παράλληλα, με την απομόνωση αυτών δίνεται η δυνατότητα να μελετηθεί μέσω εμβολιασμών και πειραματικών μολύνσεων το αν παρέχεται ικανοποιητική προστασία μέσω των κλασικών εμβολίων έναντι τέτοιου είδους στελεχών.

Συμπερασματικά, από τη συγκεκριμένη μελέτη:

- Γίνεται εμφανής η παρουσία και η συχνότητα με την οποία εμφανίζεται ο CCoV σε ζώα με οξεία διάρροια στην Ελλάδα.
- Επιπλέον, υποδηλώνεται η συχνότερη εμφάνισή του σε ζώα που διαβιούν ομαδικά, καθώς και σε κουτάβια.
- Από το χαρακτηρισμό αποδεικνύεται η παρουσία των δύο τύπων και υποτύπων, με τον τύπο II να ανιχνεύεται πιο συχνά από τον τύπο I.
- Επίσης, διαπιστώνεται η συχνή εμφάνιση των μεικτών μολύνσεων στην Ελλάδα και η συμμετοχή σε αυτές όλων των πιθανών συνδυασμών των τύπων και των υποτύπων του CCoV, με τις I/IIa/IIb μολύνσεις να διαπιστώνονται για πρώτη φορά διεθνώς.

- Τα ελληνικά στελέχη εμφανίζουν έντονη παραλλακτικότητα, με τη μεγαλύτερη να αφορά στον τύπο I.
- Επιπλέον, έγινε σαφής η παρουσία αποκλίνοντος αλλά και ανασυνδυασμένου στελέχους, ενισχύοντας τη θεωρία της έντονης γενετικής εξέλιξης και ποικιλομορφίας των κοροναϊών.
- Τέλος, διαπιστώθηκε και στην Ελλάδα η παρουσία στελεχών που διαπερνούν τον εντερικό φραγμό, τα οποία ομοιάζουν σε υψηλό ποσοστό με τα στελέχη αναφοράς, ενώ παράλληλα αναλύθηκε η κατανομή τους στα διάφορα όργανα καθώς και ένα σημαντικό -για την παθογόνο δράση- τμήμα του γονιδιώματός τους. Όσον αφορά στα δύο TGEV-like στελέχη, η κατανομή τους αναφέρεται για πρώτη φορά διεθνώς.

Η έντονη παραλλακτικότητα των στελεχών, οι μεικτές με δριμύτερη συμπτωματολογία μολύνσεις, καθώς και η έλλειψη απόλυτα διασταυρούμενων αντιδράσεων μεταξύ των τύπων και των υποτύπων του CCoV αφήνει ερωτηματικά, όσον αφορά στον τομέα της πρόληψης και της εφαρμογής εμβολιασμών. Ήδη έχει αποδειχτεί, ότι η ανοσία έναντι κλασικών εντερικών στελεχών του CCoV δεν καλύπτει απόλυτα τα ζώα έναντι της μόλυνσης από το CB/05. Παράλληλα, το αδρανοποιημένο εμβόλιο που χρησιμοποιείται έναντι του CCoV (Duramune PC, Fortdodge), δεν παρεμποδίζει την αποβολή του ιού, μετά από μία ενδεχόμενη φυσική μόλυνση, αδυνατώντας να σπάσει το φαύλο κύκλο μόλυνσης στους χώρους ομαδικής διαβίωσης των ζώων, όπως τα κυνοκομεία και τα καταστήματα πώλησης ζώων. Τα ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης εμβόλια έδωσαν σαφώς καλύτερα αποτελέσματα, ωστόσο τα στελέχη κοροναϊών που έχουν αναδυθεί, ως αποτέλεσμα ανασυνδυασμών ανάμεσα σε φυσικά και εμβολιακά στελέχη, εγείρουν ανησυχία όσον αφορά στη χρήση τέτοιου είδους εμβολίων. Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων TGEV-like στελεχών, δίνει τη δυνατότητα περαιτέρω έρευνας, σχετικά με την κάλυψη των ζώων έναντι αυτών, μετά από χρήση του εμπορικού εμβολίου.

Η ξαφνική εμφάνιση του υπεροξέους αναπνευστικού συνδρόμου του ανθρώπου (SARS), το Φεβρουάριο του 2003, εστίασε έντονα την προσοχή στη βιολογία και την παθογόνο δράση των κοροναϊών. Η επιδημία τέθηκε επίσημα υπό έλεγχο τον Ιούλιο του ίδιου έτους, αφήνοντας πίσω της πάνω από 8.000 περιστατικά και περισσότερους από 800 θανάτους ανθρώπων, σε 29 κυρίως ασιατικές χώρες,

τοποθετώντας παράλληλα τους κοροναϊούς στο κέντρο του παγκόσμιου ενδιαφέροντος (Drosten et al., 2003). Μάλιστα οι ενδείξεις ότι υπάρχουν ζώα ευαίσθητα στη μόλυνση από τον κοροναϊό SARS (γάτα, νυφίτσα), οδήγησαν στην εμφάνιση μεγαλύτερου ενδιαφέροντος, όσον αφορά στην παθογόνο δράση των κοροναϊών των ζώων. Η ανίχνευση συγγενικών κοροναϊών σε ζώα της άγριας πανίδας (νυχτερίδες) ανέδειξε την πιθανότητα της μετάδοσης του ιού μεταξύ ζώων και ανθρώπου καθώς και την υπόθεση ότι τα ζώα αυτά αποτελούν τη φυσική δεξαμενή του. Τελευταία μάλιστα υποστηρίζεται ότι οι νυχτερίδες και τα πτηνά αποτελούν τις γονιδιακές δεξαμενές για τους κοροναϊούς των δύο πρώτων γενών και του τρίτου αντίστοιχα, καθώς και ότι εξελικτικά είναι πιθανόν οι CoVs να πέρασαν από αυτά στους λοιπούς ξενιστές και να προσαρμόστηκαν. Η μελέτη των κοροναϊών των σαρκοφάγων, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από αλλαγές στην παθογόνο δράση και από υπερπήδηση του φραγμού των ειδών, μπορεί να αποτελέσει υποδειγματικό πρότυπο, ώστε να αποσαφηνιστούν τελικά όποια σκοτεινά σημεία αφορούν την οικολογία και εξέλιξη του ιού SARS, καθώς και των υπόλοιπων κοροναϊών του ανθρώπου (Weiss and Navas-Martin, 2005; Woo et al., 2009).

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Appel M. J. G., Cooper B. J., Greisen H., Scott F., Carmichael L. E., (1979). Canine viral enteritis. I. Status report on corona- and parvo-like viral enteritides. *Cornell Veterinary*, 69:123-133.
2. Appel M. J., (1987). Canine coronavirus. In “Virus infections of carnivores” Ed. M.J. Appel, Elsevier Science Publishers. The Netherlands. pp. 115–122.
3. Balasuriya U. B. R., Stott J. L., (2004). Coronaviridae and Arteriviridae. In “Veterinary microbiology (2nd ed.)” Eds. D.C. Hirsh, N.J. MacLachlan, R.L. Walker, Blackwell Publishing, Ames, IA. pp.383-397.
4. Bandai C., Ishiguro S., Masuya N., Hohdatsu T., Mochizuki M., (1999). Canine Coronavirus Infections in Japan: Virological and Epidemiological Aspects. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61(7): 731–736.
5. Barlough J. E., Stoddart C. A., Soresso G. P., Jocabson R. H. Scott F. W., (1994). Experimental inoculation of cats with canine coronavirus and subsequent challenge with feline infectious peritonitis virus. *Laboratory Animal Science*, 34:592-597.
6. Benbacer L., Kut E., Besnardeau L., Laude H., Delmas B., (1997). Interspecies Aminopeptidase-N Chimeras Reveal Species-Specific Receptor Recognition by Canine Coronavirus, Feline Infectious Peritonitis Virus, and Transmissible Gastroenteritis Virus. *Journal of Virology*, 71: 734-737.
7. Benetka V., Kubber-Heiss A., Kolodziejek J., Nowotny N., Hofmann-Parisot M., Mostl K., (2004). Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Veterinary Microbiology*, 99: 31-42.
8. Benetka V., Kolodziejek J., Walk K., Mostl K., (2006). M gene analysis of atypical strains of feline and canine coronavirus circulating in an Austrian animal shelter. *The Veterinary record*, 159: 170-175.
9. Binn L. N., Lazar E. C., Keenan K. P., Huxsoll D. L., Marchwicki R. H., Strano A. J., (1974). Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. Proc.78th Ann. Meeting US Anim. Health Assoc., 359–366.

10. Bohl E. H., (1989). Transmissible Gastroenteritis Virus (Classical enteric variant). In “Virus infections of porcines” Ed. M.B. Pensaert, Elsevier Science Publishers, The Netherlands. pp. 139-153.
11. Buonavoglia C., Tollis M., Buonavoglia D., Puccini A., (1992). Response of pups with maternal derived antibody to modified-live canine parvovirus vaccine. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 15:281-283.
12. Buonavoglia C., Decaro N., Martella V., Elia G., Campolo M., Desario C., Castagnaro M., Tempesta M., (2006). Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 492-494.
13. Carmichael L. E., Binn L. N., (1981). New enteric viruses in the dog. *Advances in Veterinary Science & Comparative Medicine*, 25: 1-37.
14. Carstens E. B., (2010). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, 155: 133-146.
15. Carter G. R., Wise D. J., (2005). Coronaviridae. In “A concise review in veterinary virology” Eds. G.R. Carter, D.J. Wise, E.F. Flores, International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, NY.
16. Cilli V., Castrucci V., (1981). Viral diarrhea of young animals: a review. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 4: 229-242.
17. Clifford D. L., Mazet J. A. K., Dubovi E. J., Garcelon D. K., Coonan T. J., Conrad P. A., Munson L., (2006). Pathogen exposure in endangered island fox (*Urocyon littoralis*) populations: Implications for conservation management. *Biological Conservation*, 131: 230-243.
18. Davidson W. R., Appel M. J., Doster G. L., Baker O. E., Brown J. F., (1992). Diseases and parasites of red foxes, gray foxes, and coyotes from commercial sources selling to fox-chasing enclosures. *Journal of Wildlife Diseases*, 28: 581-589.
19. de Groot-Mijnes J. D., van Dun J. M., van der Most R. G., de Groot R. J., (2005). Natural history of a recurrent feline coronavirus infection and the role of cellular immunity in survival and disease. *Journal of Virology*, 79: 1036-1044.
20. de Groot R. J., Ziebuhr J., Poon L. L., Woo P. C., Talbot P., Rottier P. J. M., (cited 2009 Oct 20). Revision of the family Coronaviridae. Taxonomic

- proposal of the Coronavirus Study Group to the ICTV Executive Committee. Available from <http://talk.ictvonline.org/media/p/1230.aspx>.
21. de Haan C. A. M., Vennema H., Rottier P. J. M., (2000). Assembly of the coronavirus envelope: Homotypic Interactions between the M proteins. *Journal of Virology*. 74(11): 4967-4978.
 22. de Haan C. A. M., Masters P. S., Shen X., Weiss S., Rottier P. J. M. (2002). The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host. *Virology*. 296: 177-189.
 23. del Amo A. N., Aprea A. N., Petruccelli M. A., (1999). Detection of viral particles in the feces of young dogs and their relationship with clinical signs. *Revista de Microbiologia*, 30: 237-241.
 24. Decaro N., Pratelli A., Campolo M., Elia G., Martella V., Tempesta M., Buonavoglia C., (2004a). Quantitation of canine coronavirus RNA in the faeces of dogs by TaqMan RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 119: 145-150.
 25. Decaro N., Pratelli A., Tinelli A., Martella V., Camero M., Buonavoglia D., Tempesta M., Caroli A.M., Buonavoglia C., (2004b). Fecal Immunoglobulin A Antibodies in Dogs Infected or Vaccinated with Canine Coronavirus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11: 102-105.
 26. Decaro N., Elia G., Martella V., Desario C., Campolo M., Di Trani L., Tarsitano E., Tempesta M., Buonavoglia C., (2005a). A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Veterinary Microbiology*, 105:19-28.
 27. Decaro N., Martella V., Ricci D., Elia G., Desario C., Campolo M., Cavaliere N., Trani L. D., Tempesta M., Buonavoglia C., (2005b). Genotype-specific fluorogenic RT-PCR assays for the detection and the quantitation of canine coronavirus type I and type II RNA in faecal samples of dogs. *Journal of Virological Methods*, 130: 72-78.
 28. Decaro N., Elia G., Desario C., Roperto S., Martella V., Campolo M., Lorusso A., Cavalli A., Buonavoglia C., (2006a). A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. *Journal of Virological Methods*, 136: 65-70.

29. Decaro N., Elia G., Martella V., Campolo M., Desario C., Camero M., Cirone F., Lorusso E., Lucente M. S., Narcisi D., Scalia P., Buonavoglia C., (2006b). Characterization of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *Journal of Virological Methods*, 133: 92-99.
30. Decaro N., Campolo M., Elia G., Buonavoglia D., Colaianni M. L., Lorusso A., Mari V., Buonavoglia C. (2007a). Infectious canine hepatitis: An ‘old’ disease reemerging in Italy. *Research in Veterinary Science*, 83(2): 269-273.
31. Decaro N., Martella V., Elia G., Campolo M., Desario C., Cirone F., Tempesta M., Buonavoglia C., (2007b). Molecular characterization of the virulent canine coronavirus CB/05 strain. *Virus Research*, 125: 54-60.
32. Decaro N., Buonavoglia C., (2008). An update on canine coronaviruses: Viral evolution and pathobiology. *Veterinary Microbiology*, 132: 221-234.
33. Decaro N., Campolo M., Lorusso A., Desario C., Mari V., Colaianni M. L., Elia G., Martella V., Buonavoglia C., (2008). Experimental infection of dogs with a novel strain of canine coronavirus causing systemic disease and lymphopenia. *Veterinary Microbiology*, 128: 253-260.
34. Decaro N., Mari V., Campolo M., Lorusso A., Camero M., Elia G., Martella V., Cordioli P., Enjuanes L., Buonavoglia C., (2009). Recombinant canine coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus of swine are circulating in dogs. *Journal of Virology*, 83(3): 1532-1537.
35. Decaro N., Elia G., Martella V., Campolo M., Mari V., Desario C., Lucente M. S., Lorusso E., Kanellos T., Gibbons R. H., Buonavoglia C., (2010a). Immunity after natural exposure to enteric canine coronavirus does not provide complete protection against infection with the new pantropic CB/05 strain. *Vaccine*, 28: 724-729.
36. Decaro N., Mari V., Elia G., Addie D. D., Camero M., Lucente M. S., Martella V., Buonavoglia C., (2010b). Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe. *Emergency Infectious Diseases*. 16: 41-47.
37. Delmas B., Gelfi J., L’ Haridon R., Vogel L. K., Sjostrom H., Noren O., Laude H., (1992). Aminopeptidase N is a major receptor for enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature*, 357: 417-419.
38. Drosten C., Gónther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt H. R., Becker S., Rabenau H., Panning M., Kolesnikova L., Fouchier R. A. M., Berger A.,

- Burguiere A. M., Cinatl J., Eickmann M., Escriou N., Grywna K., Kramme S., Manuguerra J. C., Möller S., Rickerts V., Störmer M., Vieth S., Klenk H. D., Osterhaus A. D. M. E., Schmitz H., Doerr H. W., (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 348: 1967-1976.
39. Elia G., Decaro N., Tinelli A., Martella V., Pratelli A., Buonavoglia C., (2002). Evaluation of antibody response to canine coronavirus infection in dogs by western blotting analysis. *New Microbiologica*, 25:275-280.
40. Elia G., Fiermonte G., Pratelli A., Martella V., Camero M., Cirone F., Buonavoglia C., (2003). Recombinant M protein-based ELISA test for detection of antibodies to canine coronavirus. *Journal of Virological Methods*, 109: 139-142.
41. Elia G., Decaro N., Martella V., Lorusso E., Mari V., Lucente M. S., Cordioli C., Buonavoglia C., (2010). An ELISA based on recombinant spike protein S for the detection of antibodies to transmissible gastroenteritis virus of swine-like canine coronavirus. *Journal of Virological Methods*, 163: 309-312.
42. Enjuanes L., Brian D., Cavanagh D., Holmes K., Lai M. M. C, Laude H., Masters P., Rottier P. J. M., Siddell S. G., Spaan W. J. M., Taguchi F., Talbot P., (2000). Coronaviridae. In “Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses” Eds. M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, R.B. Wickner, Academic Press, New York. pp. 835–849.
43. Erles K., Brownlie J., (2008). Canine respiratory coronavirus: an emerging pathogen in the canine infectious respiratory disease complex. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 38: 815-825.
44. Erles K., Brownlie J., (2009). Sequence analysis of divergent canine coronavirus strains present in UK dog population. *Virus Research*, 141: 21-25.
45. Escutenaire S., Isaksson M., Renstrom L. H., Klingeborn B., Buonavoglia C., Berg M., Belak S., Thoren P., (2007a). Characterization of divergent and atypical canine coronaviruses from Sweden. *Archives of Virology*, 152:1507-1514.

46. Escutenaire S., Mohamed N., Isaksson M., Thoren P., Klingeborn B., Belak S., Berg M., Blomberg J., (2007b). SYBR Green real time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses. *Archives of Virology*, 152: 41-58.
47. Espinasse J., Savey M., Viso M., (1990). Winter dysentery of adult cattle virus. In "Virus infections of ruminants" Eds Z. Dinter, B. Morein, Elsevier Science Publishers, The Netherlands. pp. 301-307.
48. Finlaison D. S., (1995). Faecal viruses of dogs – an electron microscope study. *Veterinary Microbiology*, 46: 295-305.
49. Foreyt W. J., Evermann J. F., (1985). Canine Coronavirus in Wild Coyotes in the Western United States, 1972-1982. *Journal of Wildlife Diseases*, 21: 428-430.
50. Frisk A. L., Konig M., Moritz A., Baumgartner W., (1999). Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3634–3643.
51. Gao F. S., Hu G. X., Xia X., Gao Y. W., Bai Y. D., Zou X. H., (2009). Isolation and identification of a canine coronavirus strain from giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Journal of Veterinary Science*, 10: 261-263.
52. Garwes D. J., Reynolds D. J., (1981). The Polypeptide Structure of Canine Coronavirus and its relationship to Porcine Transmissible gastroenteritis Virus. *Journal of General Virology*, 52: 153-157.
53. Green J. S., Bruss M. L., Evermann J. F., Bergstrom P. K., (1984). Serologic response of captive coyotes (*Canis latrans* say) to canine parvovirus and accompanying profiles of canine coronavirus titers. *Journal of Wildlife Diseases*, 20: 6-11.
54. Guan Y., Zheng B. J., He Y. Q., Liu X. L., Zhuang Z. X., Cheung C .L., Luo S. W., Li P. H., Zhang L. J., Guan Y. J., Butt K. M., Wong K. L., Chan K. W., Lim W., Shortridge K. F., Yuen K. Y., Peiris J. S., Poon L. L., (2003). Isolation and characterization of viruses related to SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*, 302: 276-278.
55. Hall T. A., (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.

56. Herrewegh A. P. M., Smeenk I., Horzinek M. C., Rottier P. J. M., de Groot R. J., (1998). Feline Coronavirus Type II Strains 79-1683 and 79-1146 Originate from a Double Recombination between Feline Coronavirus Type I and Canine Coronavirus. *Journal of Virology*, 72(5): 4508-4514.
57. Hohdatsu T., Okada S., Ishizuka Y., Yamada H., Koyama H., (1992). The prevalence of types I and II feline coronavirus infections in cats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 54: 557-562.
58. Holmes K. V., (2001). Coronaviruses. In "Fields Virology (4th edition)" Eds. D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, S.E. Strais, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp. 1187-1203.
59. Horsburgh B. C., Brown T. D., (1993). Sequence analysis of CCV and its relationship to FIPV, TGEV and PRCV. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 342: 3-9.
60. Horsburgh B. C., Brieley I., Brown T. D., (1992). Analysis of a 9.6 kb from the 3' end of canine coronavirus genomic RNA. *Journal of General Virology*, 73: 2849-2862.
61. Horzinek M. C., Lutz H., Pedersen N. C., (1982). Antigenic relationships among homologous structural polypeptides of porcine, feline and canine coronaviruses. *Infection and Immunity*, 37: 1148-1155.
62. Hu R. L, Huang G., Qiu W., Zhong Z. H., Xia X. Z., Yin Z., (2001). Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. *Veterinary Research Communications*, 25:77-84.
63. Jarvis T. C., Kirkegaard K., (1991). The polymerase in its labyrinth: mechanisms and implications of RNA recombination. *Trends in Genetics*, 7: 186-191.
64. Jia W., Karaka K., Parrish C.R., Naqi S.A., (1995). A novel variant of avian bronchitis virus resulting from recombination among 3 different strains. *Archives of Virology*, 140: 259-271.
65. Keck J. G., Matsushima G. K., Makino S., Fleming J. O., Vannier D. M., Stohlman S. A., Lai M. M. C. (1988). In RNA-RNA recombination of coronavirus in mouse brain. *Journal of Virology*, 62(5): 1810-1813.
66. Keenan K. P., Jarvis H. R, Marchwicki R. H., Binn L. N., (1976). Intestinal infection of neonatal dogs with canine coronavirus 1-71: studies by virologic,

- histologic, histochemical and immunofluorescent techniques. *American Journal of Veterinary Research*, 37: 247–256.
67. Kennedy M., Boedeker N., Gibbs P., Kania S., (2001). Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. *Veterinary Microbiology*, 81: 227-234.
68. Kipar A., May H., Menger S., Weber M., Leukert W., Reinacher M., (2005). Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Veterinary Pathology*, 42: 321-330.
69. Kottier S. A., Cavanagh D., Britton P., (1995). Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*, 213: 569-580.
70. Kuo L., Godeke G. J., Raamsman M. J., Masters P. S., Rottier P. J., (2000). Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. *Journal of Virology*, 74(3): 1393-1406.
71. Lai M. M. C., (1992). RNA Recombination in Animal and Plant Viruses. *Microbiological Reviews*, 56: 61-79.
72. Lai M. M. C., Holmes K.V., (2001). Coronaviridae: the viruses and their replication. In “Fields Virology (4th edition)” Eds. D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, S.E. Strais, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp. 1163–1185.
73. Larson D. J., Morehouse L. G., Solorzano R. F., Kinden D. A., (1979). Transmissible gastroenteritis in neonatal dogs: Experimental intestinal infection with transmissible gastroenteritis virus. *American Journal of Veterinary Research*, 40: 477-486.
74. Lissenberg A., Vrolijk M. M., van Vliet A. L., Langereis M. A., de Groot-Mijnes J. D., Rottier P. J., de Groot R. J., (2005). Luxury at a cost? Recombinant mouse hepatitis viruses expressing the accessory hemagglutinin esterase protein display reduced fitness in vitro. *Journal of Virology*, 79: 15054-15063.
75. Lole K. S., Bollinger R. C., Paranjape R. S., Gadkari D., Kulkarni S. S., Novak N. G., Ingersoll R., Sheppard H. W., Ray S. C., (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected

- seronconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *Journal of Virology*, 72: 152-160.
76. Lorusso A., Decaro N., Schellen P., Rottier P. J., Buonavoglia C., Haijema B. J., de Groot R. J. 2008. Gain, Preservation and Loss of a Group 1a Coronavirus Accessory Glycoprotein. *Journal of Virology*, 82: 10312-10317.
77. Ma G., Wang Y., Lu C., (2008). Molecular characterization of the 9.36kb C-terminal region of canine coronavirus 1-71 strain. *Virus genes*, 36: 491-497.
78. Martella V., Elia G., Lucn.ente M. S., Decaro N., Lorusso A., Banyai K., Blixenkron-Moller M., Lan N.T., Yamaguchi R., Cirone F., Carmichael L. E., Buonavoglia C., (2007). Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Veterinary Microbiology*, 122: 32-42.
79. Masters P.S., (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 66: 193-292.
80. McArdle F., Bennet M., Gaskell R. M., Tennant B., Kelly D. F., Gaskell C. J. (1992). Induction and enhancement of feline infectious peritonitis by canine coronavirus. *American Journal of Veterinary research*, 53: 1500-1506.
81. McCaw D. L., Hoskins J. D., (2006). Canine Viral Enteritis. In "Infectious Diseases of the dog and cat" Ed. C.E. Greene, Saunders Elsevier, Missouri.
82. McClurkin A.W., Stark S. L., Norman J. O., (1970). Transmissible Gastroenteritis of Swine: The Possible Role of Dogs in the Epizootiology of TGE. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 34: 347-349.
83. Mochizuki M., Hashimoto M., Ishida T., (2001). Recent epidemiological status of canine viral enteric infections and *Giardia* infections in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 63: 573-575.
84. Naylor M. J., Harrison G. A., Monckton R. P., McOrist S., Lehrbach P. R., Deane E. M., (2001a). Identification of canine coronavirus strains from faeces by S gene nested PCR and molecular characterization of a new Australian isolate. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 1036-1041.
85. Naylor M. J., Monckton R. P., Lehrbach P. R., Deane E. M., (2001b). Canine coronavirus in Australian dogs. *Australian Veterinary Journal*, 79: 116-119.
86. Naylor M. J., Walia C. S., McOrist S., Lehrbach P. R., Deane E. M., Harrison G. A., (2002). Molecular Characterization confirms the presence of a divergent

- strain of canine coronavirus (UWSMN-1) in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 3518-3522.
87. Ntafis V., Fragkiadaki E., Xylouri E., Omirou A., Lavazza A., Martella V., (2010a). Rotavirus-associated diarrhoea in foals in Greece. *Veterinary Microbiology*, In press.
88. Ntafis V., Mari V., Danika S., Fragkiadaki E., Buonavoglia C., (2010b). An outbreak of canine coronavirus in a Greek kennel. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22: 320-323.
89. Ntafis V., Mari V., Xylouri E., Buonavoglia C., (2010c). CCoV type II systemic infection in a dog in Greece. 4th European Congress of Virology. Lake Como, Italy.
90. Ntafis V., Xylouri E., Kalli I., Desario C., Mari V., Decaro N., Buonavoglia C., (2010d). Characterization of canine parvovirus type 2 (CPV-2) variants circulating in Greece. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22:5.(In Press).
91. Ntafis V., Xylouri E., Radogna A., Buonavoglia C., Martella V., (2010e). An outbreak of canine norovirus infection in a kennel. 4th European Congress of Virology. Lake Como, Italy.
92. Ortego J., Sola I., Almazan F., Ceriani J. E., Riquelme C., Balasch M., Plana J., Enjuanes L., (2003). Transmissible gastroenteritis coronavirus gene 7 is not essential but influences in vivo virus replication and virulence. *Virology*. 308:13-22.
93. Paul M. A., Carmichael L. E., Childers H., Cotter S., Davidson A., Ford R., Hurley K. F., Roth J. A., Schultz R. D., Thacker E., Welborn L., (2006). American Animal Hospital Association Canine Vaccine Guidelines, Revised. www.aahanet.org/PublicDocuments/VaccineGuidelines06Revised.pdf.
94. Pollock R. V. H., Carmichael L. E., (1979). Canine Viral Enteritis, recent Developments. *Modern Veterinary Practice*, 60: 375-380.
95. Pratelli A., Tempesta M., Greco G., Martella V., Buonavoglia C., (1999a). Development of a nested PCR assay for the detection of canine coronavirus. *Journal of Virological Methods*, 80: 11–15.
96. Pratelli A., Tempesta M., Roperto F. P., Sagazio P., Carmichael L., Buonavoglia C., (1999b). Fatal coronavirus infection in puppies following canine

- parvovirus 2b infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11: 550-553.
97. Pratelli A., Buonavoglia D., Martella V., Tempesta M., Lavazza A., Buonavoglia C., (2000). Diagnosis of canine coronavirus infection using nested-PCR. *Journal of Virological Methods*. 84: 91-94.
98. Pratelli A., Martella V., Elia G., Decaro N., Aliberti A., Buonavoglia D., Tempesta M., Buonavoglia C., (2001a). Variation of the sequence in the gene encoding for transmembrane protein M of canine coronavirus (CCV). *Molecular and Cellular Probes*. 15: 229–233.
99. Pratelli A., Martella V., Elia G., Tempesta M., Guarda F., Cappucchio M. T., Carmichael L. E., Buonavoglia C., (2001b). Severe enteric disease in an animal shelter associated with dual infections by canine adenovirus type 1 and canine coronavirus. *Journal of Veterinary Medicine B*, 48: 385-392.
100. Pratelli A., Elia G., Martella V., Palmieri A., Cirone F., Tinelli A., Corrente M., Buonavoglia C., (2002°). Prevalence of canine coronavirus antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay in dogs in the south of Italy. *Journal of Virological Methods*, 102: 67-71.
101. Pratelli A., Elia G., Martella V., Tinelli A., Decaro N., Marsilio F., Buonavoglia D., Tempesta M., Buonavoglia C., (2002b). M gene evolution of canine coronavirus in naturally infected dogs. *The Veterinary Record*, 151: 758–761.
102. Pratteli A., Tinelli A., Decaro N., Camero M., Elia G., Gentile A., Buonavoglia C., (2002c_). PCR assay for the detection and the identification of atypical canine coronavirus in dogs. *Journal of Virological Methods*. 106: 209-213.
103. Pratelli A., Martella V., Decaro N., Tinelli A., Camero M., Cirone F., Elia G., Cavalli A., Corrente M., Greco G., Buonavoglia D., Gentile M., Tempesta M., Buonavoglia C., (2003a). Genetic diversity of a canine coronavirus detected in pups with diarrhea in Italy. *Journal of Virological Methods*, 110: 9-17.
104. Pratelli A., Martella V., Pistello M., Elia G., Decaro N., Buonavoglia D., Camero M., Tempesta M., Buonavoglia C., (2003b). Identification of coronaviruses in dogs that segregate separately from the canine coronavirus genotype. *Journal of Virological Methods*, 107: 213-222.

105. Pratelli A., Tinelli A., Decaro N., Cirone F., Elia G., Roperto S., Tempesta M., Buonavoglia C., (2003c). Efficacy of an inactivated canine coronavirus vaccine in pups. *New Microbiologica*, 26: 151-155.
106. Pratelli A., Decaro N., Tinelli A., Martella V., Elia G., Tempesta M., Cirone F., Buonavoglia C., (2004a). Two genotypes of canine coronavirus simultaneously detected in the fecal samples of dogs with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(4): 1797-1799.
107. Pratelli A., Elia G., Decaro N., Tola S., Tinelli A., Martella V., Rocca S., Tempesta M., Buonavoglia C., (2004b). Cloning and expression of two fragments of the S gene of canine coronavirus type I. *Journal of Virological Methods*, 117: 61-65.
108. Pratelli A., Tinelli A., Decaro N., Martella V., Camero M., Tempesta M., Martini M., Carmichael L. E., Buonavoglia C., (2004c). Safety and efficacy of a modified-live canine coronavirus vaccine in dogs. *Veterinary Microbiology*, 99: 43-49.
109. Pratelli A., (2005). Canine coronavirus infection. In “Recent Advances in Canine Infectious Diseases” Ed. L. Carmichael, International Veterinary Information Service. Ithaca NY (www.ivis.org). A0105.0405.
110. Pratelli A., (2006). Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis. *Veterinary Research*, 37: 191–200.
111. Pratelli A., (2007). Action of disinfectants on canine coronavirus replication *in vitro*. *Zoonoses and Public Health*, 54: 383-386.
112. Pratelli A. (2008). Canine coronavirus inactivation with physical and chemical agents. *The Veterinary Journal*, 177: 71–79.
113. Raamsman M. J. B., Locker J. K., de Hooge A., de Vries A. A. F., Griffiths G, Vennema H., Rottier P. J. M., (1999). Characterization of the Coronavirus Mouse Hepatitis Virus Strain A59 Small Membrane Protein E. *Journal of Virology*, 74(5): 2333-2342.
114. Rimmelzwaan G. F., Groen J., Egberink H., Borst G. H. A., UytdeHaag F. G. C. M., Osterhaus A. D. M. E., (1991). The use of enzyme-linked immunosorbent assay systems for serology and antigen detection in parvovirus, coronavirus and rotavirus infections in dogs in The Netherlands. *Veterinary Microbiology*, 26: 25-40.

115. Risco C., Anton I. M., Sune C., Pedregosa A. M., Martin-Alonso J. M., Parra F., Carrascosa J. L., Enjuanes L., (1995). Membrane Protein Molecules on Transmissible Gastroenteritis Coronavirus Also Exposes the Carboxy-Terminal Region on the External Surface of the Virion. *Journal of Virology*, 69(9): 5269-5277.
116. Roseto A., Lema F., Cavalieri F., Dianoux L., Sitbon M., Ferchal F., Lasneret J., Peries J., (1980). Electron Microscopy Detection and Characterization of Viral Particles in Dog Stools. *Archives of Virology*, 66: 89-93.
117. Rottier P. J. M., Nakamura K., Schellen P., Volders H., Haijema B.J., (2005). Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *Journal of Virology*, 79: 14122-14130.
118. Ruggieri A., Di Trani L., Gatto I., Franco M., Vignolo E., Bedini B., Elia G., Buonavoglia C., (2007). Canine coronavirus induces apoptosis in cultured cells. *Veterinary Microbiology*, 21: 64-72.
119. Saif L. J., (1996). Mucosal immunity: an overview and studies of enteric and respiratory coronavirus infections in a swine model of enteric disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 54: 163-169.
120. Sanchez C. M., Jimenez G., Laviada M. D., Correa I., Sune C., Bullido M. J., Gebauer F., Smerdou C., Callebaut P., Escribano J. M., Enjuanes L., (1990). Antigenic Homology among Coronaviruses related to Transmissible Gastroenteritis Virus. *Virology*, 174: 410-417.
121. Sanchez C. M., Izeta A., Sanchez-Morgado J. M., Alonso A., Sola I., Balasch M., Plana-Duran J., Enjuanes L. (1999). Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *Journal of Virology*, 73(9): 7607-7618.
122. Sanchez-Morgado J. M., Poynter S., Morris T. H., (2004). Molecular characterization of a virulent canine coronavirus BGF strain. *Virus Research*, 104: 27-31.
123. Schwegmann-Webels C., Herrler G., (2006). Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses. *Glycoconjugate J*, 23: 51-58.

124. Siddell S., Wege W., Ter Meulen V., (1983). The Biology of Coronaviruses. *Journal of General Virology*, 64: 761-776.
125. Spaan W., Cavanagh D., Horzinek M. C., (1988). Coronaviruses: Structure and Genome Expression. *Journal of General Virology*, 69: 2939-2952.
126. Stavisky J., Pinchbeck G. L., German A. J., Dawson S., Gaskell R. M. Ryvar R., Radford A. D., (2010). Prevalence of canine enteric coronavirus in a cross-sectional survey of dogs presenting at veterinary practices. *Veterinary Microbiology*, 140: 18-24.
127. Suzuki H., Taguchi F., (1996). Analysis of the receptor-binding site of Murine Coronavirus Spike Protein. *Journal of Virology*, 70: 2632-2636.
128. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
129. Takeuchi A., Binn L. N., Jervis H. R, Keenan K. P., Hildebrandt P. K., Valas R. B., Bland F. F., (1976). Electron microscope study of experimental enteric infection in neonatal dogs with a canine coronavirus. *Laboratory Investigation*, 34: 539-549.
130. Tennant B. J., Gaskell R. M., Kelly D. F., Carter S. D., (1991). Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. *Research in Veterinary Science*, 51: 11-18.
131. Tennant B. J., Gaskell R. M., Jones R. C., Gaskell C. J., (1993). Studies on the epizootiology of canine coronavirus. *The Veterinary Record*, 132: 7-11.
132. Tennant B. J., Gaskell R. M., Gaskell C. J., (1994). Studies on the survival of canine coronavirus under different environmental conditions. *Veterinary Microbiology*, 42: 255-259.
133. Tresnan D. B., Levis R., Holmes K. V., (1996). Feline Aminopeptidase N Serves as a Receptor for Feline, Canine, Porcine, and Human Coronaviruses in Serogroup I. *Journal of Virology*. 70(12): 8669-8674.
134. Tuchiya K., Horimoto T., Azetaka M., Takahashi E., Konishi S., (1991). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine coronavirus and its antibody in dogs. *Veterinary Microbiology*, 26: 41-51.
135. Vennema H., Rossen J. W. A., Wesseling J., Horzinek M. C., Rottier P. J. M., (1993). Genomic Organization and Expression of the 3' End of the Canine

- and Feline Enteric Coronaviruses. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 342: 11-16.
136. Vennema H., Poland A., Foley J., Pedersen N. C., (1998). Feline Infectious Peritonitis Viruses Arise by Mutation from Endemic Enteric Coronaviruses. *Virology*, 243: 150-157.
 137. Von Heijne G., (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Research*, 14: 4683-4690.
 138. Waner T., Naveh A., Wudovsky I., Carmichael L.E., (1996). Assessment of maternal antibody decay and response to canine parvovirus vaccination using a clinic-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8:427-432.
 139. Wang L., Junker D., Hock L., Ebiary E., Collison E. W., (1994). Evolutionary implications of genetic variations in the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virus Research*, 34: 327-338.
 140. Wang Y. Y., Lu C. P., (2009). Analysis of putative recombination hot sites in the S gene of canine coronaviruses. *Acta Virologica*, 53: 111-120.
 141. Weiss S. R., Navas-Martin S., (2005). Coronavirus Pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69: 635-664.
 142. Wesley R. D., Woods R. D., Cheung A. K., (1990). Genetic basis for the pathogenesis of transmissible gastroenteritis virus. *Journal of Virology*, 64: 4761-4766.
 143. Wesley R. D. 1999. The S gene of canine coronavirus, strain UCD-1, is more closely related to the S gene of transmissible gastroenteritis virus than to that of feline infectious peritonitis virus. *Virus Research*, 61: 145-152.
 144. Wesseling J. G., Vennema H., Godeke G. J., Horzinek M. C., Rottier P. J. M., (1994). Nucleotide sequence and expression of the spike (S) gene of canine coronavirus and comparison with the S proteins of feline and porcine coronaviruses. *Journal of General Virology*, 75: 1789-1794.
 145. Woo P. C. Y., Lau S. K. P., Huang Y., Yuen K. Y., (2009). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Experimental Biology and Medicine*, 234: 1117-27.

146. Woods R., (2001). Efficacy of a transmissible gastroenteritis coronavirus with an altered ORF-3 gene. *Canadian journal of veterinary Research*, 65: 28-32.
147. Woods R. D., Cheville N. F., Gallagher J. E., (1981). Lesions in the small intestine of newborn pigs inoculated with porcine, feline, and canine coronaviruses. *American Journal of Veterinary Research*, 42: 1163-1169.
148. Woods R. D., Wesley R. D., (1992). Seroconversion of pigs in contact with dogs exposed to canine coronavirus. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 56: 78-80.
149. Worobey M., Holmes E. C., (1999). Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology*, 80: 2535-2543.
150. Yesilbag K., Yilmaz Z., Torun S., Pratelli A., (2004). Canine coronavirus in Turkish dog population. *Journal of Veterinary Medicine*, 51: 353-355.
151. Zappulli V., Caliarì D., Cavicchioli L., Tinelli A., Castagnaro M., (2008). Systemic fatal type II coronavirus infection in a dog: Pathological findings and immunocytochemistry. *Research in Veterinary Science*, 84: 278-282.
152. Zarnke R. L., Evermann J., Ver Hoef J. M., McNay M. E., Boertje R. D., Gardner C. L., Adams L. G., Dale B. W., Burch J., (2001). Serologic survey for canine coronavirus in wolves from Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, 37: 740-745.
153. Λέκκας Σ. Γ., Τσαγγάρης Θ. Α., Κανακούδης Γ. Γ., Καλδρυμίδου Ε. Α., Βλέμμας Ι. Χ., (1998). Λοίμωξη των σκύλων από Coronavirus. In “Ειδική παθολογική ανατομική των κατοικίδιων ζώων, Αναπνευστικό και πεπτικό σύστημα, Περιτοναϊκή κοιλότητα”, Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη. pp: 248.
154. Ντάφης Β., Πλακοκέφαλος Η., Δανίκα Σ., Ξυλούρη-Φραγκιαδάκη Ε., Κανέλλος Θ., Mari V., Decaro N., Buonavoglia C., (2008). Ανίχνευση κοροναϊού του σκύλου, σε σκύλους σε ελληνικό κυνοκομείο κατά το 2008. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας, Αθήνα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1. Δείγματα σκύλων, περιοχές προέλευσης, ηλικίες και αποτελέσματα σχετικά με την ανίχνευση CCoV και το χαρακτηρισμό του (αλλαγή χρώματος στον αύξοντα αριθμό επισημαίνει την αλλαγή κρούσματος).

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
01/07	Κυνοκομείο Τρικάλων	Κόπρανα	7 εβδ.	+	I-II	IIa	+	5×10^3	10^7	I-IIa
02/07	„	„	„	+	I-II	IIa	+	2.86×10^4	2.39×10^3	I-IIa
03/07	„	„	„	+	I-II	IIa	+	5×10^4	10^5	I-IIa
04/07	„	„	„	+	I-II	IIa	+	2.86×10^4	7.41×10^5	I-IIa
06/07	„	Πτώμα	„	-			-			-
05/07	Κλινική Αττικής	TR	8 μ.	-			-			-
01/08	Κυνοκομείο Τρικάλων	Πτώμα	6 εβδ.	Κόπρανα + Όργανα -	I-II	IIa	Κόπρανα + Όργανα -	1.09×10^3	3×10^3	I-IIa

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
02/08	„	Πτώμα	6 εβδ.	Κόπρανα + Όργανα -	I		Κόπρανα + Όργανα -	1.52 x 10 ⁴	-	I
03/08	„	Κόπρανα	6 εβδ.	+	I		+	10 ⁴	-	I
04/08	„	Κόπρανα	6 εβδ.	+	I		+	3.71 x 10 ³	-	I
05/08	„	Κόπρανα	6 εβδ.	+	I-II	IIa	+	10 ³	3x10 ³	I-IIa
06/08	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	4 μ.	-			-			-
07/08	„	„	4 μ.	-			-			-
08/08	Κυνοκομείο Λάρισας	Κόπρανα	3 μ.	-			-			-
09/08	„	„	3 μ.	-			-			-

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
10/08	„	„	2 μ.	+	I		+	8x10 ⁴	-	I
11/08	„	„	2 μ.	+	I		+	1.2 x 10 ⁴	-	I
12/08	„	„	2 μ.	+	I-II	IIa	+	9.80 x 10 ⁴	2.08 x 10 ⁴	I-IIa
13/08	„	„	2 μ.	+	I		+	5x10 ³	-	I
14/08	„	„	4,5 μ.	+	I		+	1.09 x 10 ³	-	I
15/08	„	„	4,5 μ.	+	I		+	2.39 x 10 ³	-	I
16/08	Κυνοκομείο Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	6 μ.	-			+	10 ¹	-	I
17/08	„	„	3 μ.	-			+	8x10 ⁰	-	I

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
18/08	„	„	3,5 μ.	-			-			-
19/08	„	„	5 μ.	-			-			-
20/08	„	„	3 μ.	+	I-II	IIb	+	8x10 ⁴	1.11 x 10 ⁴	I-IIb
21/08	„	„	3,5 μ.	+	I-II	IIa	+	3.71 x 10 ³	10 ²	I-IIa
22/08	„	„	3 μ.	+	I-II	IIa	+	10 ²	3x10 ³	I-IIa
23/08	„	„	2,5 μ.	+	I-II	IIa	+	5x10 ⁴	3x10 ⁴	I-IIa
24/08	„	„	2,5 μ.	+	I-II	IIa	+	8x10 ⁴	5x10 ³	I-IIa
25/08	„	„	2,5 μ.	+	I-II	IIa	+	5x10 ⁴	10 ⁵	I-IIa

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
26/08	„	„	2,5 μ.	+	I-II	IIa	+	5x10 ⁴	10 ³	I-IIa
27/08	„	„	2,5 μ.	+	I-II	IIa	+	5x10 ³	7x10 ⁴	I-IIa
28/08	„	„	2,5 μ.	+	I-II	IIa	+	5x10 ²	10 ²	I-IIa
29/08	„	„	2,5 μ.	-			+	2.2x10 ¹	-	I
30/08	„	„	3 μ.	+	I		+	5x10 ³	-	I
31/08	„	„	3 μ.	-			+	5x10 ¹	-	I
32/08	„	„	3 μ.	+	I-II	IIa	+	5x10 ⁴	7x10 ⁴	I-IIa
33/08	„	„	3 μ.	+	I	IIa	+	5x10 ³	7x10 ²	I-IIa

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
34/08	„	„	3 μ.	+	I		+	1.34 x 10 ⁴	-	I
35/08	„	„	3 μ.	+	I		+	10 ²	-	I
36/08	„	„	3 μ.	+	I		+	5x10 ²	-	I
37/08	„	„	3 μ.	+	I		+	8x10 ⁴	-	I
38/08	„	„	3 μ.	+	I	IIa	+	5.76 x 10 ⁴	7x10 ²	I-IIa
39/08	„	„	3 μ.	+	I		+	5x10 ³	-	I
40/08	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	12 μ.	-			-			-
41/08	„	Πτόμα	3 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	II	IIa	Κόπρανα + Όργανα -	-	5x10 ²	IIa

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
42/08	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτόμα	2,5 μ.	-			-			-
43/08	„	Κόπρανα	2,5 μ.	-			-	-	-	-
44/08	„	„	2,5 μ.	+	II	IIa	+	-	7x10 ²	IIa
45/08	„	„	2,5 μ.	+	II	IIa	+	10 ¹	7x10 ²	I-IIa
46/08	„	„	2,5 μ.	+	II	IIa	+	4x10 ⁰	7x10 ³	I-IIa
47/08	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτόμα	2,5 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	II	IIa	Κόπρανα + Όργανα -	-	7x10 ²	IIa
48/08	Κλινική Μαγνησίας	Κόπρανα	12 μ.	-			-			-
49/08	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	3 μ.	-			-			-

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
50/08	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	4 μ.	-			-			-
51/08	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	11 μ.	-			-			-
52/08	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	9 μ.	-			-			-
53/08	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	18 μ.	-			-			-
54/08	Κυνοκομείο Τρικάλων	Κόπρανα	1,5 μ.	-			-			-
55/08	Κυνοκομείο Τρικάλων	Κόπρανα	2 μ.	-			-			-
56/08	Κυνοκομείο Τρικάλων	Κόπρανα	1,5 μ.	+	II	IIa	+	-	3.5x10 ⁴	IIa
57/08	„	„	1,5 μ.	+	II	IIa	+	-	1.20 x 10 ⁴	IIa

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
58/08	„	„	2 μ.	+	II	IIa	+	-	10 ³	IIa
59/08	„	„	3 μ.	+	II	IIa	+	-	10 ⁶	IIa
60/08	„	„	2,5 μ	+	II	IIa	+	-	10 ³	IIa
61/08	„	„	3 μ.	+	II	IIa	+	-	7x10 ⁴	IIa
62/08	Κυνοκομείο Τρικάλων	Κόπρανα	2 μ.	+	II	IIa	+	-	3.1x10 ³	IIa
63/08	„	„	„	+	II	IIa	+	-	10 ²	IIa
64/08	„	„	3 μ.	+	II	IIa	+	-	7.10x10 ²	IIa
65/08	„	„	2 μ.	+	II	IIa	+	-	10 ⁴	IIa

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
66/08	„	„	„	+	II	IIa	+	-	10 ²	IIa
67/08	Κλινική Σαλαμίνας	Κόπρανα	3 μ.	+	I-II	IIa	+	-	4.36 x 10 ⁶	IIa
68/08	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	2,5 μ.	+	II	IIb	+	-	1.34 x 10 ⁴	IIb
69/08	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	3 μ.	+	I-II	IIa	+	1.74 x 10 ⁴	2.55 x 10 ⁴	I-IIa
70/08	Κλινική Μαγνησίας	Κόπρανα	3 μ.	-			-			-
71/08	Κυνοκομείο Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	2,5 μ.	+	I		-	1.77 x 10 ⁵	-	I
72/08	„	„	2,5 μ.	+	I		+	1.15 x 10 ⁶	-	I
73/08	„	„	2,5 μ.	+	I-II	IIa/IIb	+	8.29 x 10 ⁶	3.15 x 10 ⁶	I-IIa-IIb

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
74/08	„	„	5 μ.	+	I	IIb	+	2.72 x 10 ⁵	7.41 x 10 ⁵	I-IIb
75/08	„	„	5 μ.	+	I		+	2.65 x 10 ³	-	I
76/08	„	„	5 μ.	+	I		+	8.72 x 10 ³	-	I
77/08	„	„	5 μ.	+	I		+	1.20 x 10 ⁴	-	I
78/08	„	„	5 μ.	+	I		+	5.76 x 10 ⁴	-	I
79/08	„	„	5 μ.	+	I-II	IIa	+	9.56 x 10 ³	10 ²	I-IIa
80/08	„	„	5 μ.	+	I	IIa	+	2.40 x 10 ³	2.29 x 10 ²	I-IIa
81/08	„	„	5 μ.	+	I		+	1.65 x 10 ³	-	I

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
82/08	„	„	5 μ.	+	I		+	1.09 x 10 ⁵	-	I
83/08	„	„	5 μ.	+	I-II	IIb	+	3.73 x 10 ⁵	4.35 x 10 ²	I-IIb
84/08	„	„	5 μ.	+	I-II	IIa	+	5.06 x 10 ⁴	4.16 x 10 ²	I-IIa
85/08	Κυνοκομείο Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	3,5 μ.	+	II		+	9.80 x 10 ⁴	-	Ανασυνδυασμένο Στέλεχος
86/08	„	„	5 μ.	+	I-II	IIa	+	1.16 x 10 ⁵	-	I-IIa
87/08	„	„	4,5 μ.	+	I		+	3.06 x 10 ⁴	-	I
88/08	„	„	4,5 μ.	+	I-II	IIb	+	7.94 x 10 ³	6.60 x 10 ³	I-IIb
89/08	„	„	4,5 μ.	+	I-II	IIb	+	2.08 x 10 ⁴	8.61 x 10 ³	I-IIb

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
90/08	„	„	4,5 μ.	+	I-II	IIb	+	2.25 x 10 ⁵	2.15 x 10 ⁵	I-IIb
91/08	„	„	4,5 μ.	+	II	IIa	+	-	5.56 x 10 ⁵	IIa
92/08	„	„	3 μ.	+	I		+	1.35 x 10 ³	-	I
93/08	„	„	3 μ.	+	I	IIa	+	5.95 x 10 ⁵	10 ⁵	I-IIa
94/08	„	„	3 μ.	+	I-II	IIa	+	2.53 x 10 ⁵	2.33 x 10 ³	I-IIa
95/08	Pet Shop Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	2 μ.	+	I-II	IIa	+	1.76 x 10 ⁶	1.96 x 10 ⁶	I-IIa
96/08	„	„	2 μ.	+	II	IIa	+	-	2.37 x 10 ⁴	IIa
97/08	„	Πτώμα	2 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	II	IIa	Κόπρανα + Όργανα -	-	10 ⁷	IIa

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
98/08	,	Κόπρανα	12 ετών	+	II	IIa	+	-	10 ⁶	IIa
99/08	Κλινική Θεσσαλονίκης (Εδεσσα)	Κόπρανα	2 μ.	+	I-II	IIa	+	6.60 x 10 ⁴	5x10 ⁴	I-IIa
100/08	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	2 μ.	-			-			-
101/08	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	1,5 μ.	+	I-II	IIa	+	1.09 x 10 ⁵	1.83 x 10 ⁵	I-IIa
102/08	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	7 μ.	-			-			-
103/08	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	10 μ.	-			-			-
104/08	Κυνοκομείο Τρικάλων	Κόπρανα	7 μ.	+	I		+	3.71 x 10 ³	-	I

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
107/08	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτόμα	2 εβδ.	-			-			-
01/09	Pet Shop Αττικής	Κόπρανα	2,5 μ.	+	II	IIa	+	-	4.77 x 10 ⁵	IIa
02/09	„	„	„	+	I-II	IIa-IIb	+	2.91 x 10 ⁵	2.76 x 10 ⁴	I-IIa-IIb
03/09	„	„	„	+	I-II	IIa	+	2.11 x 10 ⁴	6.53 x 10 ⁵	I-IIa
04/09	„	„	„	+	I-II	IIa	+	1.72 x 10 ⁴	1.81 x 10 ⁶	I-IIa
05/09	„	„	„	+	I-II	IIa-IIb	+	1.55 x 10 ⁵	6.34 x 10 ⁵	I-IIa-IIb
06/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	3,5 ετών	-			-			-
07/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	8 μ.	-			-			-

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
08/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	5 μ.	-			-			-
09/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	6 μ.	-			-			-
10/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	3 μ.	+	I-II	IIa	+	3.95×10^5	8.77×10^6	I-IIa
11/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτόμα	2 μ.	-			-			-
12/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτόμα	2 μ.	-			-			-
13/09	Pet Shop Θεσσαλονίκης	Πτόμα	2,5 μ.	Κόπρανα + Όργανα +	Κόπρανα I- II Όργανα II	Κόπρανα IIa Όργανα IIa	Κόπρανα + Όργανα +	5.30×10^3	Κόπρανα + Όργανα +	Κόπρανα I-IIa Όργανα IIa
14/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτόμα	2,5 μ.	-			-			-
15/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτόμα	2,5 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	II	IIa	Κόπρανα + Όργανα -	-	7×10^4	IIa

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
16/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	2,5 μ.	-			-			-
17/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτώμα	2,5 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	II	IIb	Κόπρανα + Όργανα -	-	10 ³	IIb
18/09	Pet Shop Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	2 μ.	-			-			-
19/09	„	„	„	+	I-II	IIa	+	-	-	I-IIa
20/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	2,5 μ.	+	II	IIa	+	-	10 ⁴	IIa
21/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	6 μ.	-			-			-
22/09	Pet Shop Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	3 μ.	+	-	IIa-IIb	+	-	8 x 10 ²	IIa-IIb
23/09	„	„	„	+	-	IIa-IIb	+	-	7 x 10 ⁴	IIa-IIb

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
24/09	Pet Shop Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	2 μ.	+	I-II	IIb	+	3.82 x 10 ⁴	10 ⁵	I-IIb
25/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	2 μ.	+	II	IIa	-	-	5 x 10 ⁴	IIa
26/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	5 μ.	-			-			-
27/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	2 μ.	-			-			-
28/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	2,5 μ.	+	I-II	IIa	+	1.11 x 10 ⁴	1.92 x 10 ⁵	I-IIa
29/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτώμα	3,5 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	I-II	IIa	Κόπρανα + Όργανα -	4.29 x 10 ³	1.95 x 10 ⁴	I-IIa
30/09	Κυνοκομείο Μαγνησίας	Κόπρανα	2 μ.	+	I		+	2.51 x 10 ⁴	-	I
31/09	„	„	3 μ.	+	I		+	1.52 x 10 ⁴	-	I

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
32/09	„	„	3 μ.	+	I		+	1.12 x 10 ⁵	-	I
33/09	„	„	3 μ.	+	I		+	8.52 x 10 ⁴	-	I
34/09	„	„	3 μ.	+	I		+	4.54 x 10 ⁵	-	I
35/09	„	„	6 μ.	+	I		+	4.69 x 10 ³	-	I
36/09	„	„	6 μ.	-			-	-	-	-
37/09	„	„	1 μ.	-			-	-	-	-
38/09	„	„	1 μ.	-			-	-	-	-
39/09	„	„	1 μ.	-			-	-	-	-

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
40/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	2 μ.	+	I-II	IIa	+	9.63 x 10 ⁴	4 x 10 ⁶	I-IIa
41/09	Κυνοκομείο Αττικής	Κόπρανα	3 μ.	-			-			-
42/09	„	„	„	-			-			-
43/09	„	„	„	-			-			-
44/09	„	„	„	-			-			-
45/09	„	„	„	-			-			-
46/09	„	„	„	-			-			-
47/09	„	„	„	-			-			-

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος Ι	Real time RT-PCR CCoV τύπος ΙΙ	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
48/09	„	„	„	-			-			-
49/09	„	„	„	-			-			-
50/09	„	„	„	-			-			-
51/09	„	„	„	-			-			-
52/09	„	„	„	-			-			-
53/09	„	„	„	-			-			-
54/09	„	„	„	-			-			-
55/09	„	„	„	-			-			-

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΞΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
56/09	„	„	„	-			-			-
57/09	„	„	„	-			-			-
58/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	3 μ.	+	II	IIa-IIb	+	1.54 x 10 ²	9.54 x 10 ²	IIa-IIb
59/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	3 μ.	+	I-II	IIa	+	1.27 x 10 ⁴	5.25 x 10 ⁴	I-IIa
60/09	„	„	„	+	I-II	IIa	+	5.95 x 10 ⁴	1.06 x 10 ⁵	I-IIa
61/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	3 μ.	+	II	IIa	+	-	2.39 x 10 ³	IIa
62/09	Κλινική Αττικής	Πτόμα	2,5 μ.	-			-			-
63/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	18 μ.	-			-			-

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
64/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	18 μ.	-			-			-
65/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτόμα	2,5 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	II	IIa	Κόπρανα + Όργανα -	-	-	IIa
66/09	Pet Shop Θεσσαλονίκης	Πτόμα	2,5 μ.	Κόπρανα + Όργανα +	Κόπρανα II Όργανα II	Κόπρανα IIa-IIb Όργανα IIb	Κόπρανα + Όργανα +	-	Κόπρανα + Όργανα +	Κόπρανα IIa-IIb Όργανα IIb
67/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτόμα	2 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	II	IIa-IIb	Κόπρανα + Όργανα -	-	1.74 x 10 ⁴	IIa-IIb
68/09	Pet Shop Θεσσαλονίκης	Πτόμα	4 μ.	Κόπρανα + Όργανα +	Κόπρανα II Όργανα II	Κόπρανα IIa-IIb Όργανα IIb	Κόπρανα + Όργανα +	-	Κόπρανα + Όργανα +	Κόπρανα IIa-IIb Όργανα IIb
69/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτόμα	2 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	I-II	IIb	Κόπρανα + Όργανα -	5.92 x 10 ⁵	1.49 x 10 ²	I-IIb
70/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	2 μ.	-			-			-
71/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	2,5 μ.	-			-			-

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
72/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	6 μ.	-			-			-
73/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	5 μ.	-			-			-
74/09	„	„	„	-			-			-
75/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	5 μ.	+	I		+	1.80 x 10 ⁴	-	I
76/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	11 μ.	-			-			-
77/09	Κυνοκομείο Αττικής	Κόπρανα	2 μ.	+	II	IIa	+	-	1.63 x 10 ³	IIa
78/09	„	„	3 μ.	+	I-II	IIa	+	1.43 x 10 ³	2.61 x 10 ³	I-IIa
79/09	„	„	1,5 μ.	+	I		+	3.86 x 10 ²	-	I

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
80/09	„	„	2,5 μ.	+	I-II	IIa	+	1.74 x 10 ³	-	I-IIa
81/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτώμα	2,5 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	II	IIa	Κόπρανα + Όργανα -	-	1.71 x 10 ⁵	IIa
82/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτώμα	3 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	I-II	IIb	Κόπρανα + Όργανα -	6.95 x 10 ⁵	-	I-IIb
83/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτώμα	3 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	II	IIa	Κόπρανα + Όργανα -	-	-	IIa
84/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτώμα	2,5 μ.	-			-			-
85/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτώμα	2 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	II	IIa-IIb	Κόπρανα + Όργανα -	-	2.19 x 10 ³	IIa-IIb
86/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτώμα	3 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	I-II	IIa	Κόπρανα + Όργανα -	1.14 x 10 ³	8.98 x 10 ³	I-IIa
87/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	2,5 μ.	-			-			-

Α/Α ΣΚΥΛΟΥ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	RT-PCR ΤΥΠΟΥ	RT-PCR ΥΠΟΤΥΠΩΝ	Real time RT-PCR ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	Real time RT-PCR CCoV τύπος I	Real time RT-PCR CCoV τύπος II	ΤΕΛΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
88/09	Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών	Κόπρανα	2,5 μ.	-			-			-
89/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	2 μ.	+	I-II	IIa	+	1.25×10^2	4.04×10^3	I-IIa
90/09	Κλινική Αττικής	Κόπρανα	2,5 μ.	+	I		+	1.09×10^3	-	I
91/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Κόπρανα	3,5 μ.	-			-	-	-	-
92/09	Κλινική Θεσσαλονίκης	Πτόμα	3 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	I		Κόπρανα + Όργανα -	2.86×10^4	-	I
93/09	Κλινική Κρήτης	Πτόμα	2 μ.	Κόπρανα + Όργανα -	I		Κόπρανα + Όργανα -	5.11×10^2	-	I
94/09	Κλινική Κρήτης	Πτόμα	2 μ.	-			-			-
95/09	Κλινική Κρήτης	Πτόμα	2 μ.	-			-			-

Πίνακας 2. Ποσοστά ομοιότητας του 5'-άκρου του γονιδίου S (και του αμινοτελικού τμήματος της αντίστοιχης πρωτεΐνης) των ελληνικών στελεχών CCoV τύπου I με τα στελέχη αναφοράς CCoV τύπου I 23/03 (AY307021) και Elmo/02. Τα ποσοστά αναφέρονται σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (πάνω και δεξιά της διαγωνίου ID) και σε επίπεδο αμινοξέων (κάτω κι αριστερά της διαγωνίου ID).

Seq->	23/03/CCoVI	Elmo/02/CCoVI	LA/10/08/GR	TH/95/08/GR	TH/24/09/GR	TH/69/09/GR	AT/02/09/GR	LA/12/08/GR
23/03/CCoVI	ID	0,656	0,894	0,833	0,88	0,923	0,683	0,895
Elmo/02/CCoVI	0,598	ID	0,655	0,65	0,655	0,647	0,75	0,656
LA/10/08/GR	0,88	0,608	ID	0,807	0,869	0,868	0,653	0,998
TH/95/08/GR	0,818	0,632	0,805	ID	0,826	0,844	0,65	0,808
TH/24/09/GR	0,886	0,606	0,889	0,823	ID	0,87	0,666	0,87
TH/69/09/GR	0,895	0,612	0,886	0,853	0,907	ID	0,669	0,869
AT/02/09/GR	0,617	0,872	0,626	0,639	0,622	0,625	ID	0,654
LA/12/08/GR	0,883	0,611	0,996	0,808	0,892	0,889	0,629	ID
TH/10/08/GR	0,91	0,612	0,91	0,832	0,901	0,916	0,63	0,913
VO/34/09/GR	0,907	0,618	0,895	0,832	0,925	0,916	0,627	0,898
AT/05/09/GR	0,741	0,61	0,77	0,747	0,758	0,755	0,63	0,773
TH/10/09/GR	0,916	0,615	0,904	0,835	0,919	0,94	0,622	0,907
TH/24/08/GR	0,928	0,618	0,904	0,844	0,928	0,94	0,627	0,907
TH/25/08/GR	0,925	0,618	0,901	0,844	0,925	0,937	0,627	0,904
TH/37/08/GR	0,892	0,622	0,913	0,814	0,91	0,895	0,635	0,916
TH/82/09/GR	0,602	0,849	0,614	0,609	0,606	0,609	0,92	0,617
TH/83/08/GR	0,913	0,618	0,907	0,838	0,922	0,922	0,625	0,91

Πίνακας 2 (συνέχεια).

Seq->	TH/101/08/GR	VO/34/09/GR	AT/05/09/GR	TH/10/09/GR	TH/24/08/GR	TH/25/08/GR	TH/37/08/GR	TH/82/09/GR	TH/83/08/GR
23/03/CCoVI	0,934	0,894	0,756	0,939	0,958	0,957	0,89	0,684	0,933
Elmo/02/CCoVI	0,664	0,646	0,628	0,662	0,662	0,661	0,658	0,76	0,657
LA/10/08/GR	0,897	0,872	0,747	0,883	0,905	0,904	0,883	0,671	0,915
TH/95/08/GR	0,824	0,834	0,734	0,827	0,836	0,835	0,804	0,655	0,835
TH/24/09/GR	0,881	0,888	0,735	0,887	0,89	0,889	0,875	0,676	0,893
TH/69/09/GR	0,909	0,884	0,746	0,935	0,926	0,925	0,869	0,676	0,905
AT/02/09/GR	0,676	0,675	0,641	0,672	0,673	0,672	0,657	0,856	0,66
LA/12/08/GR	0,898	0,873	0,748	0,884	0,906	0,905	0,884	0,672	0,916
TH/101/08/GR	ID	0,878	0,743	0,923	0,935	0,934	0,873	0,683	0,907
VO/34/09/GR	0,91	ID	0,728	0,9	0,903	0,902	0,882	0,666	0,908
AT/05/09/GR	0,761	0,752	ID	0,738	0,748	0,747	0,748	0,651	0,75
TH/10/09/GR	0,931	0,946	0,752	ID	0,949	0,948	0,89	0,679	0,925
TH/24/08/GR	0,937	0,946	0,758	0,952	ID	0,999	0,911	0,675	0,959
TH/25/08/GR	0,934	0,943	0,758	0,949	0,997	ID	0,91	0,674	0,958
TH/37/08/GR	0,916	0,922	0,758	0,925	0,931	0,928	ID	0,669	0,911
TH/82/09/GR	0,618	0,615	0,617	0,606	0,612	0,612	0,623	ID	0,669
TH/83/08/GR	0,919	0,934	0,755	0,928	0,961	0,958	0,925	0,612	ID

```

      *           20           *           40           *           60           *           80           *           100           *
23/03 : MKIVLEFITLLSVMSCDDEESYEAQPNNDNPAKFNIS-SNSRFEANMYNFLOTWDIPPGTETSFGRVIYHYCGQSVN-SNTDCAWYNLR--WQPGSC--FKEKELSSAGLGITNVHG EYF : 111
Elmo/02 : MKIFLLSALLAATANCKD---EAGPDDDPQHFNSTFSNORFEASMYNFKSWNIPPDTEIILG-GYLPYCGSS-----QRCCMINLLGSDKPNAN-NKKIQYFDSVSMGITDVHG VYF : 107
AT/02/09GR : MKIILEFLALLSIVDCKD---EAGPHDDDPQHFNSTFSNORFEASMYNFKSWDIPPRTEIILG-GYLPYCGG-----PAQCCMINLLGTDKSNCGGIKKIQQYFDSVSMGITNVHG VYF : 108
AT/05/09GR : MKIILEFLTLFSVVKC-QQSTEAQPNDDPARFNIS-SNARFEANMYNFLOSWNIPQOTETIILG-GHLPYCDTTISGDNRPCGMYNLVHKKGAKPG-TFVTDYITTSAGQGITNVHG EYF : 113
TH/69/09GR : MKIVLLITLLSVVSCQEESHEAQPNDNPAKFNIS-SNNRFEANMYNFLOTWDIPPGTETIILG-GYLPYCGQSVN-SNTNCAWYNLR--WRAGDC--FKEKELSSAGLGITNVHG EYF : 110
TH/95/08GR : MKIVLLITLLSVVSCDKESYEAQPNNDNPAKFNIS-SNNRFEANMYNFLOTWNIIPDTEIILG-GYLPYCGHANG-NNRPCGMYNLK--HKPENg--FIAD EYVSSVGLGITNVRC EYF : 110
      MKi L Lls6v C EA P D1P FN S SN RFEA MYNFL 3W1IPP TETi G g lpyCg C W NL g 5 s GIT1VhG YF

      *           120           *           140           *           160           *           180           *           200           *           220           *
23/03 : DVREHD-ENNRWETWDRVGLAVTIYGSsSYDLEMILEDGFSDDSLSI AVKICHWTSG---NSTSLG-GNRYNLHIGDTSDCVFNHREALDSKLITTDIYGFQWTE TYINIYLGGTIS : 223
Elmo/02 : DVREHAADNNQDDQERVGLAIVTIYGSsMYDLYMLHGNVNESGSLSVSVKICHWTHGSIINDTKWYE-SNRWDL SQGTVPDCKFNHQFALDTKLITSDFIYGFQWNTYVNIYLGGTVS : 223
AT/02/09GR : DVREHAGDDNITWDRERVGLAIVTIYGSsMYDLYMYMANNVESGSLSVSVKICHWTSGSIINDTLWYE-SNRWDL SQGTVPDCKFNHQFALDTKLITSDFIYGFQWNTYVNIYLGGTVN : 224
AT/05/09GR : DVREHD-ENNRWETKDKVGLAVAIYGPSKYDLEMILENGVNHGTYSVAVKICHWTSG---NITNIQQSGSNKRVGDTDCVFNHQFELDIKLITTDIYGFQWNTYVNIYLGGTIN : 226
TH/69/09GR : DVREHD-ENNRWETFDRVGLAVTIYGSsHYDLEMILEDGFSDDSLSVAVKICHWTSG---NSTSLV-GH-FNKDMGTTSDCVFNHQFALDTKLITTDIYGFQWTE TYINIYLGGTIS : 221
TH/95/08GR : DVREHD-ENNRWETFDRVGLAVTIYGSsKYDLEMILEDGFTDSSLVAVKICHWTG---NSTSLG-GN-FNKDMGTTSDCVFNHQFSLDTKLITTDIYGFQWNTYVNIYLGGTIS : 221
      DVREH 1N W 4VGLA6 IYGSs YDL5M 1 3186 VKICHWT G 1 51 G DC FNHQF LD KLIT3D YGFQWT TY6NIYLGGT6

      *           240           *           260           *           280           *           300           *           320           *           340
23/03 : RVWIDNTWDKVDVKISSNWNNAKNTNYGYVYQFVNKTTYTYNNTGGTG VNLQVGLCEDEFCAGYVINVFTPVNGKIPEDFSFNNWFLSDKSTIVQGRVVSQPVYVECLRPV : 336
Elmo/02 : RVWIENTWDKVQVKMSPFMSL-LTYGYFQLVNRTTYTYNNTGGDDVEQLQLIECKNEFCAGFSKNVFTPVNGKIPEDFSFNNWFLSDKSTIVQGRVVSQPVYVECLRPV : 335
AT/02/09GR : RVWIENTWDKVQVKMSPFMSAVT-MGYFQLVNRTTYTYNNTGGDDVEQLQLIECKAFCAGYVINVFTPVNGKIPEDFSFNNWFLSDKSTIVQGRVVSQPVYVECLRPV : 336
AT/05/09GR : RVWIDNLTWDKVDVKISSDWN-SNYGYVYQFVNKTTYTYNNTGGTG VNLQVGLCEDEFCAGYVINVFTPVNGKIPEDFSFNNWFLSDKSTIVQGRVVSQPVYVECLRPV : 338
TH/69/09GR : RVWIDNTWDKVDVKISSNWNNAKNTNYGYVYQFVNKTTYTYNNTGGTG VNLQVGLCEDEFCAGYVINVFTPVNGKIPEDFSFNNWFLSDKSTIVQGRVVSQPVYVECLRPV : 334
TH/95/08GR : RVWIDNTWDKVDVKISSNWNARANTYGYVYQFVNKTTYTYNNTGGSGVDQLVGLCEDEFCAGYVINVFTPVNGKIPEDFSFNNWFLSDKSTIVQGRVVSQPVYVECLRPV : 334
      RVWI NtWdkV VK6S W yGY Y Q VN4TTY YNNTGG V QLQ6 C fCAG5 tNVFTPVNGKIP EFSFNNWFLSDKSTIVQGRVVSQPVYVECLRP6

```

Εικόνα 1. Αλληλουχία των ελληνικών στελεχών AT/02/09/GR, AT/05/09/GR, TH/69/09/GR, TH/95/08/GR με τα στελέχη αναφοράς τύπου I του CCoV. Από την αλληλουχία φαίνεται ότι το στέλεχος 02/09/GR εμφανίζει υψηλό ποσοστό ομοιότητας με το Elmo/02, με τα υπόλοιπα 3 στελέχη να εμφανίζουν ομοιότητα και με τα δύο στελέχη αναφοράς. Μία περιοχή υψηλού ποσοστού ομοιότητας με το στέλεχος Elmo/02 βρίσκεται μέσα σε ορθογώνιο.

Πίνακας 3. Ποσοστά ομοιότητας του 5'-άκρου του γονιδίου S (και του αμινοτελικού τμήματος της αντίστοιχης πρωτεΐνης) των ελληνικών στελεχών CCoVIIa με τα στελέχη αναφοράς CCoVIIa CB/05 (DQ12226) και BGF10 (AY342160). Τα ποσοστά αναφέρονται σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (πάνω και δεξιά της διαγωνίου ID) και σε επίπεδο αμινοξέων (κάτω κι αριστερά της διαγωνίου ID).

Seq->	CB/ 05	BFG10	TR/01/07/ GR	TR/02/07/ GR	TR/01/08/ GR	TR/56/08/ GR	TR/59/08/ GR	AT/60/09/ GR	AT/61/09/ GR	TH/81/09/ GR	AT/01/09/ GR
CB/05	ID	0,846	0,975	0,975	0,977	0,975	0,975	0,978	0,978	0,979	0,973
BFG10	0,866	ID	0,844	0,844	0,845	0,844	0,844	0,842	0,841	0,845	0,844
TR/01/07/GR	0,969	0,862	ID	1	0,998	0,997	0,997	0,984	0,972	0,98	0,986
TR/02/07/GR	0,969	0,862	1	ID	0,998	0,997	0,997	0,984	0,972	0,98	0,986
TR/01/08/GR	0,973	0,866	0,995	0,995	ID	0,998	0,998	0,985	0,972	0,981	0,987
TR/56/08/GR	0,969	0,862	0,991	0,991	0,995	ID	1	0,984	0,971	0,98	0,986
TR/59/08/GR	0,969	0,862	0,991	0,991	0,995	1	ID	0,984	0,971	0,98	0,986
AT/60/09/GR	0,975	0,866	0,973	0,973	0,977	0,973	0,973	ID	0,965	0,971	0,978
AT/61/09/GR	0,967	0,862	0,973	0,973	0,973	0,969	0,969	0,954	ID	0,975	0,975
TH/81/09/GR	0,971	0,858	0,983	0,983	0,987	0,983	0,983	0,965	0,973	ID	0,976
AT/01/09/GR	0,969	0,866	0,985	0,985	0,989	0,985	0,985	0,971	0,973	0,979	ID
AT/03/09/GR	0,977	0,866	0,981	0,981	0,985	0,981	0,981	0,962	0,975	0,983	0,981
AT/04/09/GR	0,967	0,86	0,979	0,979	0,981	0,977	0,977	0,967	0,967	0,979	0,973
TH/10/09/GR	0,971	0,862	0,979	0,979	0,983	0,979	0,979	0,962	0,969	0,981	0,977
TH/15/09/GR	0,965	0,864	0,981	0,981	0,985	0,981	0,981	0,975	0,965	0,973	0,979
AT/20/09/GR	0,965	0,864	0,983	0,983	0,987	0,983	0,983	0,975	0,965	0,975	0,983
TH/95/08/GR	0,973	0,866	0,985	0,985	0,989	0,985	0,985	0,973	0,977	0,983	0,985
TH/97/08/GR	0,975	0,866	0,989	0,989	0,993	0,989	0,989	0,975	0,977	0,983	0,989
TH/98/08/GR	0,975	0,866	0,989	0,989	0,993	0,989	0,989	0,975	0,977	0,983	0,989
TH/101/08/GR	0,977	0,868	0,979	0,979	0,983	0,979	0,979	0,971	0,971	0,977	0,977
ED/99/08/GR	0,787	0,821	0,785	0,785	0,783	0,779	0,779	0,793	0,787	0,777	0,787

Πίνακας 3 (συνέχεια).

Seq->	AT/03/09/ GR	AT/04/09/ GR	TH/10/09/ GR	TH/15/09/ GR	AT/20/09/ GR	TH/95/08/ GR	TH/97/08/ GR	TH/98/08/ GR	TH/101/08/ GR	ED/99/08/GR
CB/05	0,986	0,981	0,977	0,973	0,974	0,977	0,978	0,978	0,979	0,803
BFG10	0,849	0,847	0,846	0,844	0,844	0,847	0,846	0,846	0,846	0,837
TR/01/07/GR	0,982	0,978	0,98	0,986	0,984	0,989	0,989	0,989	0,982	0,802
TR/02/07/GR	0,982	0,978	0,98	0,986	0,984	0,989	0,989	0,989	0,982	0,802
TR/01/08/GR	0,984	0,979	0,982	0,986	0,986	0,99	0,991	0,991	0,984	0,802
TR/56/08/GR	0,982	0,978	0,98	0,985	0,984	0,989	0,989	0,989	0,982	0,8
TR/59/08/GR	0,982	0,978	0,98	0,985	0,984	0,989	0,989	0,989	0,982	0,8
AT/60/09/GR	0,975	0,974	0,972	0,982	0,98	0,981	0,982	0,982	0,977	0,802
AT/61/09/GR	0,983	0,977	0,975	0,969	0,973	0,977	0,977	0,977	0,974	0,801
TH/81/09/GR	0,987	0,981	0,979	0,974	0,973	0,98	0,98	0,98	0,975	0,798
AT/01/09/GR	0,982	0,974	0,984	0,982	0,987	0,992	0,994	0,994	0,982	0,806
AT/03/09/GR	ID	0,989	0,982	0,978	0,978	0,985	0,983	0,983	0,981	0,804
AT/04/09/GR	0,981	ID	0,975	0,975	0,975	0,979	0,977	0,977	0,977	0,804
TH/10/09/GR	0,979	0,975	ID	0,976	0,982	0,986	0,985	0,985	0,977	0,802
TH/15/09/GR	0,973	0,969	0,973	ID	0,982	0,986	0,987	0,987	0,981	0,805
AT/20/09/GR	0,973	0,971	0,975	0,981	ID	0,989	0,991	0,991	0,981	0,805
TH/95/08/GR	0,983	0,975	0,979	0,983	0,983	ID	0,996	0,996	0,986	0,804
TH/97/08/GR	0,981	0,975	0,979	0,985	0,985	0,993	ID	1	0,985	0,805
TH/98/08/GR	0,981	0,975	0,979	0,985	0,985	0,993	1	ID	0,985	0,805
TH/101/08/GR	0,979	0,973	0,971	0,977	0,975	0,983	0,983	0,983	ID	0,802
ED/99/08/GR	0,787	0,783	0,783	0,789	0,785	0,785	0,785	0,785	0,787	ID

```

ED99/08/GR : -MIVLTLCLLVLHTNVCIIISNCSONVNTQLBGNENLIKDFLESTTETKEETVVVGGYYPTEVWYNCSNIIISSTTSFHNENNIHAFYFDMEAMNSTGDAKGRSLLLVHVHGSE : 114
BFG10 : -MIVLTLCLLVLHTNVCIIISNCSONVNTQLBGNENLIKDFLESTTETKEETVVVGGYYPTEVWYNCS--RTARQARTEFENIHAFYFDMEAMNSTGDAKGRSLLLVHVHGSE : 112
1-71 : -MIVLTLCLLVLHTNVCIIISNCSONVNTQLBGNENLIKDFLESTTETKEETVVVGGYYPTEVWYNCS--RTARQARTEFENIHAFYFDMEAMNSTGDAKGRSLLLVHVHGSE : 112
INSAVC-1 : -MIVLTLCLLVLHTNVCIIISNCSONVNTQLBGNENLIKDFLESTTETKEETVVVGGYYPTEVWYNCS--TTCQTTAYKYFENIHAFYFDMEAMNSTGNARGKRLLVHVHGSE : 112
K378 : -MIVLTLCLLVLHTNVCIIISNCSONVNTQLBGNENLIKDFLESTTETKEETVVVGGYYPTEVWYNCS--RTARQARTEFENIHAFYFDMEAMNSTGDAKGRSLLLVHVHGSE : 112
GZ43 : -MIVLTLCLLVLHTNVCIIISNCSONVNTQLBGNENLIKDFLESTTETKEETVVVGGYYPTEVWYNCS--RTARQARTEFENIHAFYFDMEAMNSTGDAKGRSLLLVHVHGSE : 112
G. P. : -MIVLTLCLLVLHTNVCIIISNCSONVNTQLBGNENLIKDFLESTTETKEETVVVGGYYPTEVWYNCS--RTARQARTEFENIHAFYFDMEAMNSTGDAKGRSLLLVHVHGSE : 112
CB/05 : -MIVLTLCLLVLHTNVCIIISNCSONVNTQLBGNENLIKDFLESTTETKEETVVVGGYYPTEVWYNCS--RTARQARTEFENIHAFYFDMEAMNSTGDAKGRSLLLVHVHGSE : 113
79-1683 : -MIVLTLCLLVLHTNVCIIISNCSONVNTQLBGNENLIKDFLESTTETKEETVVVGGYYPTEVWYNCS--RTARQARTEFENIHAFYFDMEAMNSTGDAKGRSLLLVHVHGSE : 113
79-1146 : -MIVLTLCLLVLHTNVCIIISNCSONVNTQLBGNENLIKDFLESTTETKEETVVVGGYYPTEVWYNCS--RTARQARTEFENIHAFYFDMEAMNSTGDAKGRSLLLVHVHGSE : 113
6666t 61L y V T nn C QvNVTQLBGNENLIKDFLESTTETKEETVVVGGYYPTEVWYNCS F3a T a5 F NIHAFYFDMEAMNSTG1A GKpLL HVHG P

ED99/08/GR : ENIIIIYITAYGSDVAGRPDLKHGGLLCITKIVSFSINYNHETHEEENSNICLEDRRKIPFSVVPFDNGTKIFGLEWNNDDVETAYISDDSHRRTLNINNWENNVTIMYRRTSTATWEDS : 229
BFG10 : VSIIIYISAYRHDVQGRPDLKHGGLLCITKIVSFSINYNHETHEEENSNICLEDRRKIPFSVVPFDNGTKIFGLEWNNDDVETAYISDDSHYLNINNWENNVTILYRSSTATWEDS : 225
1-71 : VSIIIYISAYRHDVQGRPDLKHGGLLCITKIVSFSINYNHETHEEENSNICLEDRRKIPFSVVPFDNGTKIFGLEWNNDDVETAYISDRSHHNLININNWENNVTILYRSSTATWEDS : 225
INSAVC-1 : VSIIIYISAYRHDVQGRPDLKHGGLLCITKIVSFSINYNHETHEEENSNICLEDRRKIPFSVVPFDNGTKIFGLEWNNDDVETAYISDRSHRNLININNWENNVTILYRRTSTATWEDS : 225
K378 : VSIIIYISAYRHDVQGRPDLKHGGLLCITKIVSFSINYNHETHEEENSNICLEDRRKIPFSVVPFDNGTKIFGLEWNNDDVETAYISDRSHHNLININNWENNVTILYRSSTATWEDS : 225
GZ43 : VSIIIYISAYRHDVQGRPDLKHGGLLCITKIVSFSINYNHETHEEENSNICLEDRRKIPFSVVPFDNGTKIFGLEWNNDDVETAYISGHYNNLNININNWENNVTILYRSSTATWEDS : 225
G. P. : VSIIIYISAYRHDVQGRPDLKHGGLLCITKIVSFSINYNHETHEEENSNICLEDRRKIPFSVVPFDNGTKIFGLEWNNDDVETAYISDRSHHNLININNWENNVTILYRSSTATWEDS : 225
CB/05 : VSIIIYISAYRHDVQGRPDLKHGGLLCITKIVSFSINYNHETHEEENSNICLEDRRKIPFSVVPFDNGTKIFGLEWNNDDVETAYISGHYNNLNININNWENNVTILYRSSTATWEDS : 226
79-1683 : VSIIIYISAYRHDVQGRPDLKHGGLLCITKIVSFSINYNHETHEEENSNICLEDRRKIPFSVVPFDNGTKIFGLEWNNDDVETAYISGRSYNNLNININNWENNVTILYRSSTATWEDS : 226
79-1146 : VSIIIYISAYRHDVQGRPDLKHGGLLCITKIVSFSINYNHETHEEENSNICLEDRRKIPFSVVPFDNGTKIFGLEWNNDDVETAYISGRSYNNLNININNWENNVTILYRSSTATWEDS : 224
vs I6y13AY DVq RPlLKHGL6CITKk 1Y FT qW iC G DRKIPFSV6PtDNGTKI65GLEWND VETAYIS s 1nInNwFNNVT66YsR383ATW 8

ED99/08/GR : AAYVYQGVSNFTYYKLNNTDGLKSYELCDDYECCTGYATNVPAPTSGGYIPDGFSPNNWFLTNSSFTVSGRVTNQPLLNVCLWVVPSEGVAAQDFCFEAGQFSQCNVGLSNTT : 344
BFG10 : AAYVYQGVSNFTYYKLNNTDGLKSYELCDDYECCTGYATNVPAPTSGGYIPDGFSPNNWFLTNSSFTVSGRVTNQPLLNVCLWVVPSEGVAAQDFCFEAGQFSQCNVGLSNTT : 340
1-71 : AAYVYQGVSNFTYYKLNNTDGLKSYELCDDYECCTGYATNVPAPTSGGYIPDGFSPNNWFLTNSSFTVSGRVTNQPLLNVCLWVVPSEGVAAQDFCFEAGQFSQCNVGLSNTT : 340
INSAVC-1 : AAYVYQGVSNFTYYKLNNTDGLKSYELCDDYECCTGYATNVPAPTSGGYIPDGFSPNNWFLTNSSFTVSGRVTNQPLLNVCLWVVPSEGVAAQDFCFEAGQFSQCNVGLSNTT : 340
K378 : AAYVYQGVSNFTYYKLNNTDGLKSYELCDDYECCTGYATNVPAPTSGGYIPDGFSPNNWFLTNSSFTVSGRVTNQPLLNVCLWVVPSEGVAAQDFCFEAGQFSQCNVGLSNTT : 340
GZ43 : AAYVYQGVSNFTYYKLNNTDGLKSYELCDDYECCTGYATNVPAPTSGGYIPDGFSPNNWFLTNSSFTVSGRVTNQPLLNVCLWVVPSEGVAAQDFCFEAGQFSQCNVGLSNTT : 340
G. P. : AAYVYQGVSNFTYYKLNNTDGLKSYELCDDYECCTGYATNVPAPTSGGYIPDGFSPNNWFLTNSSFTVSGRVTNQPLLNVCLWVVPSEGVAAQDFCFEAGQFSQCNVGLSNTT : 340
CB/05 : AAYVYQGVSNFTYYKLNNTDGLKSYELCDDYECCTGYATNVPAPTSGGYIPDGFSPNNWFLTNSSFTVSGRVTNQPLLNVCLWVVPSEGVAAQDFCFEAGQFSQCNVGLSNTT : 341
79-1683 : AAYVYQGVSNFTYYKLNNTDGLKSYELCDDYECCTGYATNVPAPTSGGYIPDGFSPNNWFLTNSSFTVSGRVTNQPLLNVCLWVVPSEGVAAQDFCFEAGQFSQCNVGLSNTT : 341
79-1146 : AAYVYQGVSNFTYYKLNNTDGLKSYELCDDYECCTGYATNVPAPTSGGYIPDGFSPNNWFLTNSSFTVSGRVTNQPLLNVCLWVVPSEGVAAQDFCFEAGQFSQCNVGLSNTT : 339
AAYVYQGVSNFTYYKLNNTDGLKSYELCDDYECCTGYATNVPAPTSGGYIPDGFSPNNWFLTNSSFTVSGRVTNQPLLNVCLWVVPSEGVAAQDFCFEAGQFSQCNVGLSNTT

ED99/08/GR : VDVIRENLNFTADVQSGMGATVPSLNTTGGVILDISCYNDIV---SSESPYSYGETIEFGVTDGPRYCYVLYNGTALKYLGLTLPSPVKELAIKSKWGHFYINGYNFFSTFPIDCIS : 459
BFG10 : VDVIRENLNFTADVQSGMGATVPSLNTTGGVILDISCYNDIV---SSESPYSYGETIEFGVTDGPRYCYVLYNGTALKYLGLTLPSPVKELAIKSKWGHFYINGYNFFSTFPIDCIS : 451
1-71 : VDVIRENLNFTADVQSGMGATVPSLNTTGGVILDISCYNDIV---SSESPYSYGETIEFGVTDGPRYCYVLYNGTALKYLGLTLPSPVKELAIKSKWGHFYINGYNFFSTFPIDCIS : 451
INSAVC-1 : VDVIRENLNFTADVQSGMGATVPSLNTTGGVILDISCYNDIV---SSESPYSYGETIEFGVTDGPRYCYVLYNGTALKYLGLTLPSPVKELAIKSKWGHFYINGYNFFSTFPIDCIS : 451
K378 : VDVIRENLNFTADVQSGMGATVPSLNTTGGVILDISCYNDIV---SSESPYSYGETIEFGVTDGPRYCYVLYNGTALKYLGLTLPSPVKELAIKSKWGHFYINGYNFFSTFPIDCIS : 451
GZ43 : VDVIRENLNFTADVQSGMGATVPSLNTTGGVILDISCYNDIV---SSESPYSYGETIEFGVTDGPRYCYVLYNGTALKYLGLTLPSPVKELAIKSKWGHFYINGYNFFSTFPIDCIS : 451
G. P. : VDVIRENLNFTADVQSGMGATVPSLNTTGGVILDISCYNDIV---SSESPYSYGETIEFGVTDGPRYCYVLYNGTALKYLGLTLPSPVKELAIKSKWGHFYINGYNFFSTFPIDCIS : 451
CB/05 : VDVIRENLNFTADVQSGMGATVPSLNTTGGVILDISCYNDIV---SSESPYSYGETIEFGVTDGPRYCYVLYNGTALKYLGLTLPSPVKELAIKSKWGHFYINGYNFFSTFPIDCIS : 452
79-1683 : VDVIRENLNFTADVQSGMGATVPSLNTTGGVILDISCYNDIV---SSESPYSYGETIEFGVTDGPRYCYVLYNGTALKYLGLTLPSPVKELAIKSKWGHFYINGYNFFSTFPIDCIS : 452
79-1146 : VDVIRENLNFTADVQSGMGATVPSLNTTGGVILDISCYNDIV---SSESPYSYGETIEFGVTDGPRYCYVLYNGTALKYLGLTLPSPVKELAIKSKWGHFYINGYNFFSTFPIDCIS : 450
VDVIRENLNFTADVQSGMGATVPSLNTTGGVILDISCYNDIV---SSESPYSYGETIEFGVTDGPRYCYVLYNGTALKYLGLTLPSPVKELAIKSKWGHFYINGYNFFSTFPIDCIS

```

Εικόνα 2. Αλληλούχηση του ελληνικού στελέχους ED/99/08/GR με στελέχη αναφοράς. Στην αλληλούχηση των αμινοξέων έχουν συμπεριληφθεί τα στελέχη του CCoV τύπου II BGF10 (AY342160), 1-71 (AY796289), INSAVC-1 (D13096), K378 (X77047), GZ43/2003/raccoon dog (EF192155), CCoV/Giant Panda (AY436637), CB/05 (DQ112226) και τα στελέχη του FCoV τύπου II 79-1683 (X80799) και 79-1146 (NC007025). Μέσα στα ορθογώνια έχουν συμπεριληφθεί οι προσθήκες των αμινοξέων στο ελληνικό στέλεχος.

```

                *           20           *           40           *           60           *           80           *           100           *
CB/05      : MIVILTCVLLCSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
BGF10     : MIVLTLCLF-LVLYSSVICTSNNDRCVQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 112
INSAVC    : MIVLTLCLF-LFLYSSVICTSNNDRCVQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 112
K378     : MIVLTLCLL-LFYSNVICTSNNDRCVQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RSATTTAYKDFSNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 112
1-71     : MIVLTLCLL-LFYSNVICTSNNDRCVQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RSATTTAYKDFSNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 112
TR/01/07GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
TR/01/08GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
TR/02/07GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
TR/56/08GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
TR/59/08GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
AT/60/09GR : MIVILTCVLLCSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
AT/61/09GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
TH/81/09GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
AT/01/09GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
AT/03/09GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
AT/04/09GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
TH/10/09GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
TH/15/09GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
AT/20/09GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
TH/95/08GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
TH/97/08GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
TH/98/08GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
TH101/08GR : MIVIVTCILSLFSYHTVASTTNNDCRQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSS--RTAFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 113
ED/99/08GR : MIVLTLCLL-LVLHTNVHCTIISNCSQVNVTLQDGNENLIRDFLFQNFKEEGT VVVGYY PTEVWYNCSSNIISSFTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLFVHVGEP : 114

```

```

                120           *           140           *           160           *           180           *           200           *           220           *
CB/05      : VSAIIYISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNSFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDEFVTAIISGHSYNWNNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
BGF10     : VSIIVYISAYRHDVQGRPKLKHGLLCITK--NSTTYDRFTINQWRDCLGDRKKI PFSVPTDNGTKIYGLEWNNDDYVTAIISDSSHLYLNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 225
INSAVC    : VSIIVYISAYRHDVQHRPRLKHLGLLCITK--NDTVDYNFTINQWRDCLGDRKKI PFSVPTDNGTKIYGLEWNNDDYVTAIISDRSHLNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 225
K378     : VSIIVYISAYRHDVQHRPRLKHLGLLCITK--NKIIDYNTFTSAQWSAICLGDRRKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDDYVTAIISDRSHLNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 225
1-71     : VSIIVYISAYRHDVQHRPRLKHLGLLCITK--NKIIDYNTFTSAQWSAICLGDRRKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDDYVTAIISDRSHLNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 225
TR/01/07GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNSFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDELVTAYISGRSYNWNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
TR/01/08GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNSFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDELVTAYISGRSYNWNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
TR/02/07GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNSFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDELVTAYISGRSYNWNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
TR/56/08GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNSFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDELVTAYISGRSYNWNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
TR/59/08GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNSFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDELVTAYISGRSYNWNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
AT/60/09GR : VSAIIYISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNSFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDELVTAYISGRSYNWNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
AT/61/09GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNSFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDEFVTAIISGHSYNWNNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
TH/81/09GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNSFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDEFVTAIISGHSYNWNNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
AT/01/09GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNSFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDELVTAYISGRSYNWNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
AT/03/09GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNSFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDEFVTAIISGHSYNWNNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
AT/04/09GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--KRTINYNFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDEFVTAIISGHSYNWNNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
TH/10/09GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNTFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDELVTAYISGHSYNWNNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
TH/15/09GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNTFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDELVTAYISGHSYNWNNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
AT/20/09GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNAFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDELVTAYISGRSYNWNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
TH/95/08GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNSFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDELVTAYISGHSYNWNNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
TH/97/08GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNSFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDELVTAYISGHSYNWNNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
TH/98/08GR : VSVIYIISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNSFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDELVTAYISGHSYNWNNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
TH101/08GR : VSAIIYISAYRHDVQHRPRLKHLGLVCITK--TRNIDYNSFTSQWNSICTGNDRKKI PFSVIPTDNGTKIYGLEWNNDEFVTAIISDHSYNWNNINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 226
ED/99/08GR : VSIIVYISAYRHDVQHRPRLKHLGLLCITKNSVPSINYDFTTQWNSICIGDRKKI PFSVPTDNGTKIYGLEWNNDEFVTAIISDSSHRLTINNNWPNVNTLLYSRSSTATWQHS : 229

```

Εικόνα 3. Αλληλούχηση των ελληνικών CCoVIIa με στελέχη αναφοράς (αμινοτελικό άκρο πρωτεΐνης S). Στην αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων έχουν συμπεριληφθεί τα στελέχη του CCoV τύπου II BGF10 (AY342160), 1-71 (AY796289), INSAVC-1 (D13096), K378 (X77047) και CB/05 (DQ112226). Μέσα στα ορθογώνια έχουν συμπεριληφθεί οι ομοιότητες των αμινοξέων των δύο ελληνικών στελεχών με το CB/05.

Πίνακας 4. Ποσοστά ομοιότητας του 5'-άκρου του γονιδίου S (και του αμινοτελικού τμήματος της αντίστοιχης πρωτεΐνης) των ελληνικών στελεχών CCoVIIIb με τα στελέχη αναφοράς CCoVIIIb 119/08 (EU924791) και 198/07 (GQ130266). Τα ποσοστά αναφέρονται σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (πάνω και δεξιά της διαγωνίου ID) και σε επίπεδο αμινοξέων (κάτω κι αριστερά της διαγωνίου ID).

Seq->	119/08/IT	198/07/HU	AT/02/09/GR	AT/05/09/GR	TH/17/09/GR	TH/22/09/GR	TH/24/09/GR	TH/73/08/GR	TH/74/08/GR	TH/88/08/GR	TH/89/08/GR
119/08/IT	ID	0,992	1	0,996	0,996	0,996	0,956	0,97	0,97	0,97	0,97
198/07/HU	0,978	ID	0,992	0,989	0,989	0,989	0,963	0,97	0,97	0,97	0,97
AT/02/09/GR	1	0,978	ID	0,996	0,996	0,996	0,956	0,97	0,97	0,97	0,97
AT/05/09/GR	0,989	0,967	0,989	ID	1	1	0,952	0,974	0,974	0,974	0,974
TH/17/09/GR	0,989	0,967	0,989	1	ID	1	0,952	0,974	0,974	0,974	0,974
TH/22/09/GR	0,989	0,967	0,989	1	1	ID	0,952	0,974	0,974	0,974	0,974
TH/24/09/GR	0,934	0,956	0,934	0,923	0,923	0,923	ID	0,941	0,941	0,941	0,941
TH/73/08/GR	0,978	0,967	0,978	0,989	0,989	0,989	0,923	ID	1	1	1
TH/74/08/GR	0,978	0,967	0,978	0,989	0,989	0,989	0,923	1	ID	1	1
TH/88/08/GR	0,978	0,967	0,978	0,989	0,989	0,989	0,923	1	1	ID	1
TH/89/08/GR	0,978	0,967	0,978	0,989	0,989	0,989	0,923	1	1	1	ID
TH/90/08/GR	0,978	0,967	0,978	0,989	0,989	0,989	0,923	1	1	1	1
TH/67/09/GR	0,989	0,967	0,989	1	1	1	0,923	0,989	0,989	0,989	0,989
TH/69/09/GR	1	0,978	1	0,989	0,989	0,989	0,934	0,978	0,978	0,978	0,978
TH/85/09/GR	0,978	0,967	0,978	0,967	0,967	0,967	0,923	0,956	0,956	0,956	0,956

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
Thr/85/08 : GCTAAAGACAAAGTTAATGAATGCGTTAGGTTCTCAATCCCAAAGATTGGATTCTGTGGTAAATGGTACACATTTGTTTTCACCTTGCAAATGCAGCACCAAATGGCATGATTTTCTT : 116
INSAVC : GCTAAAGACAAGGTTAATGAATGCGTTAGGTTCTCAATCCCAAGATTGGATTCTGTGGTAAATGGTACACATTTGTTTTCACCTTGCAAATGCAGCACCAAATGGCATGATTTTCTT : 116
BGF10 : GCTAAGGACAAGGTTAATGAATGCGTTAGGTTCTCAATCCCAAGATTGGATTCTGTGGTAAATGGTACACATTTGTTTTCACCTTGCAAATGCAGCACCAAATGGCATGATTTTCTT : 116
CB/05 : GCTAAGGACAAGGTTAATGAATGCGTTAGGTTCTCAATCCCAAAGATTGGATTCTGTGGTAAATGGTACACATTTGTTTTCACCTTGCAAATGCAGCACCAAATGGCATGATTTTCTT : 116
23/03 : GCTATGAAAAAGTTAATGAGTGTGTTAAATCACAGTCTGATAGATATGGTTTCTGTGAAACGGGACTCATCTATTCTCATTAGCTAATGCTGCACCTGATGGTTTACTTTTCTT : 116
Elmo/02 : GCTATGAAAAGTTAATGAGTGTGTTAAATCACAGTCTGATAGATATGGTTTCTGTGAAATGGAAGTCACTCTATTCTCATTAGCTAATGCTGCACCTGATGGTTTACTTTTCTT : 116
      GCTA GA AA GTTAATGA TG GtA TC CAaTC A AGAT TGG TTCTGTGG AatGG AC CAT T TT TCA T GC AATGC GCACC ATGG T TTTTCTT

      120      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220      *
Thr/85/08 : TCACACAGTGCTATTACCAACAGCTTATGAAACTGTACGGGCTGGTCAGGATTTTGTGCAATCAGATGGCGATCGCACTTTCGGACTTGTGTTAAAGATGTCCAGCTGACGCTAT : 232
INSAVC : TCACACAGTGCTATTACCAACAGCTTATGAAACTGTACGGGCTGGTCAGGATTTTGTGCGTCAGATGGCAGTCCCACTTTTGGACTTGTGTTAAGGATGTCCAGCTGACGCTAT : 232
BGF10 : TCATACAGTGCTATTACCAACAGCTTATGAAACTGTACGGGCTGGTCAGGATTTTGTGCGTCAGATGGCAATCGCACTTTCGGACTTGTGTTAAGGATGTCCAGCTGACGCTAT : 232
CB/05 : TCACACAGTGCTATTACCAACAGCTTATGAAACTGTACGGGCTGGTCAGGATTTTGTGCAATCAGATGGCGATCGCACTTTCGGACTTGTGTTAAAGATGTCCAGCTGACGCTAT : 232
23/03 : GCATACGTTTTTGGCTTCCAACCGAATGGGAAGAGGTACGGCATGGTCAGGAATTTGTCTT-----AATGACACGTAATGCATATGTATTGAAAGATTTCAAATC--TTCTAT : 221
Elmo/02 : GCACACTGTTTTGCTTCCAACCGAATGGGAAGAGGTACGGCATGGTCAGGAATTTGTCTT-----AATGACACGTAATGCATATGTATTGAAAGATTTCAAATC--ATCTAT : 221
      CA AC GT T T CCAAC G T GAA GTgACGGC TGGTCAGG ATTTGTG aT CAC T tG A TGT T aA GAT TC A CTAT

      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *      340
Thr/85/08 : TTCGCAATTTAGATCACAAATTTCTATTTGACTCCCAGAACTATGTATCAGCCTAGAGTTGCAACTAGTTCTGATTTTGTCAAATTGAAGGGTGGGATGTCTTTGTTCAATGCA : 348
INSAVC : TTCGCAATTTAGATCAAAAATTTTATTTGAGGCCAGAACTATGTATCAGCCAGAGTTGCAACTAGTTCTGATTTTGTCAAATAGAAGGCTGTGATGTGTTGTTTAAATGGA : 348
BGF10 : TTCGCAACTTAGATTAATAATTTCTATTTGACTCCCAGAACTATGTATCAACCTAGAGTTGCAACTAGTTCTGATTTTGTCAAATAGAAGGTTGTGATGTGTTGTTTAAATGCA : 348
CB/05 : TTCGCAATTTAGATCACAAATTTCTATTTGACACCTAGAACTATGTATCAGCCTAGAGTTGCAACTAGTTCTGATTTTGTCAAATTGAAGGGTGTGATGTCTTTGTTCAATGCA : 348
23/03 : CTT-CAGTTACAGTGGTACGTATATGATAACTCCTCTAATATGTTTCAGCCAGAAAACCTCAGATGAGCGATTTTCGTGCAAATACGAGTTGTGAAGTGACATTTTAAACACT : 336
Elmo/02 : CTT-CAGCTATAATCGTACGTATATGATAACTCCTCTAATATGTTTCAGCCAGAAAACCTCAGATGAGTGAATTTGTCAAATACGAGTTGTGAAGTTACATTTTAAACACT : 336
      t CA T aTg A T T AC CC G A TATGT TCAgCC AGA C A tGATTTtGT CAAAT G TgTGA GT TTT T AA c

```

Εικόνα 4. Συνέχεια στην πίσω σελίδα.


```

*      360      *      380      *      400      *      420      *      440      *      460
THr/85/08 : ACTGTAATTGAG-TTGCCTAGCATTATACCTGATATATCGATATTAATCAGACTGTTCAAGACATATTAGAAAATTTATAGACCAAATTTGGACAGTACCTGAATTAACA-----C : 457
INSAVC    : ACTGTAATTGAA-TTGCCTAGTATCATACCTGACTATATCGATATTAATCAAACCTGTTCAAGACATATTAGAAAATTTTCAGACCAAATTTGGACTGTACCCGAGTTGCCA-----C : 457
BGF10     : ACTGTAATTGAA-TTGCCTAGTATTATACCTGACTATATTTGATATCAATCAAACCTGTTCAAGACATACTAGAAAATTTTCAGACCAAATTTGGACTGTACCTGAGTTGCCA-----C : 457
CB/05     : ACTGTAATTGAG-TTGCCTAGTATTATACCTGATATATCGATATTAATCAGACTGTTCAAGACATATTAGAAAATTTACAGACCAAATTTGGACAGTACCTGAATTAACA-----C : 457
23/03     : AC-ATATACTACCTTTGAGGAAATTTGTGATTTGATTTATATTGACATTAACAAGACTATCTCTGATATGCTTGAACAATATAGTCCAAATTTCCAAATTTCCAGATTTCACTGAGGGTC : 451
Elmo/02   : AC-ATATACTACCTTTGAAGAAATTTGTGATTTGATTTATATTGATATTAACAAGACTATCTCTGATATGCTTGAACAATATAGTCCAAATTTCCAAATTTCCAGATTTCACTGAGGGTC : 451
          AC TA  A TT      Att T  TGA TATAT GatAttAA  A ACT T   GA AT  T GAA A T  AG CCAAATT  AC  T CC GA TT  C

*      480      *      500      *      520      *      540      *      560      *      580
THr/85/08 : TTGACATTTTCAACGCAACCTACTTAAACCTGACTGGTCAAATTAATGACTTGAATTTAGGTGAGAAAAGCTACATAAACACCACGGTAGAACTTGCTGTTCT-CATTGACAATAT : 572
INSAVC    : TTGACATTTTTCATGCAACCTACTTAAACCTGACTGGTCAAATTAATGACTTGAATTTAGGTGAGAAAAGTTACATAAACACCACAGTAGAACTTGCTATTCT-CATTGATAATAT : 572
BGF10     : TTGATATTTTCAATGCAACATATTTAAACCTGACTGGTCAAATTAATGACTTGAATTTAGGTGAGAAAAGTTGCATAAACACTACATTAGAACTTGCTACTCT-CATTGATAATAT : 572
CB/05     : TTGACATTTTCAACGCAACCTACTTAAACCTGACTGGTCAAATTAATGACTTGAATTTAGGTGAGAAAAGCTACATAAACACCACGGTAGAACTTGCTGTTCT-CATTGACAATAT : 572
23/03     : TCGAAATCTTCAACCAGACAAATTTAAACCTCACTGCAGAAATTTGATGAGCTACAAGTTAGAGCAGACAATCTTACTGTTATTGCA-CATAATTTACAAGAGTACATCGATAATTT : 566
Elmo/02   : TTGAAATTTTCAATCAGACAAATTTAAACCTCACTGCAGAAATTTGATGAGCTACAAGTTAGAGCAGATAATCTTACTGTTATTGCA-CACAATTTACAAGAGTACATCGACAATTT : 566
          TtGA AttTTcaA  AC  A TTAAACCT ACTG  GAAAtt ATGA tTa AA T AG  CAGA AA  T  T  A  C  A AA TT C  T CAT GA AAT T

*      600      *      620      *      640
THr/85/08 : TAACAATACATTAGTCAATCTTGAATGGCTCAATAGAATTGAAACTTATGTA AAAATGGCCTTGG : 636
INSAVC    : TAATAACACATTAGTCAATCTTGAATGGCTCAACAGAATTGAAACTTATGTA AAAATGGCCTTGG : 636
BGF10     : TAATAACACATTAGTCAATCTTGAATGGCTCAACAGAATCGAAACTTATGTA AAAATGGCCTTGG : 636
CB/05     : TAACAATACATTAGTCAATCTTGAATGGCTCAATAGAATTGAAACTTATGTA AAAATGGCCTTGG : 636
23/03     : GAATAACACTCTTCTTGATCTTGAATGGCTTAACAGAATTGAAACTTATGTA AAAATGGCCTTGG : 630
Elmo/02   : GAACAAACACTTCTTGACTTGAATGGCTCAACAGAATTGAAACTTATGTA AAAATGGCCTTGG : 630
          AA AA ACa T GT  AtCTTGAATGGCTcAA AGAAttGAAACTTATGT  AAATGGCCTTGG

```

Εικόνα 4. Αλληλούχηση περιοχής πλησίον του 3'-άκρου του γονιδίου S του ανασυνδυασμένου στελέχους THr/85/08. Διακρίνεται η ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων του στελέχους THr/85/08 με τα στελέχη αναφοράς INSAVC, BGF10 και CB/05 (τύπου II), σε σχέση με τα στελέχη Elmo/02 και 23/03 (τύπου I). Με τα ορθογώνια επισημαίνονται δύο περιοχές έντονης παραλλακτικότητας.

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *      1
Thr/85/08 : ATGTTCCGGCTTTAGTATTCGAGGTGCGTTATTACATTTGCACTTTGGATTATGTATTTTGTAAAGATCGATTTCAGCTATACAGAAGGACTAAGTCTTGGTGGTCTTTCAATCCTGAGA : 118
23/03      : ATGTTCCGGCTTTAGTATTCGAGGTGCGTTATTACATTTGCACTTTGGATTATGTATTTTGTAAAGATCTATTTCAGCTATACAGAAGGACTAAGTCTTGGTGGTCTTTCAACCCTGAAA : 118
CB/05      : ATGTTCCGGCTTTAGTGTTCGAGGTGCAATTGTTACATTTTACTTTGGATTATGTATTTTGTAGATCCATTTCAGTTATACAGAAGGACTAAGTCTTGGTGGTCTTTCAACCCTGAAA : 118
INSAVC     : ATGTTCCGGCTTTAGTGTTCGAGGTGCACTGTTACATTTTACTTTGGATTATGTATTTTGTAGATCCATTTCAGTTATACAGAAGGACTAAGTCTTGGTGGTCTTTCAACCCTGAAA : 118
BGF10     : ATGTTCCGGCTTTAGTGTTCGAGGTGCAATTGTTACATTTTACTTTGGATTATGTATTTTGTAGATCCATTTCAGCTATACAGAAGGACTAAGTCTTGGTGGTCTTTCAACCCTGAAA : 118
          ATGTTCCGGCTTTAGT TtGCAGGTGCa tt TTACATTT ACTTTGGATTATGTATTTTGT AGATC ATTTCAG TATACAGAAGGACTAAGTCTTGGTGGTCTTTCAAcCCTGAAa

      20      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220      *
Thr/85/08 : CTAATGCAATTCCTTGTGTTAGTGCACCTTGGAAAGAAGCTATGTGCTTCCTCTTGAAGGTACACCAACTGGTGTCACTCTTACTTTTGTATCAGGAAATCTTTATGCTGAAGGATTTAA : 236
23/03      : CTAATGCAATTCCTTGTGTTAGTGCACCTTGGAAAGAAGCTATGTGCTTCCTCTTGAAGGTACACCAACTGGTGTCACTCTTACTTTTGTATCAGGAAATCTTTATGCTGAAGGATTTAA : 236
CB/05      : CTAAGCAATTCCTTGTGTTAGTGCATTAGGAAGGAGCTATGTGCTTCCTCTTGAAGGTGTGCCAACTGGTGTCACTTTAACATTGCTCTCAGGGAATTTGCTACGCTGAAGGTTCAA : 236
INSAVC     : CTAAGCAATTCCTTGTGTTAGTGCCTTAGGAAGAAGCTATGTGCTTCCTCTTGAAGGTGTGCCAACTGGTGTCACTTTAACATTGCTCTCAGGGAATTTGCTACGCTGAAGGTTCAA : 236
BGF10     : CCAAGCAATTCCTTGTGTTAGTGCCTTAGGAAGAAGCTATGTGCTTCCTCTTGAAGGTGTGCCAACTGGTGTCACTTTAACATTGCTCTCAGGGAATTTATATGCTGAAGGTTCAA : 236
          CtAa GCAATTCCTTGTGTTAGTGC T GGAAGaAGCTAtGTGCTTCCTCTTGAaGGT GCCAACTGGTGTCACT T AC TTGcT TCAGG AAT T TatGCTGAAGG TT AA

      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *      340      *
Thr/85/08 : AATGGCTGGTGCATGAACATCGAGCAATTTACCAAAATACGTAATGGTTCGCATTACCTACTAGAACTATTTGTCTACACACTTGTGGAAAGCAATTGAAAGCAAGTAGTGCAACAGGA : 354
23/03      : AATGGCTGGTGCATGAACATCGAGCAATTTACCAAAATACGTAATGGTTCGCATTACCTACTAGAACTATTTGTCTACACACTTGTGGAAAGCAATTGAAAGCAAGTAGTGCAACAGGA : 354
CB/05      : AATGGCAGGTGCATGAACATCGACAATTTGCCAAAGTACGTAATGGTTCGCATTACCTACTCAGGACCATTTGTCTACACACTTGTGGTAAGAAATTGAAAGCAAGTAGTGCAACAGGA : 354
INSAVC     : AATGGCAGGTGCATGAACATCGACAATTTACCAAAATACGTAATGGTTCGCATTACCTACTCAGAAACCATAGTCTACACACTTGTGGCAAGAAATTGAAAGCAAGTAGTGCAACAGGA : 354
BGF10     : AATGGGGTGCATGAACATCGACAATTTACCAAAATACGTAATGGTTCGCATTACCTACTAGAACTATTTGTCTACACACTTGTGGAAAGCAATTGAAAGCAAGTAGTGCAACAGGA : 354
          AAT GC GGTGG ATGAACATCGA ATTTaCCAAaATaCgTAATGGT GCATTACCTag AGaAC AtTgTCTACACACTTGTGG AAG AATTGAAAGCAAGTAGTGCAACAGGA

      360      *      380      *
Thr/85/08 : TGGGCTTACTATGTAAAATCTAAAGCTGGTGATTACTCAACAGA : 398
23/03      : TGGGCTTACTATGTAAAATCTAAAGCTGGTGATTACTCAACAGA : 398
CB/05      : TGGGCTTACTATGTAAAATCTAAAGCTGGTGATTACTCAACAGA : 398
INSAVC     : TGGGCTTACTATGTAAAATCTAAAGCTGGTGATTACTCAACAGA : 398
BGF10     : TGGGCTTACTATGTAAAATCTAAAGCTGGTGATTACTCAACAGA : 398
          TGGGCTTACTATGTAAAATCTAAAGCTGGTGATTACTCAACAGA

```

Εικόνα 5. Αλληλούχηση περιοχής πλησίον του 3'- άκρου του γονιδίου M. Διακρίνεται η ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων του στελέχους THr/85/08 με τα στέλεχος αναφοράς 23/03 (τύπου I) σε σχέση με τα στέλεχη αναφοράς INSAVC, BGF10 και CB/05 (τύπου II). Με τα ορθογώνια επισημαίνονται οι περιοχές παραλλακτικότητας.

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *      1
NA/09 : MIVIVTTCILSLEFSYHTVASTTNNDCRQVNVVTQLDGNENLIRDFLEQNFKEEGTVVVGYYPTEVWYNCSSRTAHTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLEHVHGEFVSMII : 118
CB/05 : MIVVILTVCVLLCSYHTVASTTNNDCRQVNVVTQLDGNENLIRDFLEQNFKEEGTVVVGYYPTEVWYNCSSRTAHTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLEHVHGEFVSAII : 118
1-71 : MIV-LTLCLLELYSSVICTSNNDCVQVNVVTQLDGNENIIRDFLEQNFKEEGTVVVGYYPTEVWYNCSSRTAHTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLVHVHGDVPSIII : 117
INSAVC : MIV-LTLCLLELYSSVICTSNNDCVQVNVVTQLDGNENIIRDFLEQNFKEEGTVVVGYYPTEVWYNCSSRTAHTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLVHVHGNVPSIIV : 117
BGF10 : MIV-LTLCLLELYSSVICTSNNDCVQVNVVTQLDGNENIIRDFLEQNFKEEGTVVVGYYPTEVWYNCSSRTAHTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLVHVHGNVPSIIV : 117
K378 : MIV-LTLCLLELYSSVICTSNNDCVQVNVVTQLDGNENIIRDFLEQNFKEEGTVVVGYYPTEVWYNCSSRTAHTTAYEYFNNIHAFYFDMEAMENSTGNARGKPLLVHVHGDVPSIII : 117
      MIV 6t L L Y 3V T3NNDc QvNVVTQL GNENI4DFLf FKEEG36VVGYYPTEVWYNCsr3a TtA5 F NIHAFYFDMEAMENSTGLARGKPLL HVHG FVS I6

      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220      *
NA/09 : YISAYRDDVQNRPLLKHGLVCITFRNIDYNSFTSSQWNSICTGNDRKIPFSVIPTDNGTKIYGLEWNDDEIVTAYISGRSYNWNINNNWFNNVTLLYSRSSTATWQHSAAAYVYQGVSN : 236
CB/05 : YISAYRNDVQHRPLLKHGLVCITFRNIDYNSFTSRQWNSICTGNDRKIPFSVIPTDNGTKIYGLEWNDDEIVTAYISGRSYNWNINNNWFNNVTLLYSRSSTATWQHSAAAYVYQGVSN : 236
1-71 : YISAYRDDVQGRPLLKHGLLCITFRNKIIDYNSFTSAQWNSAICTGDDRKIIPFSVIPTDNGTKIFGLEWNDDEIVTAYISDRSHHININNNWFNNVTILYSRSSTATWQHSAAAYVYQGVSN : 235
INSAVC : YISAYRDDVQERPLLKHGLLCITFRNDTVDYNSTINQWRDICTGDDRKIIPFSVPTDNGTKIFGLEWNDDEIVTAYISDESHRININNNWFNNVTLLYSRSSTATWQHSAAAYVYQGVSN : 235
BGF10 : YISAYRHDVQGRPKLKHGLLCITFRNSTDYDRETANQWRDICTGDDRKIIPFSVPTDNGTKIFGLEWNDDEIVTAYISDDSHYININNNWFNNVTLLYSRSSTATWQHSAAAYVYQGVSN : 235
K378 : YISAYRDDVQERPLLKHGLLCITFRNKIIDYNSFTSAQWNSAICTGDDRKIIPFSVIPTDNGTKIFGLEWNDDEIVTAYISDRSHHININNNWFNNVTILYSRSSTATWQHSAAAYVYQGVSN : 235
      YISAYR DVQ RPLLKHGL6CITR DYI FT QW IC G DRKIpfSV6PTDNGTK65GLEWND VTAYIS S NINNNWFNNVT6LYSR3S3ATWQ SAAYVYQGVSN

      *      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *      340      *
NA/09 : FTYYKLNNTNGLKTYEFCEDYEYCTGYATNVEAFTVGGYIPDGFSENNWFLLTNSSTFVSGREVTNQPLLNVNCLWPVPSFGVAAQEFCEFEAQFSQCNGVSLNNTVDVIRFNLNFTAD : 354
CB/05 : FTYYKLNNTNGLKTYEFCEDYEYCTGYATNVEAFTVGGYIPDGFSENNWFLLTNSSTFVSGREVTNQPLLNVNCLWPVPSFGVAAQEFCEFEAQFSQCNGVSLNNTVDVIRFNLNFTAD : 354
1-71 : FTYYKLNNTNGLKSYELCEDYEYCTGYATNVEAFTVGGYIPDGFSENNWFMLTNSSTFVSGREVTNQPLLNVNCLWPVPSFGVAAQEFCEFEAQFSQCNGVSLNNTVDVIRFNLNFTTD : 353
INSAVC : FTYYKLNNTNGLKSYELCEDYEYCTGYATNVEAFTVGGYIPDGFSENNWFMLTNSSTFVSGREVTNQPLLNVNCLWPVPSFGVAAQEFCEFEAQFSQCNGVSLNNTVDVIRFNLNFTTD : 353
BGF10 : FTYYKLNNTNGLKSYELCEDYEYCTGYATNVEAFTVGGYIPDGFSENNWFMLTNSSTFVSGREVTNQPLLNVNCLWPVPSFGVAAQEFCEFEAQFSQCNGVSLNNTVDVIRFNLNFTTD : 353
K378 : FTYYKLNNTNGLKSYELCEDYEYCTGYATNVEAFTVGGYIPDGFSENNWFMLTNSSTFVSGREVTNQPLLNVNCLWPVPSFGVAAQEFCEFEAQFSQCNGVSLNNTVDVIRFNLNFTAL : 353
      FTYYKLNnTnGLK3YE CeDYEYCTGYATNVEAFT VGGYIP GFSFNNWF61TN STFVSGREVTNQPLLNVNCLWPVPSFGVAAQ2FCFEAQFSQCNGVSLNNTVDVIRFNLNFT d

      *      360      *      380      *      400      *      420      *      440      *      460      *
NA/09 : VQSGMGATVPSLNTTGGVILEISCYNDTVSESSFYSYGEIFEGVIDGPRYCYLYNGTALKYLGLTLPPSVKEIAISKWGHFYINGYNFFSTFPIDCISFNLTTGDSGAFWTIAYTSYT : 472
CB/05 : VQSGMGATVPSLNTTGGVILEISCYNDTVSESSFYSYGEIFEGVIDGPRYCYLYNGTALKYLGLTLPPSVKEIAISKWGHFYINGYNFFSTFPIDCISFNLTTGDSGAFWTIAYTSYT : 472
1-71 : VQSGMGATVPSLNTTGGVILEISCYNDTVSESSFYSYGEIFEGVIDGPRYCYLYNGTALKYLGLTLPPSVKEIAISKWGHFYINGYNFFSTFPIDCISFNLTTGDSGAFWTIAYTSYT : 471
INSAVC : VQSGMGATVPSLNTTGGVILEISCYNDTVSESSFYSYGEIFEGVIDGPRYCYLYNGTALKYLGLTLPPSVKEIAISKWGHFYINGYNFFSTFPIDCISFNLTTGDSGAFWTIAYTSYT : 471
BGF10 : VQSGMGATVPSLNTTGGVILEISCYNDTVSESSFYSYGEIFEGVIDGPRYCYLYNGTALKYLGLTLPPSVKEIAISKWGHFYINGYNFFSTFPIDCISFNLTTGDSGAFWTIAYTSYT : 471
K378 : VQSGMGATVPSLNTTGGVILEISCYNDTVSESSFYSYGEIFEGVIDGPRYCYLYNGTALKYLGLTLPPSVKEIAISKWGHFYINGYNFFSTFPIDCISFNLTTGDSGAFWTIAYTSYT : 471
      VQSGMGATVPSLNTTGGVILEISCYNDTVSESSFYSYGEI FG6tDGPRYC5 LYNGTALKYLGLTLPPSVKEIAISKWGHFYINGYNFFSTFPIDCISFNLTTG DSAGAFWTIAYTSYT

```

Εικόνα 6. Συνέχεια στην πίσω σελίδα.

```

      480          *          500          *          520          *          540          *          560          *          580          *
NA/09 : EALVQVENTAIKKVTYCNSHINNIKCSQLTANLQNGFYPVASSEVGLVnkSVLLPSFYSHTSVNITIDLGMKRSYGQPIASALSNIITLPMQDNNTDVYCIrSNQFSVYVHSTCKSS : 590
CB/05 : EALVQVENTAIKKVTYCNSHINNIKCSQLTANLQNGFYPVASSEVGLVnkSVLLPSFYSHTSVNITIDLGMKRSYGQPIASALSNIITLPMQDNNTDVYCIrSNQFSVYVHSTCKSS : 590
1-71 : DALVQVENTAIKKVTYCNSHINNIKCSQLTANLQNGFYPVASSEVGLVNEsvVLLPSFYSHTSVNITIDLGMKRSYGQPIASTLSNIITLPMQDNNTDVYCIrSNQFSVYVHSTCKSS : 589
INSAVC : EALVQVENTAIKKVTYCNSHINNIKCSQLTANLQNGFYPVASSEVGLVnkSVLLPSFYSHTSVNITIDLGMKRS-VTVTIASPLSNIITLPMQDNNTDVYCIrSNQFSVYVHSTCKSS : 588
BGF10 : EALVQVENTAIKKVTYCNSHVNSIKCSQLTANLQNGFYPVASSEVGLVnkSVLLPSFYSHTSVNITIDLGMRRSYGQPIASLSNISLPMQDNNTDVYCIrSNQFSVYVHSTCKSSA : 589
K378 : DALVQVENTAIKKVTYCNSHINNIKCSQLTANLQNGFYPVASSEVGLVnkSVLLPSFYSHTSVNITIDLGMKRSYGQPIASTLSNIITLPMQDNNTDVYCIrSNRFSVYVHSTCKSS : 589
      ALVQVENTAIKKVTYCNSH6NnIKCSQLTANLQNGFYPVASSEVGLVnkSVLLPSFYSHTSVNITIDLGM4R8gygqp6AS L8NI3LPMQDNNTDVYCIrSN F8svYvH8tCKSS

      600          *          620          *          640          *          660          *          680          *          700
NA/09 : LWDNVFNSDCTDVLVYATAVIKTGTCPFSFDKLNLYLTFNKFCLSLNPVGANCKFDVAARTRTNEQVVRSLYVIYEEGDNIIVGVPSDNSGLHDLsvLHLDsCTDYNIYGRtGVGIIRQT : 708
CB/05 : LWDNVFNSDCTDELHATAVIKTGTCPFSFDKLNLYLTFNKFCFSLNPVGANCKFDVAARTRTNEQVVRSLYVIYEEGDNIIVGVPSDNSGLHDLsvLHLDsCTDYNIYGRtGVGIIRQT : 708
1-71 : LWDNVFNSDCTDVLVYATAVIKTGTCPFSFDKLNLYLTFNKFCLSLNPVGANCKFDVAARTRTNEQVVRSLYVIYEEGDNIIVGVPSDNSGLHDLsvLHLDsCTDYNIYGRtGVGIIRQT : 707
INSAVC : LWDNVFNSACTDVLVYATAVIKTGTCPFSFDKLNLYLTFNKFCLSLNPVGANCKFDVAARTRTNEQVVRSLYVIYEEGDNIIVGVPSDNSGLHDLsvLHLDsCTDYNIYGRtGVGIIRKT : 706
BGF10 : LWDNVFNSACTDVLVYATAVIKTGTCPFSFDKLNLYLTFNKFCLSLNPVGANCKFDVAARTRTNEQVVRSLYVIYEEGDNIIVGVPSDNSGLHDLsvLHLDsCTDYNIYGRtGVGIIRKT : 707
K378 : LWDNVFNSDCTDVLVYATAVIKTGTCPFSFDKLNLYLTFNKFCLSLNPVGANCKFDVAARTRTNEQVVRSLYVIYEEGDNIIVGVPSDNSGLHDLsvLHLDsCTDYNIYGRtGVGIIRQT : 707
      LWD1 FNS CTDvL ATAVIKTGTCPFSFDKLNLYLTFNKFCLSLNPVGANCKFDVAARTRTNEQvV SLYVIYEEGDNIIVGVPSDNSGLHDLsvLHLDsCTDYNIYGRtGVGIIR T

      *          720          *          740          *          760          *          780          *          800          *          820
NA/09 : NSTLLSGLYYSLSGDLGFKNVTDGVVYSVTPCDVSAQAVIDGAIVGAMTSINSELLGLTHWTTT PNFYYYSIYNYTNARTRGTaID8NDVDCEPIITYSNIgVCKNGALVFINVt : 826
CB/05 : NSTLLSGLYYSLSGDLGFKNVTDGVVYSVTPCDVSAQAVIDGAIVGAMTSINSELLGLTHWTTT PNFYYYSIYNYTNARTRGTaID8NDVDCEPIITYSNIgVCKNGALVFINVt : 826
1-71 : NSTLLSGLYYSLSGDLGFKNVSDGVVYSVTPCDVSAQAVIDGAIVGAMTSINSELLDLTHWTTT PNFYYYSIYNYTNERTRGTaID8NDVDCEPIITYSNIgVCKNGALVFINVt : 825
INSAVC : NSTLLSGLYYSLSGDLGFKNVSDGVVYSVTPCDVSAQAVIDGAIVGAMTSINSELLGLTHWTTT PNFYYYSIYNYTNVMNRGTaID-NDIDCEPIITYSNIgVCKNGALVFINVt : 823
BGF10 : NSTLLSGLYYSLSGDLGFKNVSDGVVYSVTPCEVSAQAVIDGAIVGAMTSINSELLGLTHWTTT PNFYYYSIYNYTNERVTRGTaID8NDVDCEPIITYSNIgVCKNGALVFINVt : 825
K378 : NSTLLSGLYYSLSGDLGFKNVSDGVVYSVTPCDVSAQAVIDGAIVGAMTSINSELLGLTHWTTT PNFYYYSIYNYTNERTRGTaID8NDVDCEPIITYSNIgVCKNGALVFINVt : 825
      NSTLLSGLYYSLSGDLGFKNV3DGV6YSVTPCDVSAQAVIDGAIVGAMTSINSELLgLTHWTTT PNFYYYSIYNYTN r RGTaID8ND6DCEPIITYSNIgVCKNGALVFINVt

      *          840          *          860          *          880          *          900          *          920          *          940
NA/09 : HSDGDVQPISTGNVTIPTNFTISVQVEYIQVYTPVSDICsRYVCNGNPRCNKLLTQYVSACQTIeQALAMGARLENMEID8MlFV8ENALKLASVEAFN8STeHLDPIYKEWPNIGGS : 944
CB/05 : HSDGDVQPISTGNVTIPTNFTISVQVEYIQVYTPVSDICsRYVCNGNPRCNKLLTQYVSACQTIeQALAMGARLENMEID8MlFV8ENALKLASVEAFN8STeHLDPIYKEWPNIGGS : 944
1-71 : HSDGDVQPISTGNVTIPTNFTISVQVEYIQVYTPVSDICsRYVCNGNPRCNKLLTQYVSACQTIeQALAMGARLENMEID8MlFV8ENALKLASVEAFN8STeHLDPIYKEWPNIGGS : 943
INSAVC : HSDGDVQPISTGNVTIPTNFTISVQVEYIQVYTPVSDICsRYVCNGNPRCNKLLTQYVSACQTIeQALAMGARLENMEID8MlFV8ENALKLASVEAFN8STeHLDPIYKEWPNIGGS : 941
BGF10 : HSDGDVQPISTGNVTIPTNFTISVQVEYIQVYTPVSDICsRYVCNGNPRCNKLLTQYVSACQTIeQALAMGARLENMEID8MlFV8ENALKLASVEAFN8STeHLDPIYREWPNIGGS : 943
K378 : HSDGDVQPISTGNVTIPTNFTISVQVEYIQVYTPVSDICsRYVCNGNPRCNKLLTQYVSACQTIeQALAMGARLENMEID8MlFV8ENALKLASVEAFN8STeHLDPIYKEWPNIGGS : 943
      HSDGDVQPISTGNVTIPTNFTISVQVEYIQVYTPVSDICsRYVCNGNPRCNKLLTQYVSACQTIeQALAMGARLENMEID8MlFV8ENALKLASVEAFN8STe LDPIY4EWPNIGGS

```

Εικόνα 6. Συνέχεια στην πίσω σελίδα.

```

*          960          *          980          *          1000          *          1020          *          1040          *          1060
NA/09 : WLGLKDI LPSHNSKRKYRSAIEDLLFDKVVTSGLGTVD EDYKRCTGGYDIADLVCAQYYNGIMVLPGVANDDKMMYTASLAGGITL GALGGAVAI PFAVAVQARLN YVALQTDV L : 1062
CB/05 : WLGLKDI LPSHNSKRKYRSAIEDLLFDKVVTSGLGTVD EDYKRCTGGYDIADLVCAQYYNGIMVLPGVANDDKMMYTASLAGGITL GALGGAVSI PFAVAVQARLN YVALQTDV L : 1062
1-71 : WLGLKDI LPSHNSKRKYRSAIEDLLFDKVVTSGLGTVD EDYKRCTGGYDIADLVCAQYYNGIMVLPGVANDDKMMYTASLAGGITL GALGGAVSI PFAVAVQARLN YVALQTDV L : 1061
INSAVC : WLGLKDI LPSHNSKRKYRSAIEDLLFDKVVTSGLGTVD EDYKRCTGGYDIADLVCAQYYNGIMVLPGVANDDKMMYTASLAGGITL GALGGAVAI PFAVAVQARLN YVALQTDV L : 1059
BGF10 : WLGLKDI LPSHNSKRKYRSAIEDLLFDKVVTSGLGTVD EDYKRCTGGYDIADLVCAQYYNGIMVLPGVANDDKMMYTASLAGGITL GALGGAVSI PFAVAVQARLN YVALQTDV L : 1061
K378 : WLGLKDI LPSHNSKRKYRSAIEDLLFDKVVTSGLGTVD EDYKRCTGGYDIADLVCAQYYNGIMVLPGVANDDKMMYTASLAGGITL GALGGAVSI PFAVAVQARLN YVALQTDV L : 1061
WLGLKDI LPSHNSKRKYRSAIEDLLFDKVVTSGLGTVD EDYKRCTGGYDIADLVCAQYYNGIMVLPGVANDDKMMYTASLAGGITL GALGGAV I PFA6AVQARLN YVALQTDV L

*          1080          *          1100          *          1120          *          1140          *          1160          *          1180
NA/09 : NKNQQI LANAFNAI GNI TQAFGKVND AIHQ TSKGLATVAKALAKVQDVVNTQGOALSHLTVQLQNNFQAISSSI SDIYNRLDELSADAQVDR LITGR L TALNAFVSQTLTRQAEVRA : 1180
CB/05 : NKNQQI LANAFNAI GNI TQAFGKVND AIHQ TSKGLATVAKALAKVQDVVNTQGOALSHLTVQLQNNFQAISSSI SDIYNRLDELSADAQVDR LITGR L TALNAFVSQTLTRQAEVRA : 1180
1-71 : NKNQQI LANAFNAI GNI TQAFGKVND AIHQ TSKGLATVAKALAKVQDVVNTQGOALSHLTVQLQNNFQAISSSI SDIYNRLDELSADAQVDR LITGR L TALNAFVSQTLTRQAEVRA : 1179
INSAVC : NKNQQI LANAFNAI GNI TQAFGKVND AIHQ TSKGLATVAKALAKVQDVVNTQGOALSHLTVQLQNNFQAISSSI SDIYNRLDELSADAQVDR LITGR L TALNAFVSQTLTRQAEVRA : 1177
BGF10 : NKNQQI LANAFNAI GNI TQAFGKVND AIHQ TSKGLATVAKALAKVQDVVNTQGOALSHLTVQLQNNFQAISSSI SDIYNRLDELSADAQVDR LITGR L TALNAFVSQTLTRQAEVRA : 1179
K378 : NKNQQI LANAFNAI GNI TQAFGKVND AIHQ TSKGLATVAKALAKVQDVVNTQGOALSHLTVQLQNNFQAISSSI SDIYNRLDELSADAQVDR LITGR L TALNAFVSQTLTRQAEVRA : 1179
NKNQQI LANAFNAI GNI TQAFGKVND AIHQ TSKGLATVAKALAKVQDVVNTQGOALSHLTVQLQNNFQAISSSI SDIYNRLDELSADAQVDR LITGR L TALNAFVSQTLTRQAEVRA

*          1200          *          1220          *          1240          *          1260          *          1280          *          13
NA/09 : SRQLAKDKVNECVRSQSQRFGFCNGTHLFLSANAAPNGMIFFHTVLLPTAYETVTAWSGICASDGRTEFLVVKDVQLTLFRNLDDKFFYLTPRTMYQPRVATSSDFVQIEGCDVLFV : 1298
CB/05 : SRQLAKDKVNECVRSQSQRFGFCNGTHLFLSANAAPNGMIFFHTVLLPTAYETVTAWSGICASDGRTEFLVVKDVQLTLFRNLDDKFFYLTPRTMYQPRVATSSDFVQIEGCDVLFV : 1298
1-71 : SRQLAKDKVNECVRSQSQRFGFCNGTHLFLSANAAPNGMIFFHTVLLPTAYETVTAWSGICASDGRTEFLVVKDVQLTLFRNLDDKFFYLTPRTMYQPRVATSSDFVQIEGCDVLFV : 1297
INSAVC : SRQLAKDKVNECVRSQSQRFGFCNGTHLFLSANAAPNGMIFFHTVLLPTAYETVTAWSGICASDGRTEFLVVKDVQLTLFRNLDDKFFYLTPRTMYQPRVATSSDFVQIEGCDVLFV : 1295
BGF10 : SRQLAKDKVNECVRSQSQRFGFCNGTHLFLSANAAPNGMIFFHTVLLPTAYETVTAWSGICASDGRTEFLVVKDVQLTLFRNLDDKFFYLTPRTMYQPRVATSSDFVQIEGCDVLFV : 1297
K378 : SRQLAKDKVNECVRSQSQRFGFCNGTHLFLSANAAPNGMIFFHTVLLPTAYETVTAWSGICASDGRTEFLVVKDVQLTLFRNLDDKFFYLTPRTMYQPRVATSSDFVQIEGCDVLFV : 1297
SRQLAKDKVNECVRSQSQRFGFCNGTHLFLSANAAPNGMIFFHTVLLPTAYETVTAWSGICASDGRTEFLVVKDVQLTLFRNLDDKFFYLTPRTMYQPRVATSSDFVQIEGCDVLFV

00          *          1320          *          1340          *          1360          *          1380          *          1400          *
NA/09 : NATVIELPSIIPDYIDINQTVQDILENFRPNWTVPELTLDFINATYLNLTGEINDLEFRSEKIHNTTVELAVLIDNINNTLVNLEWLNRIETVVKWPWYVWLLIGLVVIFCIPLLLFC : 1416
CB/05 : NATVIELPSIIPDYIDINQTVQDILENFRPNWTVPELTLDFINATYLNLTGEINDLEFRSEKIHNTTVELAVLIDNINNTLVNLEWLNRIETVVKWPWYVWLLIGLVVIFCIPLLLFC : 1416
1-71 : NATVIDLPSIIPDYIDINQTVQDILENFRPNWTVPELTLDFINATYLNLTGEINDLEFRSEKIHNTTVELAVLIDNINNTLVNLEWLNRIETVVKWPWYVWLLIGLVVIFCIPLLLFC : 1415
INSAVC : NATVIELPSIIPDYIDINQTVQDILENFRPNWTVPELTLDFINATYLNLTGEINDLEFRSEKIHNTTVELAVLIDNINNTLVNLEWLNRIETVVKWPWYVWLLIGLVVIFCIPLLLFC : 1413
BGF10 : NATVIELPSIIPDYIDINQTVQDILENFRPNWTVPELTLDFINATYLNLTGEINDLEFRSEKIHNTTVELAVLIDNINNTLVNLEWLNRIETVVKWPWYVWLLIGLVVIFCIPLLLFC : 1415
K378 : NATVIDLPSIIPDYIDINQTVQDILENFRPNWTVPELTLDFINATYLNLTGEINDLEFRSEKIHNTTVELAVLIDNINNTLVNLEWLNRIETVVKWPWYVWLLIGLVVIFCIPLLLFC : 1415
NaTVI LPSIIPDYIDINQTVQDILENFRPNWTVPEL LDFINATYLNLTGEINDLEFRSEK6HNTT6ELA LIDNINNTLVNLEWLNRIETVVKWPWYVWLLIGLVVIFCIP6LLFC

```

Εικόνα 6. Συνέχεια στην πίσω σελίδα.

```

      1420          *          1440          *
NA/09 : CCSTGCCGCTGCLGSCCHSICSRRQFENYEPiEKVHVH : 1454
CB/05 : CCSTGCCGCTGCLGSCCHSICSRRQFENYEPiEKVHVH : 1454
1-71  : CCSTGCCGCTGCLGSCCHSICSRRQFESYEPiEKVHVH : 1453
INSAVC : CCSTGCCGCTGCLGSCCHSICSRGQFESYEPiEKVHVH : 1451
BGF10 : CCSTGCCGCTGCLGSCCHSMCSRQFESYEPiEKVHVH : 1453
K378  : CCSTGCCGCTGCLGSCCHSICSRRQFESYEPiEKVHVH : 1453
      CCSTGCCGCTGCLGSCCHS6CSRQFE YEPiEKVHVH

```

Εικόνα 6. Πολλαπλή στοίχιση της πρωτεΐνης S στελεχών του CCoVIIa. Διακρίνεται η μεγάλη ομοιότητα του στελέχους NA/09, που ανιχνεύτηκε στα όργανα του σκύλου με το στέλεχος CB/05, ιδιαίτερα στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη αναφοράς.

Πίνακας 5. Ποσοστά ομοιότητας σε επίπεδο αμινοξέων της πρωτεΐνης S, των ελληνικών στελεχών που ανιχνεύθηκαν στα όργανα, με διεθνή στελέχη αναφοράς. Διακρίνεται το υψηλό ποσοστό ομοιότητας του NA/09 με το CCoVIIa/CB/05, καθώς και των 66/09 και 68/09 με το CCoVIIb/119/08.

Seq->	NA/09	66/09	68/09
NA/09	ID	0,83	0,83
66/09	0,83	ID	0,976
68/09	0,83	0,976	ID
CCoVIIa/CB/05/DQ112226	0,982	0,827	0,827
CCoVIIa/1-71/AY796289	0,94	0,816	0,813
CCoVIIa/K378/X77047	0,933	0,809	0,807
CCoVIIa/INSAVC/D13096	0,925	0,808	0,805
CCoVIIa/BGF10/AY342160	0,92	0,804	0,803
CCoVI/Elmo/02/AY307020	0,429	0,433	0,429
CCoVI/23/03/AY307021	0,436	0,433	0,43
FCoVI/Black/EU186072	0,426	0,42	0,417
FCoVI/UCD1/AB088222	0,432	0,426	0,422
CCoVIIb/341/05/EU856361	0,833	0,977	0,977
CCoVIIb/119/08/EU924791	0,837	0,983	0,983
CCoVIIb/430/07/EU924790	0,832	0,958	0,958
CCoVIIb/174/06/EU856362	0,82	0,94	0,943
FCoVII/79-1683/X80799	0,96	0,813	0,811
FCoVII/79-1146/NC007025	0,944	0,805	0,804
TGEV/TS/DQ201447	0,803	0,912	0,914
TGEV Purdue/NC002306	0,803	0,911	0,912

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *      12
NA/09 : ATGAGTCAATTACAGGCTTTGTATGGACATTGTCAAATCTATTGACACATCCGTAGACGCTGTACTTGACGAACTTGATCGTGCATACTTTGCTGTAACCTCTAAAGTAGAGTTTAAAGAC : 119
CB/05 : ATGAGTCAATTACAGGCTTTGTATGGACATTGTCAAATCTATTGACACATCCGTAGACGCTGTACTTGACGAACTTGATCGTGCATACTTTGCTGTAACCTCTAAAGTAGAGTTTAAAGAC : 119
INSAVC : ATGAGTCAATTACAGGCTTTGTATGGACATTGTCAAATCTATTGACACATCCGTAGACGCTGTACTTGACGAACTTGATCGTGCATACTTTGCTGTAACCTCTAAAGTAGAGTTTAAAGAC : 119
BGF10 : ATGAGTCAATTACAGGCTTTGTATGGACATTGTCAAATCTATTGACACATCCGTAGACGCTGTACTTGACGAACTTGATCGTGCATACTTTGCTGTAACCTCTAAAGTAGAGTTTAAAGAC : 119
1-71 : ATGAGTCAATTACAGGCTTTGTATGGACATTGTCAAATCTATTGACACATCCGTAGACGCTGTACTTGACGAACTTGATCGTGCATACTTTGCTGTAACCTCTAAAGTAGAGTTTAAAGAC : 119
66/09 : ATGAGTCAATTACAGGCTTTGTATGGACATTGTCAAATCTATTGACACATCCGTAGACGCTGTACTTGACGAACTTGATCGTGCATACTTTGCTGTAACCTCTAAAGTAGAGTTTAAAGAC : 119
68/09 : ATGAGTCAATTACAGGCTTTGTATGGACATTGTCAAATCTATTGACACATCCGTAGACGCTGTACTTGACGAACTTGATCGTGCATACTTTGCTGTAACCTCTAAAGTAGAGTTTAAAGAC : 119
341/05 : ATGAGTCAATTACAGGCTTTGTATGGACATTGTCAAATCTATTGACACATCCGTAGACGCTGTACTTGACGAACTTGATCGTGCATACTTTGCTGTAACCTCTAAAGTAGAGTTTAAAGAC : 119
119/08 : ATGAGTCAATTACAGGCTTTGTATGGACATTGTCAAATCTATTGACACATCCGTAGACGCTGTACTTGACGAACTTGATCGTGCATACTTTGCTGTAACCTCTAAAGTAGAGTTTAAAGAC : 119
430/07 : ATGAGTCAATTACAGGCTTTGTATGGACATTGTCAAATCTATTGACACATCCGTAGACGCTGTACTTGACGAACTTGATCGTGCATACTTTGCTGTAACCTCTAAAGTAGAGTTTAAAGAC : 119
174/06 : ATGAGTCAATTACAGGCTTTGTATGGACATTGTCAAATCTATTGACACATCCGTAGACGCTGTACTTGACGAACTTGATCGTGCATACTTTGCTGTAACCTCTAAAGTAGAGTTTAAAGAC : 119
23/03 : ATGAGTCAATTACAGGCTTTGTATGGACATTGTCAAATCTATTGACACATCCGTAGACGCTGTACTTGACGAACTTGATCGTGCATACTTTGCTGTAACCTCTAAAGTAGAGTTTAAAGAC : 119
      ATGAGTCAATTACAGGCTTTGTATGGACATTGTCAAATCTATTGACACATCCGTAGACGCTGTACTTGACGAACTTGATCGTGCATACTTTGCTGTAACCTCTAAAGTAGAGTTTAAAGAC
      0      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220      *
NA/09 : TGGTAAACTACTTGTGTGATAAGGTTTGGTGATACACTTTTGGAGGCTAAGGATAAAGCAATATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGT TTTGAT : 238
CB/05 : TGGTAAACTACTTGTGTGATAAGGTTTGGTGATACACTTTTGGAGGCTAAGGATAAAGCAATATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGT TTTGAT : 238
INSAVC : TGGTAAACTACTTGTGTGATAAGGTTTGGTGATACACTTTTGGAGGCTAAGGATAAAGCAATATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGT TTTGAT : 238
BGF10 : CGTAAACTACTTGTGTGATAAGGTTTGGTGATACACTTTTGGAGGCTAAGGATAAAGCAATATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGT TTTGAT : 238
1-71 : TGGTAAACTACTTGTGTGATAAGGTTTGGTGATACACTTTTGGAGGCTAAGGATAAAGCAATATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATA----- : 220
66/09 : TGGTAAACTACTTGTGTGATAAGGTTTGGTGATACACTTTTGGAGGCTAAGGATAAAGCAATATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGT TTTGAT : 230
68/09 : TGGTAAACTACTTGTGTGATAAGGTTTGGTGATACACTTTTGGAGGCTAAGGATAAAGCAATATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGT TTTGAT : 238
341/05 : TGGTAAACTACTTGTGTGATAAGGTTTGGTGATACACTTTTGGAGGCTAAGGATAAAGCAATATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGT TTTGAT : 238
119/08 : TGGTAAACTACTTGTGTGATAAGGTTTGGTGATACACTTTTGGAGGCTAAGGATAAAGCAATATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGT TTTGAT : 238
430/07 : TGGTAAACTACTTGTGTGATAAGGTTTGGTGATACACTTTTGGAGGCTAAGGATAAAGCAATATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGT TTTGAT : 238
174/06 : TGGTAAACTACTTGTGTGATAAGGTTTGGTGATACACTTTTGGAGGCTAAGGATAAAGCAATATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGT TTTGAT : 238
23/03 : TGGTAAACTACTTGTGTGATAAGGTTTGGTGATACACTTTTGGAGGCTAAGGATAAAGCAATATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGT TTTGAT : 238
      tGGTAAACTACTTGTGTGATAAGGTTTGGTGATACACTTTTGGAGGCTAAGGATAAAGCAATATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGT TTTGAT
      40      *      260      *      280      *      300      *      320      *
NA/09 : ATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTGGTACAAATTACCTTTTGAACCTAGACTTCGTATCATCGAACAACAAAAACCTAAAGCATTAA : 332
CB/05 : ATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTGGTACAAATTACCTTTTGAACCTAGACTTCGTATCATCGAACAACAAAAACCTAAAGCATTAA : 294
INSAVC : ATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTGGTACAAATTACCTTTTGAACCTAGACTTCGTATCATCGAACAACAAAAACCTAAAGCATTAA : 332
BGF10 : ATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTGGTACAAATTACCTTTTGAACCTAGACTTCGTATCATCGAACAACAAAAACCTAAAGCATTAA : 332
1-71 : ATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTGGTACAAATTACCTTTTGAACCTAGACTTCGTATCATCGAACAACAAAAACCTAAAGCATTAA : 285
66/09 : ATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTGGTACAAATTACCTTTTGAACCTAGACTTCGTATCATCGAACAACAAAAACCTAAAGCATTAA : 332
68/09 : ATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTGGTACAAATTACCTTTTGAACCTAGACTTCGTATCATCGAACAACAAAAACCTAAAGCATTAA : 332
341/05 : ATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTGGTACAAATTACCTTTTGAACCTAGACTTCGTATCATCGAACAACAAAAACCTAAAGCATTAA : 332
119/08 : ATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTGGTACAAATTACCTTTTGAACCTAGACTTCGTATCATCGAACAACAAAAACCTAAAGCATTAA : 332
430/07 : ATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTGGTACAAATTACCTTTTGAACCTAGACTTCGTATCATCGAACAACAAAAACCTAAAGCATTAA : 332
174/06 : ATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTGGTACAAATTACCTTTTGAACCTAGACTTCGTATCATCGAACAACAAAAACCTAAAGCATTAA : 332
23/03 : ATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTGGTACAAATTACCTTTTGAACCTAGACTTCGTATCATCGAACAACAAAAACCTAAAGCATTAA : 332
      at ac gttta aa tt aa gc aaat ttggta aaatTACCTTTTGAACCTAGACTTCgTATCAT AACA ACAAAAACCTAAAGCATTAA

```

Εικόνα 7. Πολλαπλή στοίχιση του πρώτου τμήματος του ORF3. Το ORF3a βρίσκεται από την έναρξη, έως το κωδικόνιο λήξης (ορθογώνιο, θέση 237). Εξαιρέση αποτελεί το στέλεχος CCoV1a 1-71, που εξαιτίας της απάλειψης 47 νουκλεοτιδίων, η λήξη του βρίσκεται στο τέλος της εικόνας. Στη θέση 182 επισημαίνεται με ορθογώνιο η έναρξη του ORF3b.


```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *      120
INSAVC : ATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGTTTGATATTACTGTTTATAAGTTTAAAGGCCAAATTTGGGTACAAATACCTTTTGAAACTAGACTTCGTA : 121
BGF10  : ATGCTAAACTTGGTTCCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGTTTGATATTACTGTTTACAAGTTTAAAGGCCAAATCTTGGTATAAATACCTTTTGAAACTAGACTTCGTA : 121
23/03  : ATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTGTTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGTTTAAACATCAGAGTTTACAACCTTTAAGGCTAAATCTGGTATAAACTACCAATTTGAAACTAGACTTCGTA : 121
341/05 : ATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGTTTGATATTACCGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTTGGTACAAATACCTTTTGAAACTAGACTTCGTA : 121
119/08 : ATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGTTTGATATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTTGGTACAAATACCTTTTGAAACTAGACTTCGTA : 121
430/07 : ATGCTAAACTTGGTCTCTTTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGTTTGATATCAGTGTTTACAAGTTTAAAGCTAAATTTTGGTACAAATACCTTTTGAAACTAGACTTCGTA : 121
174/06 : ATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGTTTGATATTACTGTTTACAAGTTCAAAGCTAAATTTTGGTACAAATACCTTTTGAAACTAGACTTCGTA : 121
CB/05  : ATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGTTTGATAT-----TACCTTTTGAAACTAGACTTCCTA : 83
NA/09  : ATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGTTTGATATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTTGGTACAAATACCTTTTGAAACTAGACTTCGTA : 121
66/09  : ATGCTAAACTTGGTCTCTTTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGTTTGATATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTTGGTACAAATACCTTTTGAAACTAGACTTCGTA : 121
68/09  : ATGCTAAACTTGGTCTCTCTATTATTGAAGAAGTCAATAGTCATACAGTTGTTTGATATTACTGTTTATAAGTTTAAAGCTAAATTTTGGTACAAATACCTTTTGAAACTAGACTTCGTA : 121
1-71   : ATGCTAAACTTGGTCTCTCCATTATTGAAGAAGTCAATA-----TTGGTATAAATACCTTTTGAAACTAGACTTCGTA : 74
      ATGCTAAACTTGGTctCTctATTaTTGAAGAAGTCAATAgtcatacagttgtttgatatac gttta aa tt aa gc aaat ttggtta aaatTACctTTTGAAACTAGACTTCgTA

      *      140      *      160      *      180      *      200      *
INSAVC : TCATTAACAACACAAAACCTAAAGCATTAAAGTGCTACAAAACAAGTAAAGAGAGATTATAGAAAAACTGCCATTCTAAATTCATGAGAAAATGA : 216
BGF10  : TCATCGAACAAAACAAAACCTAAAGCATTAAAGTGTTACAAAACAAGCAAGACAGATTATAGAAAAACTGCCATTCTAAATTCATGCGAAAATGA : 216
23/03  : TCATTAAAAATACAAAACCTAAAACATTAAAGTGTGTGTA AAAACA TAAGAAGAAGGATTATAGAAAAATCGCCATTCTAAACGCAACCGCGAAAATGA : 216
341/05 : TCATCGAACAAAACAAAACCTAAAGCATTAAAGTGCTACAAAACAATCAAAGAGAGATTATAGAAAAATGCCATTCTAAATTCATGAGAAAATGA : 216
119/08 : TCATCGAACAAAACAAAACCTAAAGCATTAAAGTGCTACAAAACAATCAAAGAGAGATTATAGAAAAATGCCATTCTAAATTCATGAGAAAATGA : 216
430/07 : TCATCGAACAAAACAAAACCTAAAGCATTAAAGTGCTACAAAACAATCAAAGAGAGATTATAGAAAAATGCCATTCTAAATTCATGAGAAAATGA : 216
174/06 : TCATCGAACAAAACAAAACCTAAAGCATTAAAGTGCTACAAAACAATCAAAGAGAGATTATAGAAAAATGCCATTCTAAATTCATGAGAAAATGA : 216
CB/05  : TCATCGAACAAAACAAAACCTAAAGCATTAAAGTGCTACAAAACAATCAAAGAGAGATTATAGAAAAATGCCATTCTAAATTCATGAGAAAATGA : 178
NA/09  : TCATCGAACAAAACAAAACCTAAAGCATTAAAGTGCTACAAAACAATCAAAGAGAGATTATAGAAAAATGCCATTCTAAATTCATGAGAAAATGA : 216
66/09  : TCATCGAACAAAACAAAACCTAAAGCATTAAAGTGCTACAAAACAATCAAAGAGAGATTATAGAAAAATGCCATTCTAAATTCATGAGAAAATGA : 216
68/09  : TCATCGAACAAAACAAAACCTAAAGCATTAAAGTGCTACAAAACAATCAAAGAGAGATTATAGAAAAATGCCATTCTAAATTCATGAGAAAATGA : 216
1-71   : TCATTAACAACACAAAACCTAAAGCATTAAAGTGTGTGTA AAAACA AAGCAAGAGAGATTATAGAAAAACTGCCATTCTAAATTCATGCGAAAATGA : 169
      TCAT AACa ACAAAAACCTAAAGCATTAAAGTG TacAAAACAa aAGAGaGATTATAGaAAAA tGCCATTcTAAAttCcAtG GAA1AAATGA

```

Εικόνα 8. Πολλαπλή στοίχιση του ORF3b των ελληνικών και διεθνών στελεχών. Διακρίνονται οι απαλείψεις νουκλεοτιδίων στα στελέχη του CCoVIIa CB/05 και 1-71. Στο ορθογώνιο επισημαίνεται το κωδικόνιο έναρξης του ORF3c.

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *      12
NA/09 : ATGATTGGTGGACTTTTTCTTAACACTCTGAGTTTTGTAATTGTTAGCAACCATGTCATTGTTAATAATACAGCAAATGTGCATTCTACACACACGAACATGTTATAGTACAACAGCA : 119
CB/05 : ATGATTGGTGGACTTTTTCTTAACACTCTGAGTTTTGTAATTGTTAGCAACCATGTCATTGTTAATAATACAGCAAATGTGCATTCTACACACACGAACATGTTATAGTACAACAGCA : 119
66/09 : ATGATTGGTGGACTTTTTCTTAACACTCTGAGTTTTGTAATTGTTAGCAACCATGTCATTGTTAATAATACAGCAAATGTGCATTCTACACACACGAACATGTTATAGTACAACAGCA : 119
68/09 : ATGATTGGTGGACTTTTTCTTAACACTCTGAGTTTTGTAATTGTTAGCAACCATGTCATTGTTAATAATACAGCAAATGTGCATTCTACACACACGAACATGTTATAGTACAACAGCA : 119
341/05 : ATGATTGGTGGACTTTTTCTTAACACTCTGAGTTTTGTAATTGTTAGCAACCATGTCATTGTTAATAATACAGCAAATGTGCATTCTACACACACGAACATGTTATAGTACAACAGCA : 119
119/08 : ATGATTGGTGGACTTTTTCTTAACACTCTGAGTTTTGTAATTGTTAGCAACCATGTCATTGTTAATAATACAGCAAATGTGCATTCTACACACACGAACATGTTATAGTACAACAGCA : 119
430/07 : ATGATTGGTGGACTTTTTCTTAACACTCTGAGTTTTGTAATTGTTAGCAACCATGTCATTGTTAATAATACAGCAAATGTGCATTCTACACACACGAACATGTTATAGTACAACAGCA : 119
174/06 : ATGATTGGTGGACTTTTTCTTAACACTCTGAGTTTTGTAATTGTTAGCAACCATGTCATTGTTAATAATACAGCAAATGTGCATTCTACACACACGAACATGTTATAGTACAACAGCA : 119
      ATGATTGGTGGACTTTTTCTTAACACTCTGAGTTTTGTAATTGTTAGCAACCATGTCATTGTTAATAATACAGCAAATGTGCATTCTACACACACGAACATGTTATAGTACAACAGCA

      0      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220      *      2
NA/09 : TCAGGTTGTTAGTGCTAGAACAACAAAATTACTACCCAGAGTTCAGCATCGCTGTAAGTCTTTGTATTATTTCTAGCTTTGTACCGTAGTACAAACTTTAAGACGTGTGTCCGGTATCTTAA : 238
CB/05 : TCAGGTTGTTAGTGCTAGAACAACAAAATTACTACCCAGAGTTCAGCATCGCTGTAAGTCTTTGTATTATTTCTAGCTTTGTACCGTAGTACAAACTTTAAGACGTGTGTCCGGTATCTTAA : 238
66/09 : TCAGGTTGTTAGTGCTAGAACAACAAAATTACTACCCAGAGTTCAGCATCGCTGTAAGTCTTTGTATTATTTCTAGCTTTGTACCGTAGTACAAACTTTAAGACGTGTGTCCGGTATCTTAA : 238
68/09 : TCAGGTTGTTAGTGCTAGAACAACAAAATTACTACCCAGAGTTCAGCATCGCTGTAAGTCTTTGTATTATTTCTAGCTTTGTACCGTAGTACAAACTTTAAGACGTGTGTCCGGTATCTTAA : 238
341/05 : TCAGGTTGTTAGTGCTAGAACAACAAAATTACTACCCAGAGTTCAGCATCGCTGTAAGTCTTTGTATTATTTCTAGCTTTGTACCGTAGTACAAACTTTAAGACGTGTGTCCGGTATCTTAA : 238
119/08 : TCAGGTTGTTAGTGCTAGAACAACAAAATTACTACCCAGAGTTCAGCATCGCTGTAAGTCTTTGTATTATTTCTAGCTTTGTACCGTAGTACAAACTTTAAGACGTGTGTCCGGTATCTTAA : 238
430/07 : TCAGGTTGTTAGTGCTAGAACAACAAAATTACTACCCAGAGTTCAGCATCGCTGTAAGTCTTTGTATTATTTCTAGCTTTGTACCGTAGTACAAACTTTAAGACGTGTGTCCGGTATCTTAA : 238
174/06 : TCAGGTTGTTAGTGCTAGAACAACAAAATTACTATTCAGAGTTCAGCATCGCTGTAAGTCTTTGTATTATTTCTAGCTTTGTACCGTAGTACAAACTTTAAGACGTGTGTCCGGTATCTTAA : 238
      TCAGGTTGTTAGTGCTAGAACAACAAAATTACTATTCAGAGTTCAGCATCGCTGTAAGTCTTTGTATTATTTCTAGCTTTGTACCGTAGTACAAACTTTAAGACGTGTGTCCGGTATCTTAA

      40      *      260      *      280      *      300      *      320      *      340      *
NA/09 : TGTTTAAGATTGTATCAATGACACTTATAGGCCTATGCTTATAGCATATGGTTACTACATTGATGGCATTGTTACAACAACACTGCTTAGCTTTAAGATTTGTCTACTTATCATACTTT : 357
CB/05 : TGTTTAAGATTGTATCAATGACACTTATAGGCCTATGCTTATAGCATATGGTTACTACATTGATGGCATTGTTACAACAACACTGCTTAGCTTTAAGATTTGTCTACTTATCATACTTT : 357
66/09 : TGTTTAAGATTGTATCAATGACACTTATAGGCCTATGCTTATAGCATATGGTTACTACATTGATGGCATTGTTACAACAACACTGCTTAGCTTTAAGATTTGTCTACTTATCATACTTT : 357
68/09 : TGTTTAAGATTGTATCAATGACACTTATAGGCCTATGCTTATAGCATATGGTTACTACATTGATGGCATTGTTACAACAACACTGCTTAGCTTTAAGATTTGTCTACTTATCATACTTT : 357
341/05 : TGTTTAAGATTGTATCAATGACACTTATAGGCCTATGCTTATAGCATATGGTTACTACATTGATGGCATTGTTACAACAACACTGCTTAGCTTTAAGATTTGTCTACTTATCATACTTT : 357
119/08 : TGTTTAAGATTGTATCAATGACACTTATAGGCCTATGCTTATAGCATATGGTTACTACATTGATGGCATTGTTACAACAACACTGCTTAGCTTTAAGATTTGTCTACTTATCATACTTT : 357
430/07 : TGTTTAAGATTGTATCAATGACACTTATAGGCCTATGCTTATAGCATATGGTTACTACATTGATGGCATTGTTACAACAACACTGCTTAGCTTTAAGATTTGTCTACTTATCATACTTT : 357
174/06 : TGTTTAAGATTGTATCAATGACACTTATAGGCCTATGCTTATAGCATATGGTTACTACATTGATGGCATTGTTACAACAACACTGCTTAGCTTTAAGATTTGTCTACTTATCATACTTT : 357
      TGTTTAAGATTGTATCAATGACACTTATAGGCCTATGCTTATAGCATATGGTTACTACATTGATGGCATTGTTACAACAACACTGCTTAGCTTTAAGATTTGTCTACTTATCATACTTT

```

Εικόνα 9. ORF3c, συνέχεια στην πίσω σελίδα.

```

360      *      380      *      400      *      420      *      440      *      460      *
NA/09 : TGGTATGTTAATAGTAGGTTTGAATTCATCTTATACAATACAACGACACTTATGTTTGTACATGGCAGAGCTGCACCGTTTATGAGAAGTTCTCACAGCTCTATTTATGTCACATTGTA : 476
CB/05 : TGGTATGTTAATAGTAGGTTTGAATTCATCTTATACAATACAACGACACTCATGTTTGTACATGGCAGAGCTGCACCGTTTATGAGAAGTTCTCACAGCTCTATTTATGTCACATTGTA : 476
66/09 : TGGTATGTTAATAGTAGGTTTGAATTCATCTTATACAATACAACGACACTCATGTTTGTACATGGCAGAGCTGCACCGTTTATGAGAAGTTCTCACAGCTCTATTTATGTCACATTGTA : 476
68/09 : TGGTATGTTAATAGTAGGTTTGAATTCATCTTATACAATACAACGACACTCATGTTTGTACATGGCAGAGCTGCACCGTTTATGAGAAGTTCTCACAGCTCTATTTATGTCACATTGTA : 476
341/05 : TGGTATGTTAATAGTAGGTTTGAATTCATCTTATACAATACAACGACACTCATGTTTGTACATGGCAGAGCTGCACCGTTTATGAGAAGTTCTCACAGCTCTATTTATGTCACATTGTA : 476
119/08 : TGGTATGTTAATAGTAGGTTTGAATTCATCTTATACAATACAACGACACTCATGTTTGTACATGGCAGAGCTGCACCGTTTATGAGAAGTTCTCACAGCTCTATTTATGTCACATTGTA : 476
430/07 : TGGTATGTTAATAGTAGGTTTGAATTCATCTTATACAATACAACGACACTCATGTTTGTACATGGCAGAGCTGCACCGTTTATGAGAAGTTCTCACAGCTCTATTTATGTCACATTGTA : 476
174/06 : TGGTATGTTAATAGTAGGTTTGAATTCATCTTATACAATACAACGACACTCATGTTTGTACATGGCAGAGCTGCACCGTTTATGAGAAGTTCTCACAGCTCTATTTATGTCACATTGTA : 476
TGGTATGTTAATAGTAGGTTTGAATTCATCTTATACAATACAACGACACTCATGTTTGTACATGGCAGAGCTGCACCGTTTATGAGAAGTTCTCACAGCTCTATTTATGTCACATTGTA

480      *      500      *      520      *      540      *      560      *      580      *
NA/09 : CCGTGGCATAAATTATATGTTTGTGAATGACCTCACGTTGCATTTTGTAGACCCTATGCTTGAAGCATAGCAATACGTGGCTTAGCTCATGCTGATCTAACTGTTGTTAGAGCAGTTG : 595
CB/05 : CCGTGGCATAAATTATATGTTTGTGAATGACCTCACGTTGCATTTTGTAGACCCTATGCTTGAAGCATAGCAATACGTGGCTTAGCTCATGCTGATCTAACTGTTGTTAGAGCAGTTG : 595
66/09 : CCGTGGCATAAATTATATGTTTGTGAATGACCTCACGTTGCATTTTGTAGACCCTATGCTTGAAGCATAGCAATACGTGGCTTAGCTCATGCTGATCTAACTGTTGTTAGAGCAGTTG : 595
68/09 : CCGTGGCATAAATTATATGTTTGTGAATGACCTCACGTTGCATTTTGTAGACCCTATGCTTGAAGCATAGCAATACGTGGCTTAGCTCATGCTGATCTAACTGTTGTTAGAGCAGTTG : 595
341/05 : CCGTGGCATAAATTATATGTTTGTGAATGACCTCACGTTGCATTTTGTAGACCCTATGCTTGAAGCATAGCAATACGTGGCTTAGCTCATGCTGATCTAACTGTTGTTAGAGCAGTTG : 595
119/08 : CCGTGGCATAAATTATATGTTTGTGAATGACCTCACGTTGCATTTTGTAGACCCTATGCTTGAAGCATAGCAATACGTGGCTTAGCTCATGCTGATCTAACTGTTGTTAGAGCAGTTG : 595
430/07 : CCGTGGCATAAATTATATGTTTGTGAATGACCTCACGTTGCATTTTGTAGACCCTATGCTTGAAGCATAGCAATACGTGGCTTAGCTCATGCTGATCTAACTGTTGTTAGAGCAGTTG : 595
174/06 : CCGTGGCATAAATTATATGTTTGTGAATGACCTCACGTTGCATTTTGTAGACCCTATGCTTGAAGCATAGCAATACGTGGCTTAGCTCATGCTGATCTAACTGTTGTTAGAGCAGTTG : 595
CGGTGGCATAAATTATATGTTTGTGAATGACCTCACGTTGCATTTTGTAGACCCTATGCTTGAAGCATAGCAATACGTGGCTTAGCTCATGCTGATCTAACTGTTGTTAGAGCAGTTG

600      *      620      *      640      *      660      *      680      *      700      *
NA/09 : AACTTCTCAATGGTGATTTTATCTATGTATTTTACAGGAGCCCAGTAGTCGGTGTTTACAATGCAGCCTTTTCTCAGGCGGTTCTAAACGAAATTGACTTAAAAGAAGAAGAAGAGAC : 714
CB/05 : AACTTCTCAATGGTGATTTTATCTATGTATTTTACAGGAGCCCAGTAGTCGGTGTTTACAATGCAGCCTTTTCTCAGGCGGTTCTAAACGAAATTGACTTAAAAGAAGAAGAAGAGAC : 714
66/09 : AACTTCTCAATGGTGATTTTATCTATGTATTTTACAGGAGCCCAGTAGTCGGTGTTTACAATGCAGCCTTTTCTCAGGCGGTTCTAAACGAAATTGACTTAAAAGAAGAAGAAGAGAC : 714
68/09 : AACTTCTCAATGGTGATTTTATCTATGTATTTTACAGGAGCCCAGTAGTCGGTGTTTACAATGCAGCCTTTTCTCAGGCGGTTCTAAACGAAATTGACTTAAAAGAAGAAGAAGAGAC : 714
341/05 : AACTTCTCAATGGTGATTTTATCTATGTATTTTACAGGAGCCCAGTAGTCGGTGTTTACAATGCAGCCTTTTCTCAGGCGGTTCTAAACGAAATTGACTTAAAAGAAGAAGAAGAGAC : 714
119/08 : AACTTCTCAATGGTGATTTTATCTATGTATTTTACAGGAGCCCAGTAGTCGGTGTTTACAATGCAGCCTTTTCTCAGGCGGTTCTAAACGAAATTGACTTAAAAGAAGAAGAAGAGAC : 714
430/07 : AACTTCTCAATGGTGATTTTATCTATGTATTTTACAGGAGCCCAGTAGTCGGTGTTTACAATGCAGCCTTTTCTCAGGCGGTTCTAAACGAAATTGACTTAAAAGAAGAAGAAGAGAC : 714
174/06 : AACTTCTCAATGGTGATTTTATCTATGTATTTTACAGGAGCCCAGTAGTCGGTGTTTACAATGCAGCCTTTTCTCAGGCGGTTCTAAACGAAATTGACTTAAAAGAAGAAGAAGAGAC : 714
AACTTCTCAATGGTGATTTTATCTATGTATTTTACAGGAGCCCAGTAGTCGGTGTTTACAATGCAGCCTTTTCTCAGGCGGTTCTAAACGAAATTGACTTAAAAGAAGAAGAAGAGAC

```

Εικόνα 9. ORF3c, συνέχεια στην πίσω σελίδα.

```

          720          *
NA/09 : CATACCTATGACGTTCCCTAG : 735
CB/05 : CATACCTATGACGTTCCCTAG : 735
66/09 : CATACCTATGACGTTCCCTAG : 735
68/09 : CATACCTATGACGTTCCCTAG : 735
341/05 : CATACCTATGACGTTCCCTAG : 735
119/08 : CATACCTATGACGTTCCCTAG : 735
430/07 : CACACCTATGACGTTCCCTAG : 735
174/06 : CATACCTATGACGTTCCCTAG : 735
          CATACCTATGACGTTCCCTAG

```

Εικόνα 9. Πολλαπλή στοίχιση του ORF3c των ελληνικών στελεχών NA/09, 66/09 και 68/09, που ανιχνεύτηκαν στα όργανα των σκύλων, με τα στελέχη αναφοράς που επίσης ανιχνεύτηκαν σε όργανα σκύλων.

Πίνακας 6. Ποσοστά ομοιότητας σε επίπεδο αμινοξέων της πρωτεΐνης E των ελληνικών στελεχών που ανιχνεύτηκαν στα όργανα με διεθνή στελέχη αναφοράς.

Seq-> NA/09 66/09 68/09	NA/09 ID	66/09 1 ID	68/09 0,987 ID
CCoVIIa/INSAVC/D13096	0,951	0,951	0,939
CCoVIIa/1-71/EF056487	0,963	0,963	0,963
CCoVIIa/BGF10/AY342160	0,878	0,878	0,865
CCoVIIa/CB/05/DQ112226	1	1	0,987
CCoVI/23/03/ AY426984	0,865	0,865	0,865
CCoVI/Elmo/02/AY426983	0,853	0,853	0,853
FCoVI/Black/EU186072	0,78	0,78	0,78
FCoVII/79-1146/NC007025	0,78	0,78	0,78
CCoVIIb/341/05/EU856361	1	1	0,987
CCoVIIb/119/08/EU924791	1	1	0,987
CCoVIIb/430/07/EU924790	0,914	0,914	0,914
CCoVIIb/174/06/EU856362	0,975	0,975	0,963
TGEV/TS/DQ201447	0,975	0,975	0,963
TGEV/Purdue/NC002306	0,963	0,963	0,951

Πίνακας 7. Ποσοστά ομοιότητας σε επίπεδο αμινοξέων της πρωτεΐνης Μ των ελληνικών στελεχών που ανιχνεύτηκαν στα όργανα με διεθνή στελέχη αναφοράς.

Seq-> NA/09 66/09 68/09	NA/09 ID	66/09 ID	68/09 ID
CCoVIIa/CB/05/DQ112226	0,992	0,942	0,996
CCoVIIa/INSAVC/D13096	0,904	0,896	0,904
CCoVIIa/BGF10/AY342160	0,901	0,889	0,901
CCoVI/23/03/AY548235	0,886	0,863	0,886
FCoVI/Black/EU186072	0,836	0,817	0,836
CCoVIIb/341/05/EU856361	0,954	0,973	0,954
CCoVIIb/119/08/EU924791	0,996	0,946	1
CCoVIIb/430/07/EU924790	0,996	0,946	1
CCoVIIb/174/06/EU856362	0,958	0,976	0,958
FCoVII/79-1146/NC007025	0,836	0,836	0,836
TGEV Purdue/NC002306	0,95	0,916	0,95
TGEV/TS/DQ201447	0,938	0,916	0,938
CCoVIIa/1-71/AY704916	0,973	0,935	0,977

```

      *          20          *          40          *          60          *          80          *          100          *          120
NA/09 : M-KILLVLACAIACACGERYCAMKSDSDTSCRNSTTDCESCFNGGDLIWHLANWNPSWSVILLVFIITVLQYGRPQPSWFFVYGIKMLIMWLLWPIVLALTIFNAYSEYEVSRYVMFGFS : 118
CB/05 : M-KILLVLACAIACACGERYCAMKSDSDTSCRNSTTDCESCFNGGDLIWHLANWNPSWSVILLVFIITVLQYGRPQPSWFFVYGIKMLIMWLLWPIVLALTIFNAYSEYEVSRYVMFGFS : 118
1-71 : MK-KILLVLACAIACACGERYCAMRSDSETSCRNSTATDCESCFNGGDLIWHLANWNPSWSIILLVFIITVLQYGRPQPSWFFVYGIKMLIMWLLWPIVLALTIFNAYSEYEVSRYVMFGFS : 118
INSAVC : MKKILLVLACAIACVYGERYCAMT-ESSTSCRNSTAGNCASCEPTEGDLIWHLANWNPSWSVILLIIFIITVLQYGRPQPSWFFVCGIKMLIMWLLWPIVLALTIFNAYLEYEVSRYVMFGFS : 118
BGF10 : MKKIVLLLACAIACVYGENYCAMNSTAQTSCLLISGS-VCALCFEGGDLVWHLANWNPSWSVILLVFIITVLQYGRPQPSWFFVYGVKMLIMWLLWPIVLALTIFNAYSEYEVSRYVMFGFS : 118
66/09 : M-KILLVLACAIACVYGERYCAMQ-EHGISCRNSTN-DCESCFNGGDLIWHLANWNP SWSVILLVFIITVLQYGRPQPSWFFVYGIKMLIMWLLWPIVLALTIFNAYSEYEVSRYVMFGER : 116
68/09 : M-KILLVLACAIACACGERYCAMKSDSDTSCRNSTTDCESCFNGGDLIWHLANWNPSWSVILLVFIITVLQYGRPQPSWFFVYGIKMLIMWLLWPIVLALTIFNAYSEYEVSRYVMFGFS : 118
341/05 : M-KILLVLACAIACVYGERYCAMQ-EHGLSCRNSTN-VCESCFNGGDLIWHLANWNP SWSVILLVFIITVLQYGRPQPSWFFVYGVKMLIMWLLWPIVLALTIFNAYSEYEVSRYVMFGFS : 116
119/08 : M-KILLVLACAIACACGERYCAMKSDSDTSCRNSTTDCESCFNGGDLIWHLANWNPSWSVILLVFIITVLQYGRPQPSWFFVYGIKMLIMWLLWPIVLALTIFNAYSEYEVSRYVMFGFS : 118
430/07 : M-KILLVLACAIACACGERYCAMKSDSDTSCRNSTTDCESCFNGGDLIWHLANWNPSWSVILLVFIITVLQYGRPQPSWFFVYGIKMLIMWLLWPIVLALTIFNAYSEYEVSRYVMFGFS : 118
174/06 : M-KILLVLACAIACVYGERYCAMQ-EHGLSCRNSTN-DCESCFNGGDLIWHLANWNP SWSIILLVFIITVLQYGRPQPSWFFVYGIKMLIMWLLWPIVLALTIFNAYSEYEVSRYVMFGFS : 116
      M k6L16LACaIAC GERYCAM SCRnst CesCFngDL6WHLANWNP SWS6ILI6FITVLQYGRPQPSWFFVYG6KMLIMWLLWPIVLALTIFNAYSEYEVSRYVMFGFS

      0          *          140          *          160          *          180          *          200          *          220          *          240
NA/09 : VAGAIVTFILWIMYFVRSIQLYRRTKSWWSEFNPETNAILCVSALGRSYVLEPLGVPTGVTLTLLSGNLYAEGFKIAGGMNIDNLPKYVMVALPSRTIVYTLVGKKLKASSATGWAYYVK : 237
CB/05 : VAGAIVTFILWIMYFVRSIQLYRRTKSWWSEFNPETNAILCVSALGRSYVLEPLGVPTGVTLTLLSGNLYAEGFKIAGGMNIDNLPKYVMVALPSRTIVYTLVGKKLKASSATGWAYYVK : 237
1-71 : VAGAIVTFILWIMYFIRSIQLYRRTKSWWSEFNPETNAILCVSALGRSYVLEPLGVPTGVTLTLLSGNLYAEGFKIAGGMNIDNLPKYVMVALPSRTIVYTLVGKKLKASSATGWAYYVK : 237
INSAVC : VAGAIVTFILWIMYFVRSIQLYRRTKSWWSEFNPETNAILCVSALGRSYVLEPLGVPTGVTLTLLSGNLYAEGFKIAGGMNIDNLPKYVMVALPSRTIVYTLVGKKLKASSATGWAYYVK : 237
BGF10 : VAGAIVTFILWIMYFVRSIQLYRRTKSWWSEFNPETNAILCVSALGRSYVLEPLGVPTGVTLTLLSGNLYAEGFKIAGGMNIDNLPKYVMVALPSRTIVYTLVGKKLKASSATGWAYYVK : 237
66/09 : VAGSIVTFILWIMYFVRSIQLYRRTKSWWSEFNPETNAILCVSALGRSYVLEPLGVPTGVTLTLLSGNLYAEGFKIAGGMNIDNLPKYVMVALPSRTIVYTLVGKKLKASSATGWAYYVK : 235
68/09 : VAGAIVTFILWIMYFVRSIQLYRRTKSWWSEFNPETNAILCVSALGRSYVLEPLGVPTGVTLTLLSGNLYAEGFKIAGGMNIDNLPKYVMVALPSRTIVYTLVGKKLKASSATGWAYYVK : 237
341/05 : VAGAIVTFILWIMYFVRSIQLYRRTKSWWSEFNPETNAILCVSALGRSYVLEPLGVPTGVTLTLLSGNLYAEGFKIAGGMNIDNLPKYVMVALPSRTIVYTLVGKKLKASSATGWAYYVK : 235
119/08 : VAGAIVTFILWIMYFVRSIQLYRRTKSWWSEFNPETNAILCVSALGRSYVLEPLGVPTGVTLTLLSGNLYAEGFKIAGGMNIDNLPKYVMVALPSRTIVYTLVGKKLKASSATGWAYYVK : 237
430/07 : VAGAIVTFILWIMYFVRSIQLYRRTKSWWSEFNPETNAILCVSALGRSYVLEPLGVPTGVTLTLLSGNLYAEGFKIAGGMNIDNLPKYVMVALPSRTIVYTLVGKKLKASSATGWAYYVK : 237
174/06 : VAGAIVTFILWIMYF6RSIQLYRRTKSWWSEFNPETNAILCVSALGRSYVLEPLGVPTGVTLTLLSGNLYAEGFKIAGGMNIDNLPKYVMVALPSRTIVYTLVGKKLKASSATGWAYYVK : 235
      VAGAIVTFILWIMYF6RSIQLYRRTKSWWSEFNPETNAILCVSALGRSYVLEPLGVPTGVTLTLLSGNLYAEGFKIAGGMNIDNLPKYVMVALPSRTIVYTLVGKKLKASSATGWAYYVK

      40          *          260
NA/09 : SKAGDYSTDARTDNLSEQEKLLHMV : 262
CB/05 : SKAGDYSTDARTDNLSEQEKLLHMV : 262
1-71 : SKAGDYSTDARTDNLSEQEKLLHMV : 262
INSAVC : SKAGDYSTDARTDNLSEHEKLLHMV : 262
BGF10 : SKAGDYSTDARTDNLSEHEKLLHMV : 262
66/09 : SKAGDYSTDAREDNLCEQEKLLHMV : 260
68/09 : SKAGDYSTDARTDNLSEQEKLLHMV : 262
341/05 : SKAGDYSTDARTDNLSEQEKLLHMV : 260
119/08 : SKAGDYSTDARTDNLSEQEKLLHMV : 262
430/07 : SKAGDYSTDARTDNLSEQEKLLHMV : 262
174/06 : SKAGDYSTDARTDNLSEQEKLLHMV : 262
      SKAGDYSTDARTDnLSEqEKLLHMV

```

Εικόνα 10. Πολλαπλή στοιχίση της πρωτεΐνης M στελεχών του CCoVII. Διακρίνεται η μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των CCoVIIa στελεχών (NA/09, CB/05) μεταξύ τους, καθώς και των CCoVIIb στελεχών (66/09, 68/09, 341/05, 119/08, 430/08) μεταξύ τους, στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη αναφοράς.

Πίνακας 8. Ποσοστά ομοιότητας σε επίπεδο αμινοξέων της πρωτεΐνης N των ελληνικών στελεχών που ανιχνεύτηκαν στα όργανα με διεθνή στελέχη αναφοράς.

Seq->	NA/09	66/09	68/09
NA/09	ID	0,984	0,992
66/09	0,984	ID	0,981
68/09	0,992	0,981	ID
CCoVIIa/CB/05/DQ112226	0,994	0,984	0,992
CCoVIIa/INSAVC/D13096	0,924	0,913	0,916
CCoVIIa/1-71/AB105373	0,989	0,979	0,986
CCoVIIa/BGF10/AY342160	0,931	0,921	0,924
CCoVI/23/03/AY548235	0,89	0,884	0,882
CCoVIIb/341/05/EU856361	0,994	0,984	0,992
CCoVIIb/119/08/EU924791	0,997	0,986	0,994
CCoVIIb/430/07/EU924790	0,981	0,971	0,979
CCoVIIb/174/06/EU856362	0,976	0,971	0,973
FCoVII/79-1146/NC007025	0,767	0,756	0,761
FCoVI/Black/EU186072	0,764	0,764	0,759
TGEV/Purdue/NC002306	0,955	0,95	0,952
TGEV/TS/DQ201447	0,952	0,947	0,95

Πίνακας 9. ORF7a. Ποσοστά ομοιότητας σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (δεξιά και πάνω από τη διαγώνιο ID) και αμινοξέων (αριστερά και κάτω από τη διαγώνιο ID) στελεχών του CCoV και του FCoV.

Seq->	NA/09	66/09	68/09	CCoVIIa/CB/05/ DQ112226	CCoVIIa/INSAVC/ D13096	CCoVIIa/1- 71/DQ401031	CCoVIIa/BGF10/ AY342160
NA/09	ID	0,996	0,993	0,99	0,947	0,957	0,954
66/09	1	ID	0,99	0,986	0,944	0,954	0,95
68/09	1	1	ID	0,983	0,941	0,95	0,947
CCoVIIa/CB/05/ DQ112226	1	1	1	ID	0,944	0,96	0,95
CCoVIIa/INSAVC/ D13096	0,95	0,95	0,95	0,95	ID	0,934	0,954
CCoVIIa/1- 71/DQ401031	1	1	1	1	0,95	ID	0,941
CCoVIIa/BGF10 /AY342160	0,96	0,96	0,96	0,96	0,93	0,96	ID
CCoVI/23/03 AY548235	0,94	0,94	0,94	0,94	0,92	0,94	0,92
FCoVI/Black/ EU186072	0,792	0,792	0,792	0,792	0,792	0,792	0,792
CCoVIIb/341/05 /EU856361	1	1	1	1	0,95	1	0,96
CCoVIIb/119/08 EU924791	0,99	0,99	0,99	0,99	0,94	0,99	0,95
CCoVIIb/430/07 /EU924790	1	1	1	1	0,95	1	0,96
CCoVIIb/174/06/ EU856362	1	1	1	1	0,95	1	0,96
FCoVII/79- 1146/NC007025	0,792	0,792	0,792	0,792	0,792	0,792	0,792

Πίνακας 9. ORF7a (συνέχεια).

Seq->	CCoVI/23/03 AY548235	FCoVI/Black/ EU186072	CCoVIIb/341/05/ EU856361	CCoVIIb/119/08/ EU924791	CCoVIIb/430/07/ EU924790	CCoVIIb/174/06/ EU856362	FCoVII/79- 1146/NC007025
NA/09	0,934	0,839	0,99	0,99	0,977	0,957	0,843
66/09	0,931	0,843	0,986	0,986	0,973	0,954	0,839
68/09	0,928	0,833	0,983	0,983	0,97	0,95	0,843
CCoVIIa/CB/05/ DQ112226	0,931	0,833	0,993	0,986	0,98	0,96	0,836
CCoVIIa/ INSAVC/D13096	0,921	0,824	0,944	0,938	0,947	0,941	0,827
CCoVIIa/1- 71/DQ401031	0,928	0,823	0,96	0,957	0,967	0,986	0,826
CCoVIIa/BGF10/ AY342160	0,928	0,83	0,95	0,947	0,954	0,947	0,833
CCoVI/23/03 AY548235	ID	0,859	0,931	0,928	0,937	0,928	0,859
FCoVI/Black/ EU186072	0,841	ID	0,83	0,833	0,83	0,823	0,96
CCoVIIb/341/05/ EU856361	0,94	0,792	ID	0,986	0,98	0,96	0,833
CCoVIIb/119/08/ EU924791	0,93	0,782	0,99	ID	0,973	0,957	0,836
CCoVIIb/430/07/ EU924790	0,94	0,792	1	0,99	ID	0,967	0,833
CCoVIIb/174/06/ EU856362	0,94	0,792	1	0,99	1	ID	0,833
FCoVII/79- 1146/NC007025	0,841	0,97	0,792	0,782	0,792	0,792	ID

Πίνακας 10. ORF7b. Ποσοστά ομοιότητας σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (δεξιά και πάνω από τη διαγώνιο ID) και αμινοξέων (αριστερά και κάτω από τη διαγώνιο ID) στελεχών του CCoV και του FCoV.

Seq->	NA/09	66/09	68/09	CCoVIIa/INSAV C/D13096	CCoVIIa/BGF10/ AY342160	CCoVI/23/03/AY 548235	FCoVI/Black/EU 186072
NA/09	ID	0,992	0,993	0,838	0,842	0,855	0,679
66/09	0,985	ID	0,992	0,836	0,844	0,853	0,676
68/09	1	0,985	ID	0,842	0,842	0,861	0,676
CCoVIIa/INSAV C/D13096	0,802	0,788	0,802	ID	0,925	0,886	0,676
CCoVIIa/BGF10/ AY342160	0,807	0,802	0,807	0,887	ID	0,878	0,671
CCoVI/23/03/AY 548235	0,826	0,816	0,826	0,793	0,784	ID	0,688
FCoVI/Black/EU 186072	0,582	0,577	0,582	0,563	0,563	0,596	ID
CCoVIIb/341/05/ EU856361	0,751	0,741	0,751	0,624	0,615	0,624	0,419
CCoVIIb/119/08/ EU924791	0,981	0,976	0,981	0,793	0,798	0,821	0,582
CCoVIIb/430/07/ EU924790	0,92	0,915	0,92	0,793	0,798	0,821	0,582
CCoVIIb/174/06/ EU856362	0,976	0,962	0,976	0,788	0,793	0,812	0,586
FCoVII/79- 1146/NC007025	0,568	0,563	0,568	0,544	0,568	0,577	0,888
CCoVIIa/CB/05/ DQ112226	0,976	0,962	0,976	0,793	0,798	0,816	0,572
CCoVIIa/1- 71/DQ401031	0,967	0,953	0,967	0,788	0,788	0,807	0,596

Πίνακας 10. ORF7b (συνέχεια).

Seq->	CCoVIIb/341/05/ EU856361	CCoVIIb/119/08/ EU924791	CCoVIIb/430/07 /EU924790	CCoVIIb/174/06/ EU856362	FCoVII/79-1146/ NCO
NA/09	0,746	0,978	0,933	0,984	0,677
66/09	0,746	0,979	0,934	0,982	0,676
68/09	0,749	0,978	0,933	0,984	0,677
CCoVIIa/INSAVC/D13096	0,647	0,839	0,841	0,836	0,672
CCoVIIa/BGF10/AY342160	0,641	0,844	0,847	0,841	0,68
CCoVI/23/03/AY548235	0,649	0,858	0,859	0,853	0,683
FCoVI/Black/EU186072	0,502	0,679	0,68	0,68	0,888
CCoVIIb/341/05/EU856361	ID	0,735	0,705	0,744	0,5
CCoVIIb/119/08/EU924791	0,746	ID	0,929	0,971	0,677
CCoVIIb/430/07/EU924790	0,69	0,91	ID	0,926	0,677
CCoVIIb/174/06/EU856362	0,746	0,967	0,901	ID	0,676
FCoVII/79-1146/NC007025	0,41	0,568	0,568	0,572	ID
CCoVIIa/CB/05/DQ112226	0,741	0,976	0,901	0,962	0,568
CCoVIIa/1-71/ DQ401031	0,727	0,957	0,896	0,962	0,582

Βιογραφικό Σημείωμα Ντάφη Βασίλη

Προσωπικές Πληροφορίες

Εθνικότητα : Ελληνική

Τόπος γέννησης : Βόλος

Ημερομηνία γέννησης : 16/01/79

Σπουδές

1996

Αποφοίτηση από το 1^ο γενικό λύκειο Βόλου (19 κ 7/11) και εισαγωγή μετά από πανελλήνιες εξετάσεις στην Κτηνιατρική Σχολή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

21.03.2005

Αποφοίτηση από την Κτηνιατρική Σχολή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης με βαθμό 7,01/10. 2ος στη σειρά ορκωμοσίας.

Ιούνιος-Σεπτέμβριος 2005

Πρακτική άσκηση στο Εργαστήριο Ανατομίας και Φυσιολογίας
Αγροτικών Ζώων του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Γεωπονικού
Πανεπιστημίου Αθηνών

2005-06

Μεταπτυχιακές σπουδές. Παρακολούθηση μετά από εξετάσεις του
Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Ζωικής
Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με τίτλο
«Γενετική Βελτίωση, Αναπαραγωγή και Διατροφή Αγροτικών
Ζώων».

14/12/2006

Απονομή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην εξειδίκευση
«Αναπαραγωγή Αγροτικών Ζώων» με βαθμό 9.43/10. 1ος στη σειρά
ορκωμοσίας του του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

13.02.2007

Εγγραφή για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο
Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων του Γεωπονικού
Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα «Κοροναϊός του σκύλου.
Διερεύνηση της παρουσίας του στην Ελλάδα και μοριακός
χαρακτηρισμός του».

09/03/2007 – 09/06/2007

Εκπαίδευση σε διαγνωστικές μεθόδους για τον CCoV στο Department of Animal Health and Well-Being – section of Infectious Diseases – University of Bari. Πρόγραμμα SOCRATES/Erasmus.

05/04/2008 – 26/04/2008

Εκπαίδευση και συνεργασία με το Department of Animal Health and Well-Being – section of Infectious Diseases – University of Bari, με θέμα «Μοριακές τεχνικές διάγνωσης παρβοϊού και καλυκοϊού του σκύλου».

25/04/2009 – 9/05/2009

Εκπαίδευση και συνεργασία με το Department of Animal Health and Well-Being – section of Infectious Diseases – University of Bari, με θέμα «Μοριακές τεχνικές διάγνωσης εντερικού κοροναϊού του σκύλου».

Σεμινάρια

29/10/2007 - 9/11/2007

Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, Σύγχρονες μοριακές τεχνικές. Πρόγραμμα «Ανθρώπινα δίκτυα ερευνητικής και τεχνολογικής επιμόρφωσης – Β΄ κύκλος». Υπουργείο Ανάπτυξης, Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας.

15/10/2008-26/10/2008

Regional European Training Course on “The Early and Rapid Molecular Diagnosis of Highly Pathogenic Avian Influenza”, Joint FAO/IAEA Programme.

26/11/2008-29/11/2008

Σεμινάριο Ανοσολογίας, 22^{ος} Κύκλος, Προχωρημένα Μαθήματα Βασικής Ανοσολογίας, Athens Imperial Hotel, Αθήνα.

27/08/2009-31/08/2009

2009 Lectures in Biology, devoted to Immunology, Foundation for Research and Technology, Hellas, Crete, Greece.

Γλώσσες Αγγλικά (Cambridge-CPE, Michigan-ECPE)

Χρήση Η/Υ Γνώση χρήσης λειτουργικού συστήματος Windows XP

Γνώση χρήσης λογισμικού πακέτου Office

Βραβεία Υποτροφίες

3^ο Πανελλήνιο βραβείο Waltham (Αναφορά περιστατικού ιδιοπαθούς επιληψίας της γάτας), 13-01-2001.

Χρηματοδότηση Young Scientists'Support από το ίδρυμα Prof. Tielen Foundation (1-02-07), για συμμετοχή και ανακοίνωση στο XIII International Congress in Animal Hygiene.

Υποτροφία για διδακτορικές σπουδές στην Ελλάδα από το Κοινοφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης, διάρκειας 36 μηνών.

Χρηματοδότηση από το Onassis Public Benefit Foundation, για παρακολούθηση Διαλέξεων Ανοσολογίας, Ηράκλειο, 27-31 Ιουλίου 2009.

Εργασία σε Ερευνητικά Προγράμματα

Bio@gro 01/09/2006 έως 31/12/2006.

FARMA, χρηματοδότηση ΓΓΕΤ, 01/03/2007 έως 31/12/2007.

Διδακτικό Έργο

1. Συμμετοχή στο e-seminar του πιλοτικού προγράμματος της Forthnet Rural Wings, με σκοπό την εκπαίδευση εξ αποστάσεως κτηνοτρόφων. Γεράκι Ηρακλείου Κρήτης, 24 Ιανουαρίου 2008.
2. Συμμετοχή στο πρόγραμμα τηλεεκπαίδευσης των φοιτητών του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στο μάθημα Νοσήματα Αγροτικών Ζώων. <http://mediaserver.aua.gr/video/zoikis.php>.

3. Συμμετοχή στη διδασκαλία των εργαστηριακών ασκήσεων των μαθημάτων: Νοσήματα Αγροτικών Ζώων, Ανοσολογία, Βιοτεχνολογία Ζωικής Παραγωγής και Υγιεινή Αγροτικών Ζώων του Εργαστηρίου Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, από το Σεπτέμβριο του 2005 έως και το τρέχον Ακαδημαϊκό έτος.

Ανακοινώσεις σε συνέδρια και δημοσιεύσεις στα πρακτικά τους

1. Περιστατικό προσβολής είδους *Sparus autara* (L.) από ιό Noda σε ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες. Μπιτσαβά Κ., Φ. Αθανασοπούλου, Ε. Ξυλούρη – Φραγκιαδάκη, Μ. Παπαναστασοπούλου, Ο. Σαμπατάκου και **B. Ντάφης**. 10^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Πρακτικά σελ. 65, Αθήνα, 16-19 Φεβρουαρίου 2006.
2. Διερεύνηση της Τοξοπλάσμωσης ως αίτιο αποβολών σε βιολογικές εκτροφές αιγοπροβάτων στην Ελλάδα. **B. Ντάφης**, Ε. Ξυλούρη – Φραγκιαδάκη και Α. Διάκου. Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Σπάρτη, 4-5 Οκτωβρίου 2006.
3. Serological survey of antibodies against *Toxoplasma gondii* using ELISA in organic sheep and goat farms in Greece. **V. Ntafis**, E. Xylouri, A. Diakou, K. Sotirakoglou, I. Kritikos, E. Georgakilas and I. Menegatos. XIII International Congress in Animal Hygiene, Tartu, Estonia, 17-21 Ιουνίου 2007.
4. Serological survey of *Chlamydia abortus* and *Toxoplasma gondii* in organic sheep and goat farms in Greece. **Ntafis V.**, Kritikos I., Vretou E., Xylouri E.. COST 855 Working group meeting on Serology, Athens, Greece, 12/06/2008.

5. An outbreak of myxomatosis in Greek rabbit farms during 2007. Fragkiadaki Eir., Xylouri E., **Ntafis V.**, Sabatakou O., Plakocefalos E., Paraskevakou E. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, 10-13 June, 2008.
6. FARMA: A framework of livestock management based on RFID enabled mobile devices. A. Voulodimos, C. Patrikakos, A. Sideridis, **V. Ntafis** and E. Xylouri. 4th International Conference on Information and Communication Technologies in Bio and Earth Sciences (HAICTA 2008), Athens, 18-20 September 2008.
7. Χρήση RFID συστημάτων για τον έλεγχο της υγείας και βιοασφάλειας εκτροφών. **B. Ντάφης**, Χ. Πατρικάκης, Ε. Ξυλούρη και Α. Σιδερίδης. Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Άρτα, 15-17 Οκτωβρίου 2008.
8. Γρίπη των Ιπποειδών στην Ελλάδα. Μ. Μπουντούρη, **B. Ντάφης**, Χ. Πατρικάκης, Η. Πλακοκέφαλος, Ε. Ξυλούρη και Ε. Φραγκιαδάκη. Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Άρτα, 15-17 Οκτωβρίου 2008.
9. Απομόνωση, ταυτοποίηση και γενετική ανάλυση ιών γρίπης των ιπποειδών στην Ελλάδα. Μ. Μπουντούρη, Η. Πλακοκέφαλος, **B. Ντάφης**, Ε. Φραγκιαδάκη και Ε. Ξυλούρη – Φραγκιαδάκη. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας, Αθήνα, 20-22 Νοεμβρίου 2008.
10. Μοριακός χαρακτηρισμός του παρβοϊού τύπου 2 του σκύλου στην Ελλάδα. **B. Ντάφης**, Η. Πλακοκέφαλος, Ε. Ξυλούρη - Φραγκιαδάκη, Ι. Καλλή, Κ. Αδαμαμά-Μωραΐτου, Τ. Ράλλης, Θ. Κανέλλος, C. Desario και C. Buonavoglia. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας, Αθήνα, 20-22 Νοεμβρίου 2008.
11. Ανίχνευση κοροναϊού του σκύλου, σε σκύλους σε ελληνικό κυνοκομείο κατά το 2008. **B. Ντάφης**, Η. Πλακοκέφαλος, Σ. Δανίκα, Ε. Ξυλούρη - Φραγκιαδάκη, Θ. Κανέλλος, V. Mari, N. Decaro και C. Buonavoglia. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας, Αθήνα, 20-22 Νοεμβρίου 2008.
12. Molecular characterization of canine parvovirus type 2 circulating in Greece. **Ntafis V.**, Xylouri E., Kalli I., Adamama K., Rallis T., Kanellos T, Desario C. και Decaro N.. 8th International Congress of Veterinary Virology, Budapest, Hungary, 23-26 August 2009.

13. Έλεγχος των αντισωμάτων κατά του Bovine Herpes Virus 1 (BHV-1) σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Μπάτζιου Ρ., **Ντάφης Β.**, Οικονόμου Γ., Ξυλούρη Ε.. 25^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Ναύπλιο, 7-9 Οκτωβρίου 2009.
14. Διάρροια σχετιζόμενη με ροταϊό σε πώλους στην Ελλάδα. **Ντάφης Β.**, Φραγκιαδάκη Ε., Ξυλούρη Ε., Ομήρου Α., Lavazza Α. και Martella V.. 25^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Ναύπλιο, 7-9 Οκτωβρίου 2009.
15. Υγεία - Ευζωία μηρυκαστικών: προϋποθέσεις για παραγωγή ποιοτικών γαλακτοκομικών προϊόντων. «ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΣΤΗΝ ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΑΓΟΡΑ». Ξυλούρη-Φραγκιαδάκη Ε. και **Β. Ντάφης**. 2ο Φεστιβάλ γάλακτος και τυριού, 16-18 Οκτωβρίου 2009, ΟΛΠ, Πειραιάς.
16. *In vitro* καλλιέργεια ζωικών κυττάρων. Ξυλούρη, Ε. Ν. Πιτούλης, Ειρ. Φραγκιαδάκη, **Β. Ντάφης** και Δ. Καλογιάννης. 1^ο Συνέδριο Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Αθήνα, 16-18 Οκτωβρίου 2009, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
17. Ανίχνευση και μοριακός χαρακτηρισμός του κοροναϊού του σκύλου (CCoV) σε κουτάβια με οξεία διάρροια στην Ελλάδα. **Β. Ντάφης**, V. Mari, Ρ. Μπάτζιου, Α. Θώμας, Ν. Decaro, C. Buonavoglia και Ε. Ξυλούρη. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Ζώων Συντροφιάς, Αθήνα, 19-21 Μαρτίου 2010.
18. Συχνότητα εμφάνισης και χαρακτηρισμός του παρβοϊού τύπου 2 του σκύλου (CPV-2) στην Ελλάδα. **Β. Ντάφης**, Ε. Ξυλούρη, Ι. Καλλή, C. Desario και C. Buonavoglia. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Ζώων Συντροφιάς, Αθήνα, 19-21 Μαρτίου 2010.
19. Ανίχνευση του ροταϊού σε πουλάρια με διάρροια στην Ελλάδα. Ε. Φραγκιαδάκη, **Β. Ντάφης**, Ε. Ξυλούρη, Α. Ομήρου, Α. Lavazza και V. Martella. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Ζώων Συντροφιάς, Αθήνα, 19-21 Μαρτίου 2010.
20. Απομόνωση, ταυτοποίηση και γενετική ανάλυση του ιού της γρίπης των ιπποειδών H3N8 στην Ελλάδα. Μ. Μπουντούρη, Ε. Φραγκιαδάκη, **Β.**

- Ντάφης**, Μ. Φωτιάδης και Ε. Ξυλούρη. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Ζώων Συντροφιάς, Αθήνα, 19-21 Μαρτίου 2010.
21. Λοίμωξη από νοροϊό σε ελληνικό κυνοκομείο. **Β. Ντάφης**, Ε. Ξυλούρη, Α. Radogna, C. Buonavoglia και V. Martella. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Ζώων Συντροφιάς, Αθήνα, 19-21 Μαρτίου 2010.
22. An outbreak of norovirus infection in a kennel. **V. Ntafis**, E. Xylouri, A. Radogna, C. Buonavoglia και V. Martella. 4th European Congress of Virology, 7-11 April 2010, Como Lake, Italy.
23. CCoV systemic type II infection in a dog in Greece. **V. Ntafis**, V. Mari, E. Xylouri και C. Buonavoglia. 4th European Congress of Virology, 7-11 April 2010, Como Lake, Italy.

Παρακολουθήσεις συνεδρίων

1. 8^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό συνέδριο, Αθήνα, 25-28 Νοέμβρη 1999.
2. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Μικρών Ζώων, ΕΚΕ, Αθήνα 16-18 Μαρτίου 2001.
3. 9^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Θεσ/νίκη, 21-24 Νοεμβρίου 2002.
4. 10^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 16-19 Φεβρουαρίου 2006.
5. Υγεία και Ευζωία των Παραγωγικών Ζώων, Διεθνές συνέδριο, Αθήνα, 29-30 Μαρτίου 2006.
6. 22^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρίας, Σπάρτη, 4-6 Οκτωβρίου 2006.
7. XIII International Congress in Animal Hygiene, ISAH – 2007, Tartu, Estonia, 17-21 June 2007.
8. International Parvovirus Meeting, Monopoly, Italy, 27-28 September 2007.
9. 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών Ζώων, Υγιεινής-Ασφάλειας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης και Προστασίας του Καταναλωτή, Αθήνα, 16 Μαρτίου 2008.

10. Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας, Άρτα, 15-17 Οκτωβρίου 2008.
11. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας, Αθήνα, 20-22 Νοεμβρίου 2008.
12. 11^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 19-22 Μαρτίου 2009.
13. 8th International Congress of Veterinary Virology, Budapest, Hungary, 23-26 August 2009.
14. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Ζώων Συντροφιάς, Αθήνα, 19-21 Μαρτίου 2010.
15. 4th European Congress of Virology, 7-11 April 2010, Como Lake, Italy.

Εταιρίες

1. Μέλος της International Society of Animal Hygiene (ISAH), κατά την περίοδο 2007-2009.
2. Μέλος του Διοικητικού Συμβουλίου της Ελληνικής Εταιρείας Ιολογίας από το Νοέμβριο του 2008 και για 2 έτη.

Ερευνητικές Εργασίες

1. **Ντάφης Β.**, Ξυλούρη Ε., Διάκου Α., Σωτηράκογλου Κ., Κρητικός Ι., Γεωργακίλας Ε., Μενεγάτος Ι. (2007). Ανίχνευση αντισωμάτων κατά του *Toxoplasma gondii* σε βιολογικές εκτροφές αιγών και προβάτων. Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας, 58:22-33.
2. Voulodimos A., Patrikakis C., Sideridis A., **Ntafis V.**, Xylouri E. (2010). A complete farm management system based on animal identification using RFID technology. *Computers and Electronics in Agriculture*. 70: 380-388.
3. **Ntafis V.**, Mari V., Danika S., Fragkiadaki E., Buonavoglia C. (2010). An outbreak of Canine coronavirus in puppies in a Greek kennel. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22:320-323.

4. **Ntafis V.**, Fragkiadaki E., Xylouri E., Omirou A., Lavazza A., Martella V. (2010). Rotavirus-associated diarrhoea in foals in Greece. *Veterinary Microbiology*. In press.
5. **Ntafis V.**, Xylouri E., Kalli I., Desario C., Mari V., Decaro N., Buonavoglia C. (2010). Characterization of canine parvovirus type 2 (CPV-2) variants circulating in Greece. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(5). In press.

Βιβλία

1. Συγγραφή του κεφαλαίου: *RFID Application in Animal Monitoring*, **V. Ntafis**, C.Z. Patrikakis, E.G. Fragkiadaki, E.M. Xylouri-Fragkiadaki, για το βιβλίο: *The Internet of Things: From RFID to the Next-Generation Pervasive Networked Systems*, Auerbach Publications, 2008, ISBN: 9781420052817.