

Veterinarska fakulteta Univerze v *Ljubljani*

**MOLEKULARNA DETERMINACIJA IN EPIDEMIOLOGIJA VIRUSA
INFEKCIOSNE ANEMIJE KOPITARJEV**

**MOLECULAR DETERMINATION AND EPIDEMIOLOGY OF EQUINE
INFECTIOUS ANEMIA VIRUS**

Janja Završnik

Ljubljana, 2010

Veterinarska fakulteta Univerze v *Ljubljani*

UDK578:57.088:616.98:578.828lentivirus(043.2)

**MOLEKULARNA DETERMINACIJA IN EPIDEMIOLOGIJA VIRUSA
INFEKCIOSNE ANEMIJE KOPITARJEV**

**MOLECULAR DETERMINATION AND EPIDEMIOLOGY OF EQUINE
INFECTIOUS ANEMIA VIRUS**

Janja Završnik

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju
Prešernovih nagrad študentom pod mentorstvom doc. dr. Tadeja
Malovrha na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo

Ljubljana, 2010

1. POVZETEK

Ključne besede: Infektivna anemija kopitarjev - epidemiologija - Slovenije; virus infektivne anemije kopitarjev - genetika; verižna reakcija s polimerazo - metode; baze, zaporedje; sekvenčna analiza, DNA; konji

Virus infektivne anemije kopitarjev je RNA virus, ki sodi v družino *Retroviridae* in v rod *Lentivirus*. Povzroča doživljenjsko in neozdravljivo infektivno anemijo ali kužno malokrvnost pri kopitarjih. Glavne tarčne celice virusa IAK so tkivni makrofagi. Pri virusni replikaciji nastajajo različne genomske mutacije. Bolezen se prenaša s krvjo okuženih živali, ki jo lahko prenesajo tudi krvosesi insekti. Opisani so tudi redki primeri intrauterinoga prenosa.

Cilj te raziskovalne naloge je bil molekularno determinirati virus IAK, kar je prva takšna študija virusa IAK v Sloveniji. V ta namen smo v letu 2009 pridobili vzorce 25 serološko pozitivnih konj iz 12 rej. Od 14 živali smo pridobili kri z EDTA, iz katere smo izolirali tudi levkocite. Ker so bile serološko pozitivne živali v skladu s Pravilnikom o ukrepih za ugotavljanje, preprečevanje širjenja in zatiranje kužne malokrvnosti konj evtanazirane, smo *post mortem* pridobili vranice, od 5 brejih kobil pa tudi vranice plodov.

Iz ustrezno obdelanih vzorcev smo izolirali virusno nukleinsko kislino ter z molekularno metodo PCR pomnožili 285 nukleotidov dolg odsek virusnega genoma. PCR produkte smo dokazovali na agaroznem gelu z etidijevim bromidom. Izbrane PCR produkte smo očistili in poslali na sekvenciranje. Izpise sekvenčnih reakcij smo uredili in primerjali z referenčnimi sekvencami. Ugotovili smo, da je bila v vseh vranicah odraslih serološko pozitivnih živali prisotna virusna DNA, medtem ko je v vranicah plodov nismo našli. Virusno DNA smo izolirali le iz treh vzorcev krvi z EDTA in iz treh vzorcev levkocitov. Pri primerjavi nukleotidnih zaporedij smo ugotovili, da so nukleotidna zaporedja virusa IAK živali iz reje 1 popolnoma identične, medtem ko se nukleotidna zaporedja slovenskih virusnih izolatov živali iz drugih rej med sabo razlikujejo od 6,0 % do 11,1 %. Pri primerjavi nukleotidnih zaporedij izbranih izolatov iz genske banke smo ugotovili od 4,6 % do 14,3 % različnost.

SUMMARY

Key words: Equine infectious anemia - epidemiology - Slovenia; infectious anemia virus, equine - genetics; polymerase chain reaction - methods; base sequence; sequence analysis, DNA; horses

Equine infectious anemia virus (EIAV) is RNA virus, which belongs to the lentivirus subfamily of *Retroviridae*. EIAV causes a persistent and incurable equine infectious anemia or swamp fever. Main target cells of EIAV are macrophages. Different genomic mutations occur at viral replication.

The main source of infection for horses is blood of infected horses, which can be transferred by blood-feeding insects. Vertical in utero transmission is rare. The goal of this research is molecular determination of EIAV, which is the first study of EIAV of this sort in Slovenia. In 2009, we collected for EIAV samples of 25 seropositive horses from 12 herds. From 14 animals we got blood samples with EDTA from which we isolated peripheral blood leucocytes. Postmortem spleen tissues were received from 25 euthanized horses. We received also fetal spleen tissues from 5 pregnant mares. We isolated viral nucleic acid from prepared samples and amplified a 285 nucleotides long fragment of viral DNA. PCR products were visualized on agarose gel with ethidium bromide. Selected PCR products were purified and sequenced. Multiple alignments were created and sequences were compared with reference sequences.

Our research reveals that viral DNA was found in all spleen tissues from adult horses whereas there was no viral DNA in spleen from fetuses. Viral DNA was isolated only from three blood samples with EDTA and three samples of leucocytes.

Sequence analysis revealed that examined sequences of EIAV of animals from herd 1 are identical, whereas viral sequences of animals from other herds differ from each other are from 6,0 % to 11,1 %. In comparison with isolates from GenBank there was from 4,6 % to 14,3 % divergence in nucleotide sequences.

2. RAZLAGA KRATIC

AGID - agar gel imunodifuzijski test (angl. agar gel immunodiffusion)

bp- bazni par

CA - kapsida (angl. capsid)

CAEV - kozji artritis encefalitis virus (angl. caprine arthritis encephalitis virus)

cELISA - kompetitivna ELISA (angl. competitive ELISA)

CTL - citotoksični T limfocit

ddH₂O - deminilizirana in destilirana voda

DNA - deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)

dUTPaza - deoksiuridinska trifosfataza (angl. deoxyuridine triphosphatase - dUTPase)

EDTA - etilendiaminotetraocetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic acid)

ELISA - encimsko-vezani imunosorbentni test (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)

FIV -felini virus imunske pomanjkljivosti (angl. feline immunodeficiency virus)

HIV - virus humane imunske pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus)

HIV-1 - virus humane imunske pomanjkljivosti tipa 1 (angl. human immunodeficiency virus type 1)

IAK - infektivna anemija kopitarjev (angl. equine infectious anemia - EIA)

Kb - kilobaza

kDa - kilodalton

MA - matriks

mCTL - spominski CTL (angl. memory CTL)

mRNA - sporočilna RNA (angl messenger RNA)

MVV - maedi visna virus

MWS - raztopina za spiranje membrane (angl. membrane wash solution)

NC - nukleokapsida (angl. nucleokapsid)

NCBI - Nacionalni center biotehnoških informacij (angl. National Center for Biotechnology Information)

- NFW - voda prosta nukleazne aktivnosti (angl. nuclease free water)
- OIE - Mednarodni urad za kužne bolezni (fr. Office International des Epizooties)
- PBS - fosfatni pufer (angl. phosphate saline buffer)
- PCR - verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
- RCLB - pufer za lizo rdečih krvnih celic (angl. red cell lysis buffer)
- RNA - ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
- RT - reverzna transkriptaza (angl. reverse transcriptase)
- RT-PCR - reverzna transkripcija z verižno reakcijo s polimerazo
- SIV - virus opičje imunske pomanjkljivosti (angl. simian immunodeficiency virus)
- ssRNA - enovijačna RNA (angl. single-stranded RNA)
- TAE - tris acetat EDTA
- TAR - angl. trans-activation responsive element
- TM - transmembranski protein
- UV - ultravijoličen
- Virus IAK - virus infektivne anemije kopitarjev (angl. Equine infectious anemia virus - EIAV)
- VURS - Veterinarska uprava Republike Slovenije

3. KAZALO

1. POVZETEK	I
SUMMARY	II
2. RAZLAGA KRATIC	III
3. KAZALO.....	V
4. UVOD	1
4.1 ZGODOVINA RAZISOVANJA INFEKCIOSNE ANEMIJE KOPITARJEV	1
4.1.1 ZGODOVINA RAZISOVANJA IAK V SLOVENIJI.....	1
4.2 VIRUS INFEKCIOSNE ANEMIJE KOPITARJEV	2
4.2.1 KLASIFIKACIJA VIRUSA IAK	2
4.2.2 STRUKTURA VIRUSA IAK	4
4.3 GENOM VIRUSA IAK: GENETSKA STRUKTURA IN FUNKCIJE VIRUSNIH PROTEINOV	4
4.3.1 GEN GAG	5
4.3.2 GEN POL	6
4.3.3 GEN ENV	6
4.3.4 GEN TAT	7
4.3.5 GEN S2	7
4.3.6 GEN REV	7
4.3.7 LTR	8
4.4 REPLIKACIJSKE STRATEGIJE VIRUSA IAK	8
4.5 KLINIČNE ZNAČILNOSTI IAK	10
4.5.1 AKUTNA FAZA IAK	11
4.5.2 KRONIČNA FAZA IAK	11
4.5.3 SUBKLINIČNA FAZA IAK	12
4.5.4 DEJAVNIKI, KI LAHKO POVZROČIJO PONOVEN IZBRUH IAK	12
4.6 PATOGENEZA IAK	13
4.6.1 TROMBOCITOPENIJA	13
4.6.2 ANEMIJA	13

4.6.3	IMUNSKA KONTROLA INFEKCIJE IN REPLIKACIJE VIRUSA IAK	13
4.6.4	ODSOTNOST CELIČNE IMUNOSTI.....	15
4.7	PATOANATOMSKE IN PATOHISTOLOŠKE ZNAČILNOSTI IAK.....	16
4.7.1	PATOGENOST VIRUSA IAK	16
4.7.2	TKIVNI TROPIZEM VIRUSA IAK.....	17
4.8	EVOLUCIJA VIRUSA IAK V OKUŽENIH ŽIVALIH	17
4.8.1	FREKVENCA VARIACIJ NI V DIREKTNI POVEZAVI Z VIRUSNO REPLIKACIJO	18
4.9	EPIDEMIOLOGIJA IAK	18
4.9.1	POJAVNOST IAK V SLOVENIJI	19
4.10	VRSTE GOSTITELJEV IN PRENOS VIRUSA IAK	20
4.10.1	PRENOS VIRUSA IAK	20
4.11	DIAGNOSTIKA IAK	21
4.11.1	POSREDNO DOKAZOVANJE IAK.....	21
4.11.2	NEPOSREDNO DOKAZOVANJE VIRUSA IAK	24
4.12	POTRDITEV BOLEZNI.....	26
4.12.1	UKREPI IN ZATIRANJE BOLEZNI	26
4.13	PREVENTIVA IN KONTROLA IAK.....	26
5.	NAMEN IN HIPOTEZA	28
6.	MATERIALI IN METODE.....	29
6.1	PRIPRAVA VZORCEV.....	31
6.1.1	ORGANSKA SUSPENZIJA VRANIC.....	31
6.1.2	KRVNI VZORCI.....	31
6.2	IZOLACIJA DNA	32
6.2.1	MERJENJE KONCENTRACIJE CELOKUPNE DNA	32
6.3	PCR	33
6.3.1	IZBOR ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV	33
6.3.2	REAKCIJSKA MEŠANICA ZA PCR	33
6.4	GELSKA ELEKTROFOREZA	34
6.5	SEKVENCIRANJE PCR PRODUKTOV	34

6.5.1 ČIŠČENJE PRODUKTOV.....	34
6.6 ANALIZA PCR PRODUKTOV	35
6.6.1 UREJANJE SEKVENC	35
7. REZULTATI.....	36
7.1 REZULTATI MERJENJA KONCENTRACIJE CELOKUPNE DNA.....	36
7.2 REZULTATI IZOLACIJE VIRUSNE DNA	37
7.2.1 REZULTATI GELSKE ELEKTROFOREZE	37
7.2.2 REZULTATI DOKAZOVANJA VIRUSNE DNA	38
7.2.3 PORAVNAVA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ	40
7.2.4 ODSOTOK IDENTIČNOSTI IN RAZLIČNOSTI.....	42
8. RAZPRAVA	44
9. ZAKLJUČKI	48
10. ZAHVALA	49
11. LITERATURA.....	50

4. UVOD

4.1 ZGODOVINA RAZISKOVANJA INFEKCIOSNE ANEMIJE KOPITARJEV

Infektivna anemija kopitarjev, krajše IAK (angl. equine infectious anemia - EIA) je razširjena po vsem svetu. Prvi je IAK kot nalezljivo bolezen konjev opisal Ligne leta 1843 v Franciji (Ligne, 1843), pozneje je bila bolezen opisana pri konjih, oslih in mulah v Aziji, Afriki, Severni in Južni Ameriki ter Avstraliji. Leta 1904 so ugotovili, da IAK povzroča »agens, sposoben filtracije«, zaradi česar je IAK postala prva živalska bolezen virusne etiologije (Leroux in sod., 2004; Quinlivan in sod., 2007). Zaradi težavne izolacije in razmnoževanja na celičnih kulturah je karakterizacija virusa potekala zelo počasi, zato je bila kontrola bolezni usmerjena k odkrivanju in usmrtnosti z virusom IAK okuženih konjev (Montelaro, 1999).

Nadaljnjo raziskovanje virusa IAK (angl. equine infectious anemia virus - EIAV) je večinoma potekalo vzporedno z odkrivanjem maedi visna virusa (MVV). Gledano z zgodovinskega stališča sta bila virusa IAK in MVV odkrita, izolirana in opisana mnogo pred odkritjem človeškega virusa imunske pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus - HIV). Ker pa je danes HIV med vsemi lentivirusi daleč najbolj raziskan, se nova razkritja o virusu IAK ponavadi primerjajo z znanjem o HIV (Desrosiers, 2007).

4.1.1 ZGODOVINA RAZISKOVANJA IAK V SLOVENIJI

Prvič je bila bolezen, podobna IAK, v Sloveniji ugotovljena v okolici Ljubljane. Zaradi vse pogostejših primerov obolelih konj je bila leta 1946 diagnostika IAK določena za prioriteto na področju veterinarskih preiskav. Klinični laboratorij Centralne veterinarske bolnice Veterinarskega znanstvenega inštituta Slovenije je leta 1950 za diagnozo IAK uporabljal hematološke metode (določanje števila eritrocitov in levkocitov, koncentracija hemoglobina, sedimentacija eritrocitov, ugotavljanje prisotnosti siderocitov). Leta 1958 so na Fakulteti za agronomijo, gozdarstvo in veterinarstvo v Ljubljani izdelali

eradikacijski načrt. Istega leta sta Böhm in Kovač prenesla virus z okužene živali na zdrava žrebata, s čimer sta dokazala kužnost IAK. K razvoju diagnostike IAK pa je močno doprinesel Cogginsov test, ki so ga leta 1982 na Biotehniški fakulteti v Ljubljani vpeljali v rutinsko diagnostiko (Kruljc, 2010).

4.2 VIRUS INFEKCIOSNE ANEMIJE KOPITARJEV

4.2.1 KLASIFIKACIJA VIRUSA IAK

Klasifikacija virusa IAK temelji na morfologiji virionov, seroloških značilnostih in homologiji sekvenc genomov. Virus ima pozitivno polarno enovijačno RNA (angl. single stranded ribonucleic acid - ssRNA) in encim reverzno transkriptazo (angl. reverse transcriptase - RT), zato po Baltimorski klasifikaciji pripada VI. skupini. Spada v družino *Retroviridae* in v rod *Lentivirus*. Filogenetske analize, narejene z nukleotidnim sekvenciranjem različnih retrovirusov, so pokazale, da je virus IAK enako različen od HIV in opičjega virusa imunske pomajkljivosti (angl. simian immunodeficiency virus - SIV) (Montelaro, 1999).

4.2.1.1 Družina *Retroviridae*

Družino *Retroviridae* sestavlja 7 rodov: rod *Alpharetrovirus*, rod *Betaretrovirus*, rod *Gammaretrovirus*, rod *Deltaretrovirus*, rod *Epsilonretrovirus*, rod *Spumavirus* ter rod *Lentivirus* (Desrosiers, 2007; OIE, 2008).

Retrovirusi so edina družina virusov z diploidnim genomom, ki je sestavljen iz dveh enakih linearnih molekul pozitivne ssRNA, vendar ta diploidija ni primerljiva z diploidnimi genomi pri evkariontskih celicah, saj sta obe kopiji genoma v osnovi identični in izvirata iz enega starševskega virusa (Koren, 1998; Grom, 2004; Desrosiers, 2007).

Retrovirusi imajo zapleteno razmnoževanje. Virusna RNA se najprej prepíše v DNA, kar se imenuje reverzna transkripcija. Nastala DNA se razmnoži in prepíše nazaj v RNA, ki se pri dozorevanju vključi v nove virusne delce (Jurca, 1998).

4.2.1.2 Rod *Lentivirus*

V ta rod poleg virusa IAK uvrščamo še HIV-1, HIV-2, SIV, mačji virus imunske pomanjkljivosti (angl. feline immunodeficiency virus - FIV), bovini virus imunske pomanjkljivosti (angl. bovine immunodeficiency virus - BIV), MVV ter kozji artritisa encefalitis virus (angl. caprine arthritis encephalitis virus - CAEV) (Beisel in sod., 1993; Grom, 2004; Desrosiers, 2007; Quinlivan in sod., 2007).

Vsi lentivirusi imajo skupno morfogenezo in morfologijo in v tem se razlikujejo od ostalih podskupin retrovirusov. Klasifikacija virusov v ta rod na podlagi zgolj morfoloških kriterijev se popolnoma sklada s filogenetsko analizo sekvenc gena *pol*, saj so lentivirusne sekvence tega gena bolj sorodne med sabo kot pa do ostalih retrovirusov.

Lentivirusi brstijo iz plazemske membrane brez prej oblikovanega nukleoida, zreli virusni partikli pa vsebujejo stožčaste ali paličaste oblike nukleoidov. Vsi imajo težnjo po replikaciji v makrofagih in vsi povzročajo kroničen progresivni potek bolezni v dovzetnih gostiteljih. Neprimatni lentivirusi, kamor spada tudi virus IAK, uporabijo za receptor pri vstopu v celico gostitelja kemokinske receptorje in ne CD4 (Desrosiers, 2007).

Lentivirusi spadajo med najbolj hitro razvijajoče se genome. Majhna natančnost lentivirusne RT in rekombinacija genomov v inficiranih celicah pripomore k pogostejšim mutacijam. Lentivirusi so definirani kot virusna populacija zelo podobnih genomov ali kvazivirsa, vendar vloga genetske variabilnosti lentivirusov v razvoju bolezni ni popolnoma jasna (Leroux in sod., 1997).

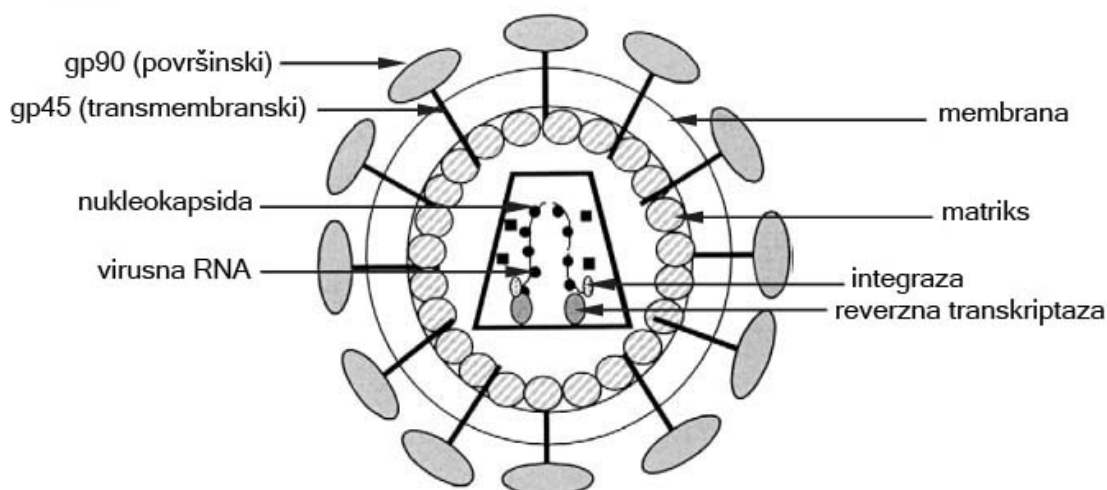
Vsi lentivirusi imajo poleg standardnih najmanj tri dodatne gene in ti geni prispevajo k bolj zapletenemu življenjskemu ciklusu, ki omogoča tudi persistentno virusno replikacijo in strategije za izmikanje pred imunskim odzivom. Vsi lentivirusi vsebujejo transmembranski protein (TM), velik vsaj 150 aminokislin.

Neprimatni lentivirusi vsebujejo deoksiuridinsko trifosfatazo - dUTPaza (angl. deoxyuridine triphosphatase - dUTPase), ki zmanjšuje pogostost mutacij pri reverzni transkripciji. V primatnih lentivirusih dUTPaze ni, kar bi lahko deloma pojasnilo predominantno replikacijo neprimatnih lentivirusov v celicah z majhnim potencialom za delitev (makrofagi) v primerjavi s predominantno

replikacijo primatnih lentivirusov v celicah z mnogo višjo tendenco po delitvi (limfociti). (Desrosiers, 2007).

4.2.2 STRUKTURA VIRUSA IAK

Struktura infektivne oblike virusa oziroma viriona IAK je enaka ostalim lentivirusom. Virioni so pod elektronskim mikroskopom videti skoraj okroglo, čeprav je prisotna določena stopnja polimorfizma. Premer viriona je okrog 100 nm. Notranjo vijačno nukleokapsido obdaja ikozaedrična kapsida. Podolgovato jedro obkroža virusna lipidna ovojnica z 8 nm dolgimi izrastki - peplomerami, ki so po virionovi površini razporejeni simetrično. (Montelaro, 1999).

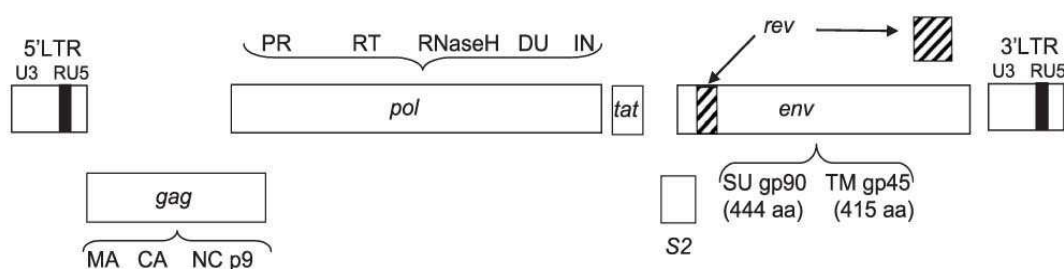


Slika 1: Morfologija viriona in organizacija proteinov virusa IAK (Leroux in sod., 2004).

4.3 GENOM VIRUSA IAK: GENETSKA STRUKTURA IN FUNKCIJE VIRUSNIH PROTEINOV

Genom virusa IAK je najmanjši in najbolj enostaven med vsemi živalskimi in humanimi lentivirusnimi genomi. RNA je sestavljena iz približno 8200 nukleotidov in vsebuje tri večje gene (*gag*, *pol* in *env*), ki kodirajo strukturne

proteine, ter tri manjše gene (*tat* ali *S1*, *S2* in *rev* ali *S3*), ki kodirajo nestrukturane proteine, pomembne pri regulaciji različnih faz virusne replikacije. Orientacija virusnega genoma je v smeri 5' - R - U5 - *gag* - *pol* - *env* - U3 - R - 3'. Gena *Tat* in *S2* sta kodirana kot bralna okvirja v regijah *pol* in *env*, medtem ko je gen *rev* vključen v gena *env* (Montelaro, 1999).



Slika 2: Organizacija genoma virusa IAK, ki vključuje virusne gene in proteine, ki jih ti geni določajo (Leroux in sod., 2004).

4.3.1 GEN GAG

Gen *gag* določa štiri virusne proteine jedra v smeri 5' - p15 - p26 - p11 - p9 - 3' (Montelaro, 1999). Prisotnost skupine Gag prekurzorskih proteinov na plazemski membrani je obvezno za brstenje virusa iz gostiteljskih celic. Poliproteinski Gag prekurzor (Pr55^{gag}) virusno-kodirana proteaza razcepi na štiri večje strukturne proteine zrelega viriona: matriks MA p15, kapsida (angl. capsid) CA p26, z RNA-povezan nukleokapsidni (angl. nucleocapsid) protein NC p11 ter protein nizke molekularne teže p9. Ti proteini imajo glavno vlogo pri infekciji in razvojnih procesih.

Gag protein omogoča združevanje in brstenje virusov iz t.i. poznih (angl. late - L) domen, ureja sposobnost njihovega pritrjevanja na celično membrano in sproža končni korak pri ločitvi nastajajočega virusnega partikla. Maščobno aciliran MA p15 sestavlja matriks tik pod notranjo površino virusne membrane. Kljub nepopolni homologiji v sekvencah je njegova struktura presenetljivo podobna HIV-1 in SIV. CA p26 tvori jedro lupino okrog NC - RNA kompleksa; zapira vijačni ribonukleoproteinski kompleks, ki vsebuje bazični nukleoprotein, p11 in različne polimeraze, ki so v tesnem stiku z virusnim RNA genomom. Lokacija glavnega jedrnega proteina p9 ni popolnoma znana, najverjetneje pa je povezovalni protein med jedro lupino in ovojničnim matriksom. P9 virusa IAK je ekvivalenten proteinu P6 HIV, saj sta oba

vključena v virusni delec, ki brsti iz celice (Montelaro, 1999; Leroux in sod., 2004; Quinlivan in sod., 2007).

4.3.2 GEN *POL*

Gen *pol* (angl. polymerase) kodira skupino encimov v smeri 5' - proteaza - reverzna transkriptaza (RNAzaH) - dUTPaza - integraza 3'. Gen *pol* navadno vsebuje najvišjo stopnjo ohranjenih sekvenc, zato se te sekvence pogosto primerjajo med različnimi skupinami lentivirusov (Desrosiers, 2007).

Pri cepitvi Gag-Pol prekursorja (Pr180^{gag/pol}) nastanejo produkti gena *pol*, ki proizvedejo različne encime: virusno proteazo (p12) za proizvodnjo poliproteinov, RT - RNAzaH (p66), ki je pomembna pri pretvorbi virusne RNA v DNA in dUTPazo (p17), ki je nujno potrebna za replikacijo virusa v nedeležih se makrofagih in integrazo (Leroux in sod., 2004).

4.3.3 GEN *ENV*

Gen *env* (angl. envelope) je nujno prisoten pri virusni replikaciji in kodira dva glikoproteina virusne ovojnice v smeri 5' - gp90 - gp45 - 3'. Podobno kot pri ostalih retrovirusih kodira površinski (gp90) in transmembranski (gp45) glikoprotein, ki sta povezana z virusno ovojnico. Proteina sta odgovorna za pritrjevanje receptorjev na celično površino in posredovanje pri vstopu virusa v celice. Ti proteini so glavne tarče za protitelesa, ki lahko nevtralizirajo infektivnost (Desrosiers, 2007). V enem virionu je približno 300 kopij obeh glikoproteinov ovojnice, peplomere pa so sestavljene iz trimerov gp90 in gp45. Končni del virusne ovojnice je MA p15.

Protein gp90 je glikoziliran, hidrofilen, površinski protein, ki sestavlja zunanje izrastke ovojnice in naj bi bil v stiku celičnimi receptorji. Gp90 je tarča za vezavo nevtralizacijskih protiteles in domneva se, da spremembe v ovojnici omogočijo antigensko nov virus, ki zbeži pred gostiteljskim imunskim nadzorom, kar pomeni nov cikel virusnih replikacij in kliničnih bolezni. Med potekom bolezni je gp90 podvržen mutacijam, ki so omejene na določene variabilne regije, V1 do V8.

Protein gp45 pa je malo glikoziliran, hidrofoben transmembranski protein, ki sestavlja konice, segajoče skozi membrano do zunanjih izrastkov (Montelaro, 1999; Wang in sod., 2001; Leroux in sod., 2004).

4.3.4 GEN *TAT*

Gen *Tat* se nahaja v regiji med genoma *pol* in *env*, kjer je področje hidrofobne sredice in dveh terminalnih NH₂ in COOH regij. *Tat* je najbolj ohranjena regija in je najverjetneje nujno potreben za replikacijo virusa. Z LTR (angl. long terminal repeat) je v stiku preko za transaktivacijo zadolženim (angl. trans-activation responsive - TAR) elementom in nadzoruje aktivacijo LTR. Tako kot pri HIV je tudi pri virusu IAK transkripcija DNA v celici kontrolirana z interakcijo med TAR sekvenco in *Tat* proteinom (Zheng in sod., 2000; Leroux in sod., 2004; Desrosiers, 2007).

4.3.5 GEN *S2*

Gen *S2* se nahaja na N-terminalnem delu *env* regije. Produkt *S2* je citoplazemski protein, ki je verjetno v stiku z Gag, vendar ni vključen v virusne partikle. Velik je 8 kDa (kilodalton), sestavljen iz 65 aminokislin in vsebuje tri aminokislinske skupine, ki kljub persistentni okužbi ostanejo ohranjene. Okuženi kopitarji proizvajajo protitelesa proti *S2*. Njegova točna naloga ostaja neznan, vendar so raziskave gena virusa IAK v Veliki Britaniji (angl. EIAV_{UK}) razkrile pomembno vlogo *S2* pri virusni replikaciji in virulenci med *in vivo* okužbo (Montelaro, 1999; Leroux in sod., 2004; Desrosiers, 2007).

4.3.6 GEN *REV*

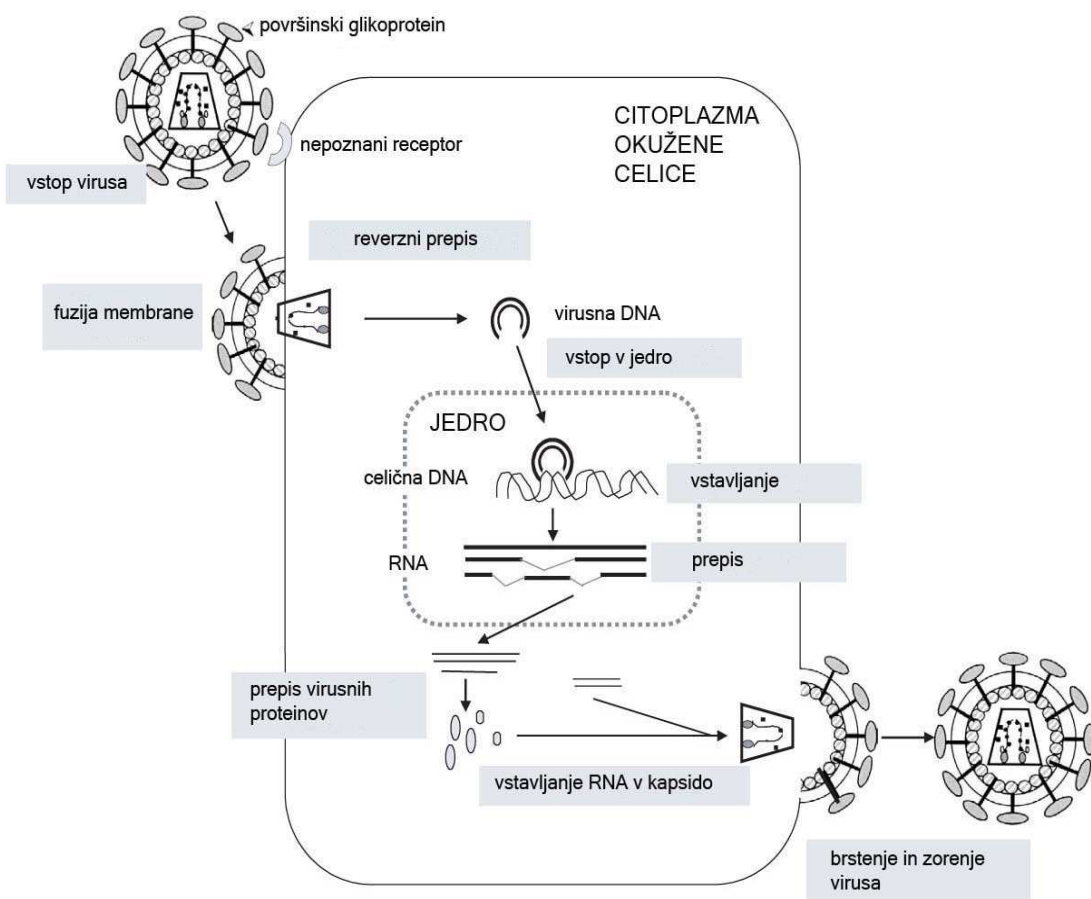
Gen *Rev* je pomemben pri ekspresiji strukturnih proteinov in virusni produkciji. Posreduje pri transportu mRNA iz jedra v citoplazmo preko *Rev* odzivnega elementa, ki se nahaja na koncu gena *env* in sicer tako, da omogoči translokacijo nespojenih in delno spojenih RNA iz jedra v citoplazmo po transkripciji. Večina celičnih mRNA je namreč popolnoma spojenih, preden gredo v citoplazmo, vendar so v okuženih celicah tudi nespojeni in delno spojeni RNA (Leroux in sod., 2004).

4.3.7 LTR

Odseka LTR (angl. long terminal repeats) služita kot predel iniciacije transkripcije. Vsebujeta tri segmente: U3 (angl. unique, 3' del), R (angl. repeated) in U5 (angl. unique, 5' del). U3 regija vsebuje različne elemente, pomembne za virusno transkripcijo. Transkripcija LTR vodi v produkcijo genomske enovijačne mRNA. S celično DNA povezani faktorji, ki regulirajo različne virusne promotorje, sodelujejo s specifičnimi deli na LTR (Leroux in sod., 2004). Variacije v sekvencah LTR spreminjajo virusne transkripcijske in replikacijske mehanizme, kar se kaže v spremembah v celičnem tropizmu in virulenci (Tu in sod., 2007).

4.4 REPLIKACIJSKE STRATEGIJE VIRUSA IAK

Značilnosti replikacije virusa IAK so enake ostalim retrovirusom. Enovijačna, pozitivno polarna virusna RNA ne deluje kot sporočilna RNA (angl. messenger RNA - mRNA), temveč jo virusna odvisna polimeraza DNA ali RT v okuženi celici prepíše v RNA-DNA hibridno molekulo, ki se spremeni v provirusno dvojnovijačno DNA in se vgradi v celično DNA. Integrirano virusno DNA celična polimeraza RNA prepíše v molekulo RNA, ki ima dvojno vlogo - hkrati je virusna genomska RNA in policistronska mRNA. Poliproteine, ki nastanejo, virusne proteaze cepijo v posamezne virusne beljakovine. Genomske RNA se združujejo v pare in s tem predstavljajo diploidni genom novega viriona (Koren in sod., 1998; Montelaro, 1999; Grom, 2003).



Slika 3: Shematski prikaz replikacije virusa IAK (Leroux, 2004).

Virusno prepoznavanje, pritrditev in penetracijo tarčnih celic omogočajo specifične interakcije glikoproteinov virusne ovojnice in celičnih proteinov v plazemski membrani. Ti domnevni receptorji za virus IAK še niso identificirani (Montelaro, 1999).

V citoplazmi gostiteljske celice virusna RT kopira enovijačno virusno RNA v dvojnovijačni DNA provirus, ki preide v jedro celice. V jedru celice virusna integraza posreduje navidez naključno vključitev provirusne DNA v celične kromosome, čeprav je nekaj izvenkromosomskih virusnih DNA vedno prisotnih v okuženih celicah. Običajno je v eni okuženi celici okrog 10 kopij provirusne DNA. Pri transkripciji provirusne DNA s celično polimerazo se proizvedejo virusne mRNA, katerih relativno razmerje se razlikuje v odvisnosti od izvora virusa in tarčne celice. Prevladujoče kopije so velike 8,2 kb (kilobaz) in predstavljajo RNA naravne velikosti, ki pri prevajanju postanejo *gag* in *pol* produkti gena, in 3,5 kb velike enovijačne kopije mRNA, ki se prevedejo v proteine virusne ovojnice.

Okužene celice običajno vsebujejo tudi heterogeno populacijo majhnih večverižnih RNA, iz katerih nastanejo različni regulatorni proteini. Majhen delež teh majhnih kopij pojasni relativno genetsko enostavnost virusa IAK in pomanjkanje obsežnih večverižnih delcev za zagotavljanje produkcije vseh manj pomembnih virusnih genov. Po drugi strani pa je zanimivo, da lahko 3,5 kb velika kopija tricistronske mRNA pri *in vitro* translaciji proizvede virusne Tat in Rev proteine, kar je neobičajen mehanizem genetske zmogljivosti v replikaciji virusa IAK (Montelaro, 1999).

O natančnem mehanizmu sestavljanja virusa je malo znanega, vendar najverjetneje ustreza splošnemu modelu vseh retrovirusov. Tudi mehanizem poškodovanja gostiteljske celice med sestavljanjem virusa ni natančno pojasnjen. Različne raziskave domnevajo, da je glavni mehanizem citopatogeneze virusa povzročitev strukturne in funkcionalne motnje v celični plazemski membrani z virusnimi glikoproteini ovojnice (Montelaro, 1999).

4.5 KLINIČNE ZNAČILNOSTI IAK

Virus IAK povzroča infektivno anemijo kopitarjev, krajše IAK lat. *Anemia Infectiosa Equorum* - AIE) ali kužno malokrvnost konj, nekdanje imenovano tudi močvirna mrzlica (angl. swamp fever). Pri kopitarjih povzroča persistentno in potencialno smrtno okužbo, ki ima v veterinarski medicini v svetovnem merilu velik pomen. Bolezen je kužna (infekcijska), vendar nenalezljiva, saj se ne prenaša direktno iz ene bolne živali na drugo (Mealey, 2007; Kuhar in sod., 2009).

Tako naravna kot eksperimentalna okužba z virusom IAK se kaže kot hitro razvijajoča se bolezen, v čimer se bistveno razlikuje od počasi potekajočih progresivnih bolezni, ki jih povzročajo drugi lentivirusi, npr. okužba s HIV-1 pri ljudeh (Montelaro, 1999).

Klinični znaki bolezni se razlikujejo v odvisnosti od faktorjev rezistence gostitelja, faktorjev virulence virusa in faktorjev okolja (npr. podnebje, delovna obremenjenost živali, ipd.). Klinični znaki so lahko asimptomatski ali celo fatalni, navadno pa se kažejo kot vročina, anemija, izguba telesne mase in levkopenija. Klinično obstajajo tri faze bolezni: akutna, kronična in

asimptomatska (inaparentna). Za akutno in kronično fazo IAK so značilna obdobja klinične bolezni, sprožena z valovi viremije, ki jih spremlja vročina, anemija, trombocitopenija, edemi, driska, letargija in različni znaki hiranja, 8-12 mesecev po okužbi pa pride zaradi razvoja trajne imunosti gostitelja ponavadi do doživljenjskih inaparentnih nosilcev virusa (Issel in Coggins, 1979).

Zdravljenja ni, prav tako ne obstaja zaščitno cepljenje živali. Bolezen ni nevarna za človeka (Montelaro, 1999; Craig in sod., 2009).

4.5.1 AKUTNA FAZA IAK

Akutna oblika IAK je povezana s prvim stikom z virusom in se 7 do 30 dni po okužbi kaže kot povišana telesna temperatura, neješčnost, brezvoljnost in krvavitve. V tem času pride do masivnega pomnoževanja virusa v makrofagih, ki posledično začno propadati. Konji so v začetni fazi akutne IAK serološko negativni, ker imunski sistem nima dovolj časa za odziv na virusne antigene. Med vrhom vročinskega odziva pa pride do viremije z več kot 10^6 infektivnih doz v enem mililitru krvi (Mealey, 2007; Kruljc, 2010).

4.5.2 KRONIČNA FAZA IAK

Pri kronični IAK se pojavijo bolj značilni klinični znaki IAK: ponavljajoča se stanja povišane telesne temperature, anemija, hitra izguba telesne mase, driska in edemi na spodnjih delih telesa, hitro utrujanje in potenje ter oslabelelost zadnjega dela telesa. Ti znaki se pojavijo tudi kasneje med ponovnim ciklusom bolezni, ki se pojavi v nepravilnih časovnih intervalih v razponu od nekaj tednov do več mesecev. Konji s kronično boleznijo so serološko pozitivni in imajo spremenljivo stopnjo anemije, ki je višja v času vročinskega obdobja. Živali so lahko kljub ustrezni prehranjenosti shirane. Čeprav lahko majhen delež konjev s kronično obliko bolezni tudi pogine, pa prevladuje prenehanje kliničnih simptomov ob koncu prvega leta po okužbi z razvojem dosmrtno subklinične prisotnosti virusa v gostitelju (Montelaro, 1999).

4.5.3 SUBKLINIČNA FAZA IAK

Najvišji delež z virusom IAK okuženih konjev predstavljajo ravno subklinični virusni nosilci, saj je med vsemi lentivirusnimi okužbami IAK edinstvena v tem, da več kot 90% okuženih konjev preide iz kronične v subklinično obliko bolezni kljub močni virusni replikaciji in posledično močni antigenski variaciji. Te živali ne kažejo kliničnih znakov, značilnih za virusno bolezen. Z vzdrževanjem različnih stopenj virusne replikacije v tkivih, bogatih z monociti, gostitelji ostanejo okuženi vse življenje in je v njihovi krvi prisotna velika količina specifičnih protiteles, ki pričnejo nastajati že 3 do 6 tednov po okužbi. Med inaparentno fazo namreč dosežejo imunsko kontrolo nad virulentnim in konstantno razvijajočim se lentivirusom, kar je dokazano s prenosom polne krvi iz inaparentnega nosilca v neokuženega konja, kjer pride do akutne faze bolezni v dveh mesecih. Inaparentne živali so najverjetneje odporne na dodatno izpostavitve z variantnimi sevi, kar kaže na to, da lahko konj doseže visoko stopnjo zaščitne imunosti. Virus IAK je tudi v tem edinstven model naravnega imunskega nadzora nad replikacijo virusa in boleznijo in ta model čaka na raziskavo o vlogi virusnih variacij za persistentnost virusa in patogenosti (Tagmyer in sod., 2008; Craigo in sod., 2009).

4.5.4 DEJAVNIKI, KI LAHKO POVZROČIJO PONOVEN IZBRUH IAK

Zdravljenje konja z imunosupresivnimi zdravili ali izpostavljanje živali ekstremnemu stresu lahko povzroči ponoven izbruh IAK, povezan s ponovno virusno replikacijo in pojavom novih kvazivrst virusa, četudi žival več let ni kazala kliničnih znakov. Preživelim živalim se stanje izboljša, nato pa spet sledi kronična anemija in oslabelost, in ta stanja se ciklično izmenjujejo. Okužba se lahko kaže tudi samo s pozitivno reakcijo v serološkem testu (Montelaro, 1999; Craigo in sod., 2009).

4.6 PATOGENEZA IAK

4.6.1 TROMBOCITOPENIJA

Ena prvih in najbolj dosledno odkritih patoloških motenj pri z virusom IAK okuženih konjih je trombocitopenija. Patogeneza nastanka trombocitopenije je večplastna. V poskusno okuženih živalih so med stanjem trombocitopenije določili porast imunoglobulinov G in imunoglobulinov M, kar daje slutiti, da do trombocitopenije pride zaradi imunskih mehanizmov. Trombociti se aktivirajo in postanejo slabše funkcionalni pri akutno okuženih konjih, kar lahko vodi v nastanek trombocitnih agregatov, ki se odstranijo iz krvnega obtoka. Ta proces predstavlja neimunski mehanizem uničenja trombocitov pri okuženih živalih. Nenazadnje pa bi do trombocitopenije lahko prišlo tudi zaradi zlepljanja in agregacije trombocitov kot posledica okužbe endotelnih celic (Mealey, 2007).

4.6.2 ANEMIJA

Glavni znak IAK je anemija, vzroka za njen pojav pa sta hemoliza in depresija kostnega mozga, ki sta v tesni povezavi z replikacijo virusa. Virus IAK povzroča imunsko posredovano hemolitično anemijo. Destrukcija eritrocitov je posledica oblikovanja kompleksov antigen-protitelo. Eritrocit obda virusni površinski glikoprotein, ki v prisotnosti specifičnih protiteles in vezave komponente komplementa C3 sproži eritrofagocitozo (makrofagi fagocitirajo eritrocite) inz aktivacijo komplementa po klasični poti do hemolize. Zaradi formacije imunskih kompleksov so prizadete tudi ledvice. Poleg tega k uničevanju eritrocitov prispevajo tudi osmotska krhkost in skrajšana življenjska doba. Zakaj pride do depresije kostnega mozga, ni točno razjasnjeno, verjetno pa je proces povezan s pomanjkanjem železa (Montelaro, 1999; Desrosiers, 2007).

4.6.3 IMUNSKA KONTROLA INFEKCIJE IN REPLIKACIJE VIRUSA IAK

Pri konjih, okuženih z virusom IAK, se v 21 dneh po okužbi pojavi viremija in s tem klinično zaznavna bolezen. V tem času se aktivira imunski sistem živali,

tako da lahko dokažemo specifična protitelesa, torej postanejo serološko pozitivne. Raziskave so pokazale, da je ob pojavu kliničnih znakov bolezni koncentracija RNA v plazmi najmanj 10^7 do 10^8 kopij/ml. Za pojav viremije sta odgovorna specifični celični in protitelesni specifični odzivi organizma gostitelja (Leroux in sod., 2004).

Do imunske kontrole primarne infekcijske viremije pride zaradi navzočnosti specifičnih citotoksičnih limfocitov T (CTL CD8+) in ne-nevtralizacijskih specifičnih protiteles. Okužene živali razvijejo močan imunski odziv proti površinskim (gp90) in transmembranskim (gp45) glikoproteinom ter glavnemu jedrnemu proteinu p26. Čeprav je p26 največji protein v virionu, je humoralni imunski odziv proti p26 10- do 100-krat nižji kot odziv proti gp90 in gp45. Pri naravno in eksperimentalno okuženih živalih so opisali tudi protitelesa, ki prepoznajo virusno reverzno transkripazo (Leroux in sod., 2004).

Tako kot pri okužbi s HIV-1 tudi pri virusu IAK konec začetne viremije sovpada s pojavom CTL CD8+. Zanimivo je, da nivo specifičnih protiteles proti virusu IAK ostane na dokaj stalnem nivoju tudi pri kronični in asimptomatski obliki bolezni. V kasnejšem obdobju okužbe mnogo živali razvije obilno količino celic T pomagalk (CD4+) in spominskih CTL (angl. memory CTL - mCTL), ki prepoznavajo virusne antigene. CTL prepoznajo in lizirajo tako Gag- kot Env-izražene tarče, medtem ko CD4+ CTL lizirajo le Env- specifične tarčne celice (Hammond in sod., 1997). CTL epitopi so locirani znotraj zasnove Gag (p15), kapside (p26), površinskega glikoproteina (gp90) in Rev (Leroux in sod., 2004). Ena izmed raziskav je pokazala, da je visoka ali srednja aktivnost mCTL, kjer so tarča Rev epitopi, prisotna pri inaparentno okuženih konjih, kar lahko pomeni, da je odgovor CTL na nevariabilne virusne peptide kritični element za virusno kontrolo. Ugotovili so še, da tako kot pri HIV in SIV okužbah primatov tudi pri virusu IAK evolucija *gag* in *env* genov vodi v pobeg pred CTL (Mealey in sod., 2001).

4.6.3.1 Nevtralizacijska protitelesa

Imunski odziv med kroničnim potekom bolezni povzroči značilno patogenezo v obliki prisotnosti med drugim tudi visoke koncentracije nevtralizacijskih protiteles proti virusu IAK, ki sčasoma omogoči razvoj imunskega nadzora nad virusno replikacijo. V tem se virus IAK edinstveno razlikuje od ostalih

lentivirusov, saj gostiteljski imunski odziv doseže stalen in učinkovit nadzor nad hitro virusno replikacijo in ponovnim pojavom klinične oblike bolezni z vzdrževanjem inaparentne faze okužbe. Imunska kontrola akutne viremije je bila do sedaj v povezavi s prisotnostjo CTL in ne-nevtralizacijskih protiteles. Vendar so odkrili tudi virusno specifična nevtralizacijska protitelesa, ki se razvijejo po akutni fazi in se njihov titer ter specifičnost zvišuje v prvem letu po okužbi. Dosedanja odkritja imunskih povezav tega odziva so pokazala, da količina nevtralizacijskih serumskih protiteles med kronično fazo bolezni progresivno naraste zaradi razvoja imunskega odziva, ki sledi novim generacijam virusnih antigenskih variant (Leroux in sod., 2004).

4.6.3.2 Razvoj protitelesnega imunskega odziva

Pri prehodu bolezni iz kronične v inaparentno obliko je opisan postopen razvoj protitelesnega imunskega odziva v prvih 10 mesecih po okužbi. V tem obdobju specifična protitelesa zorijo iz nizke afinitete glede na stabilnost kompleksa antigen-protitelo, do stabilne faze s srednjo do močno afiniteto protiteles (Hammond in sod., 1997). Do spremembe pride zato, ker se prvotna za ovojnico specifična protitelesa, ki v glavnem prepoznajo linearne epitope, razvijejo v protitelesa, sposobna konformacijsko odvisnega odgovora (Hammond in sod., 1997).

4.6.4 ODSOTNOST CELIČNE IMUNOSTI

Od protiteles odvisna citotoksičnost manjka v vseh fazah okužbe. Vse te raziskave jasno nakazujejo vlogo učinkovitega in zrelega imunskega odziva pri nadzoru virusne replikacije. Vendar korelacije imunske zaščite še čakajo na dokončno razkritje. Sposobnost imunskega odgovora živali, da premaga persistentno prisotnost virusa in se izogne njegovim mehanizmom izogibanja imunskemu sistemu, daje slutiti, da je razvoj učinkovitega cepiva vsekakor mogoč (Leroux in sod., 2004; Montelaro, 1999; Tagmyer in sod., 2008).

4.7 PATOANATOMSKE IN PTOHISTOLOŠKE ZNAČILNOSTI IAK

Patoanatomske in patohistološke značilnosti poškodbe tkiv, povzročene zaradi okužbe z virusom IAK, se razlikujejo glede na stopnjo virusne replikacije in so odvisne od stadija bolezni. Krvavitve, edemi in zlatenica se pojavijo pri akutni fazi bolezni, medtem ko so povečanje jeter, vranice in limfnih vozlov pogosti v kronični fazi bolezni (VURS, 2009).

V akutni fazi bolezni pride do edema parenhimatoznih organov, v večini tkiv pa se pojavijo krvavitve. Najbolj izrazite so jetrne in limfoidne nekroze ter pojav velikega števila aktiviranih makrofagov in Kupfferjevih celic. Jetrna nekroza je močnejša v bližini centralne vene zaradi degenerativnih sprememb parenhimskih celic. V vranici se pojavijo degenerirani eritrociti, v kapsuli in njeni okolici pa fokalne krvavitve. V jetrih, vranici, bezgavkah, ledvicah, srcu in pljučih pride do limfocitne infiltracije. Glavnina teh sprememb je posledica imunsko posredovane lize z virusom okuženih celic in vnetnega imunskega odgovora organizma (Montelaro, 1999).

Patološke spremembe pri kronični obliki IAK pa vključujejo razvoj imunološkega nadzora nad virusno replikacijo. Makroskopske patološke spremembe se kažejo kot splenomegalija, limfadenopatija in hepatomegalija, patohistološke spremembe pa so limfoidna infiltracija v skoraj vseh organih in tkivih (Montelaro, 1999).

Najbolj zgodaj odkrita patološka sprememba v kronični fazi je trombocitopenija, ki ji sledi dokaz virusno specifičnih protiteles (Mealey, 2007).

4.7.1 PATOGENOST VIRUSA IAK

Patogenost terenskih izolatov in laboratorijskih sevov se močno razlikuje, in sicer od avirulentnih pa vse do letalnih sevov. O virusnih determinantah in gostiteljskih faktorjih, ki vplivajo na zmožnost replikacije virusa in njegove patogeneze, je malo znanega. Odkritja pri drugih lentivirusih kažejo, da so razlike v virusni patogenosti posledica specifičnih sprememb v genih virusne ovojnice ali sprememb v regulatornih sekvencah virusnega genoma (Montelaro, 1999).

4.7.2 TKIVNI TROPIZEM VIRUSA IAK

Tarčne celice pri okužbi z virusom IAK predstavljajo celice monocitne/makrofagne linije (Montelaro, 1999). Virus se lahko širi kot prost virus, pogosteje pa se širi z okuženimi monociti v krvi. V nasprotju z nekaterimi drugimi lentivirusi, pri virusu IAK ni podatkov o okužbi limfocitov. Produkcija virusa je opazna v celicah vranice, v jetrih, ledvicah, bezgavkah, pljučih, srcu, možganih, želodcu, kostnem mozgu, timusu, adrenalnih žlezah in črevesju. Glavna masa virusa se nahaja predvsem v tkivnih makrofagih, ki se nahajajo v jetrih, ledvicah in vranici, veliko nižjo koncentracijo virusa pa najdemo v bezgavkah, kostnem mozgu ter v monocitih v krvi. Čeprav se lahko virus prilagodi na replikacijo v fibroblastih, je pri viremiji njegov izvor predvsem iz makrofagov. Do dokaj visoke viremije med epizodo ponovnega izbruha pri kronični IAK pride zaradi produkcije in sproščanja virusa iz okuženih tkivnih makrofagov, ne pa zaradi obsežne okužbe krvnih monocitov v krvi (Sellon in sod., 1992; Cook in sod., 1998; Montelaro, 1999; Desrosiers, 2007).

4.8 EVOLUCIJA VIRUSA IAK V OKUŽENIH ŽIVALIH

Lentivirusi spadajo med najbolj hitro razvijajoče se genome. Visok nivo variacij se dogaja znotraj in med z lentivirusi okuženimi gostitelji. *In vivo* se oblikuje kompleksna populacija virusnih genotipov ali kvazivrst, ki so si med sabo podobne, vendar ne enake. Nove prevladujoče kvazivrstice so povezane z vsako klinično epizodo in cirkulirajoča virusna populacija se v celoti zamenja med dvema febrilnima obdobjema. H genetski raznolikosti med persistentno okužbo in s tem k zvišanju pogostnosti mutacij znotraj okuženih celic prispeva tudi rekombinacija med variantami virusnih genomov (Leroux in sod., 2004). Virus IAK in ostali retrovirusi so edinstveni v kodiranju RT, ki je nenatančna, naklonjena napakam (enako kot pri RT HIV-1) in zato omogoča veliko frekvenco mutacij pri replikaciji. Med kopiranjem RNA in DNA šablon namreč omogoča učinkovito podaljševanje kljub napačnem spajanju. Cikel vsebuje novo generacijo dvojnovažne DNA iz virusne RNA, ki se kot provirus integrira v gostiteljsko DNA (Quinlivan in sod., 2007). Pri tem nastajajo različne

genomske mutacije, zaradi katerih prihaja do raznolikih variant virusnih linij. Nukleotidne mutacije se kopičijo v *env*, LTR regiji in *rev*, novejša raziskava pa so potrdile tudi evolucijo gena *gag* (Quinlivan in sod., 2007).

4.8.1 FREKVENCA VARIACIJ NI V DIREKTNI POVEZAVI Z VIRUSNO REPLIKACIJO

Dolgo časa je v zvezi z evolucijo lentivirusov veljalo mnenje, da je frekvenca variacij direktno povezana z nivojem virusne replikacije. Vendar je raziskava, v kateri so dve leti in pol pri ponijih, ki so se močno razlikovali v napredovanju kliničnih znakov, opazovali evolucijo gp90 virusa IAK, pokazala, da je bil nivo variacij gp90 neodvisen od števila bolezenskih ciklov in od počasne virusne replikacije med dolgotrajno okužbo. Poleg tega so bile vedno prisotne tudi kvazivrste, ne glede na nizek nivo plazemske viremije, kar nakazuje na aktivno replikacijo v jetrih, kostnem mozgu ali vranici. Rezultati vseh teh raziskav so pripeljali do zaključka, da so mutacije povezane s ponovnim pojavom IAK, vendar same niso zadostne za sprožitev viremije in bolezni. Napredovanje bolezni ni v korelaciji s količino mutacij. Celični in protitelesni imunski odziv pa nista očitno različna med progresivno in neprogresivno obliko bolezni, zato lahko sklepamo, da obstajajo še drugi kriteriji, ki nadzorujejo virusno replikacijo in da prisotnost nove virusne populacije sama po sebi še ne izzove kliničnih simptomov (Montelaro, 1999; Leroux in sod., 2004; Craig in sod., 2009).

4.9 EPIDEMIOLOGIJA IAK

IAK se pojavlja po celem svetu. Pojavnost z virusom IAK okuženimi konji je višja v subtropskem in tropskem podnebju zaradi toplejših geografskih področij in visoke populacije insektov - vektorjev, ki prenašajo bolezen med konji. V ZDA je med vsemi testiranimi konji na prisotnost specifičnih protiteles proti virusu 0,2 % okuženih konj, vendar je ta podatek zavajajoč, saj se testira manj kot 10 % konj. Okužba je pogostejša v Srednji in Južni Ameriki, kjer je okuženih tudi do 50 % konjev. Čeprav je pojavnost bolezni

višja v toplejših mesecih zaradi insektov, se okužbe pojavljajo tudi v ostalih mesecih zaradi iatrogenega prenosa bolezni (Montelaro, 1999).

Do izbruhov IAK prihaja tudi v Italiji, Franciji in nekaterih vzhodnoevropskih državah. Še posebej pomembna država je Romunija, od koder je možen prenos kopitarjev z virusom IAK v državah članicah Evropske unije, saj je bilo tam med leti 2000 in 2004 zabeleženih 9953 izbruhov in 30132 posameznih primerov IAK (Quinlivan in sod., 2007; Brangan in sod., 2008).

Junija 2006 je prišlo do izbruha bolezni na Irskem zaradi ilegalnega uvoza kontaminirane plazme iz Italije, namenjene žrebetom za preventivo in nadzor nad okužbo z bakterijo *Rhodococcus equi*. Tamkajšnje Ministrstvo za kmetijstvo je izdalo ukrep za omejitev premikov več kot 1500 konjem (Quinlivan in sod., 2007; Cullinane in sod., 2009).

V Mednarodnem spremljanju bolezni so v obdobju od oktobra do decembra 2009 o izbruhih IAK poročali v Italiji, Romuniji, (v vsaki državi več kot 130 izbruhov), v Nemčiji in na Hrvaškem (Sabirovic in sod., 2010).

4.9.1 POJAVNOST IAK V SLOVENIJI

V Sloveniji so se v preteklosti okužbe ugotovljale sporadično in sicer povprečno 1 do 2 primera na leto. Povečano število evidentiranih primerov okužbe v letu 2009 je posledica večje pozornosti rejcev, ki je bila opazna po večjem izbruhu bolezni na gospodarstvu v Vipavi. Verjetno je k temu pripomogel tudi poostren uradni nadzor s strani Veterinarske uprave Republike Slovenije (VURS) in obveščanje javnosti o pomenu izvajanja in upoštevanja vseh predpisanih ukrepov (Kuhar in sod., 2009).

Do 20. 7. 2009 je bilo na IAK v Sloveniji pregledanih 6.550 kopitarjev. Ugotovljeno je bilo 26 reaktorjev na IAK v 15 rejah: Ivančna Gorica (1), Krško (1), Sevnica (1), Trebnje (1), Kostanjevica na Krki (1), Vipava (12), Loška Dolina (1), Šmarješke Toplice (1), Velike Lašče (2), Cerklje na Gorenjskem (1), Kranj (1), Ormož (1), Bohinj (1) in Ljubljana (1) (VURS, 2009).

4.10 VRSTE GOSTITELJEV IN PRENOS VIRUSA IAK

Virus IAK povzroča okužbe le pri živalih iz družine *Equidae*, in sicer pri konju (*Equus ferus caballus*), oslu (*Equus africanus asinus*), muli (*E. caballus* x *E. Asinus*) in mezgu (*E. caballus* + *E. asinus*). Okužba pri konjih povzroči hitro virusno replikacijo, perzistentno okužbo in klinične znake. Okužba oslov pa povzroči omejeno virusno replikacijo in perzistentno okužbo, vendar do pojava kliničnih znakov ne pride (Leroux in sod., 2004).

4.10.1 PRENOS VIRUSA IAK

Najpomembnejši vir za prenos bolezni je kri okuženega konja. Do prenosa virusa s krvjo lahko pride bodisi s človeškim vplivom (kontaminirana kri, kontaminiran veterinarski pribor) ali z velikimi krvosesimi insekti iz družine *Tabanidae* (obadi, hlevske muhe). Virus ostane na podkožnih iglah infektiven do 96 ur, zato obstaja možnost prenosa bolezni pri rutinskih živinorejskih ali veterinarskih posegih. Virus IAK je edini lentivirus, pri katerem je opisan prenos z vektorjem - krvosesimi insekti. Členonožci, še posebej hlevske muhe in obadi so mehanični prenašalci virusa IAK. Eksperimentalno so opisani prenosi z eno samo konjsko muho, ki je prenesla zgolj 10 nl okužene krvi (Montelaro, 1999; Kuhar in sod., 2009). Do prenosa bolezni pride, ko je v bližini okužene živali velika količina velikih krvosesih insektov. Bolezen običajno izbruhne v obdobju velike aktivnosti insektov, v nižinskih močvirnatih področjih, v bližini gozdov (VURS, 2009).

Opisani so tudi tudi vertikalni prenosi virusa *in utero* (transplacentalni prenos) in postnatalno preko kolostruma ali mleka, ter prenos ob koitusu. Možen je tudi kontaktni prenos, kjer so živali v tesnem stiku v hlevu, saj se virus lahko nahaja v semenu, slini in nosnih ekskretih (Montelaro, 1999; Desrosiers, 2007; More in sod., 2008; Kuhar in sod., 2009).

4.11 DIAGNOSTIKA IAK

Diagnostika IAK temelji bodisi na posrednem bodisi na neposrednem laboratorijskem dokazovanju virusne okužbe. Pri laboratorijski diagnostiki so za posredno dokazovanje virusne okužbe na voljo serološke metode, s katerimi lahko dokažemo specifična protitelesa proti virusu IAK. Najpogosteje uporabljena metoda za potrditev IAK je agar gel imunodifuzijski test (AGID), imenovan tudi Cogginsov test. Novejše metode so še ELISA in imunoblot tehnika. Vsi ti testi zaznajo prisotnost protiteles proti virusu IAK (Issel in sod., 1999).

Izolacija ali dokaz virusa sta diagnostično pomembna v primeru, kadar ni na voljo seruma ter za potrebe karakterizacije tipa virusa. Izolacija virusa je težavna in zahteva kulture konjskih levkocitov, ki jih je zapleteno ohranjati, poleg tega pa pri adaptaciji virusa na tkivno kulturo pride do velikih sprememb v njegovih genetskih in bioloških značilnostih. Pri dokazu virusne nukleinske kisline z metodo PCR se izognemo uporabi celičnih kultur, porabimo manj časa in pospešimo genetsko karakterizacijo (Issel in sod., 1999; Montelaro, 1999; Quinlivan in sod., 2007).

4.11.1 POSREDNO DOKAZOVANJE IAK

Točni in zanesljivi metodi za posreden dokaz IAK, razen v zgodnji fazi bolezni ali pri žrebetih okuženih mater, sta test AGID (angl. agar gel immunodiffusion) in ELISA (angl. enzyme-linked immunosorbent assay). Novejša metoda je še imunoblot tehnika. Čeprav ELISA dokaže protitelesa v zgodnejši fazi in pri nižji koncentraciji kot AGID, se kljub temu kot potrditveni test za pozitivno ELISA uporablja še AGID zaradi lažno pozitivnih rezultatov ELISA. Vse trenutno potrjene diagnostične metode za dokaz okužbe z virusom IAK so osnovane na dokazu prisotnosti protiteles proti antigenu p26 (Montelaro, 1999; OIE, 2008). Priporočila za izbiro seroloških testov so osnovana na podlagi občutljivosti, specifičnosti, stopnje pričakovanih napak in uporabnosti na terenu. Kadar je prevalenca okužbe eden ali več konjev od desetih, so priporočljiva dodatna testiranja poleg seroloških, ker se pričakuje več lažno negativnih rezultatov. Dodaten test pomaga identificirati redke osebe, okužene z virusom IAK,

katerih serum je AGID in ELISA negativen. V takšni situaciji je za potrditev reaktivnosti in za izločitev nekaterih nespecifičnih reakcij dobro zahtevati tudi ponoven odvzem vzorca 10 do 14 dni po prvem vzorčenju, (Issel in sod., 1999).

4.11.1.1 AGID

Za diagnozo IAK so ta test prilagodili Coggins in Nakajima s sodelavci v zgodnjih 1970 (Coggins in Norcross, 1970). V tem obdobju je AGID pridobil mednarodno odobritev in je standard za ostale serološke teste, ki dokazujejo protitelesa proti virusu IAK (Issel in sod., 1999; OIE, 2008).

Antigena, ki sta najbolj reaktivna proti referenčnemu pozitivnemu serumu v AGID, sta p26 in p15. V večini primerov se oblikuje ena sama precipitacijska linija, ki dokaže specifična protitelesa proti virusnemu antigenu p26 (Langemeier in sod., 1996).

Prednost te metode je v dejstvu, da okužba s katerimkoli virusnim izzove nastanek protiteles, ki jih lahko dokažemo z uporabo antigena p26 iz kateregakoli seva. Na začetku je bil antigen za uporabo v AGID pridobljen iz tkiva ledvic konjev z akutnimi znaki IAK, odvzet pred serokonverzijo. Danes pa je antigen najpogosteje pridobljen s pomočjo celičnih kultur, ki so okužene s prilagojenimi sevi, ali pa se uporablja rekombinantni p26, pridobljen iz bakterij. Ena glavnih prednosti AGID je sposobnost razlikovanja med specifičnimi in nespecifičnimi reakcijami. Rezultat je opisan kot pozitiven ali negativen, občasno pa je rezultat nejasen in zato dvomljiv. V tem primeru je zahtevan odvzem drugega vzorca. V mnogih laboratorijih se vzorci z minimalno reakcijo, ki ne tvorijo identifikacijske linije, ampak se referenčna linija odklanja, napačno označijo kot negativni. Takšni tipi reakcij so pri konjih redki, se pa pojavljajo pri oslih in mulah (Issel in sod., 1999).

Slaba stran testa AGID pa je, da je za ostro referenčno linijo, na kateri je osnovana interpretacija rezultatov, zahtevano minimalno 24 ur inkubacije. V nekaterih primerih inkubacija traja tudi 48-72 ur, v drugih primerih pa je interpretacija pozitivnih rezultatov možna že po 4-6 urah, vendar je za uradno poročilo vendarle potrebna najmanj 24 urna inkubacija (Issel in sod., 1999).

4.11.1.2 ELISA

Za odkrivanje protiteles proti antigenom virusa IAK so na voljo različne ELISA. Prvi takšen test je bil kompetitivni ELISA (angl. competitive ELISA-cELISA), ki ga danes proizvaja IDEXX Laboratories (Westbrook). Test izkorišča konjugirana monoklonska protitelesa proti antigenu p26, ki tekmujejo z naravnimi protitelesi iz vzorca za konjugiran antigen (Issel in sod., 1999).

Naslednji ELISA kit, licenciran v ZDA, je bil ELISA s sintetičnim antigenom (SA-ELISA, Centaur Labs). Antigen je sintetični peptid ekstracelularne domene transmembranskega proteina (gp45) (Langemeier in sod., 1996). Največja prednost SA-ELISA je, da je možen dokaz protiteles tudi proti drugim virusnim antigenom. Novejša ELISA je ViraCHEK/EIA (Synbiotics Corp), ki prepozna protitelesa proti antigenu p26 (Issel in sod., 1999).

Vsi tipi ELISA so bolj občutljivi v primerjavi s testom AGID. ELISA rezultati se lahko preberejo spektrofotometrično, zaradi česar so rezultati bolj objektivni in manj odvisni od interpretacije človeka, kot pa pri AGID. (Issel in sod., 1999).

4.11.1.3 »Immunoblot«

»Immunoblot« je imunološka metoda, ki prepozna protitelesa proti več različnim antigenom in je najbolj občutljiv serološki indikator okužbe z virusom IAK. Ta temelji na uporabi več različnih multiple antigenov virusa IAK. Običajno je v testu uporabljen sev, adaptiran na celično kulturo. Za ta test so proteini oddvojeni z elektroforezo in preneseni na nitrocelulozne membrane, kjer so lahko testirani na reaktivnost v serumskih vzrocih. Protitelesa z virusom IAK okuženih živali prepoznajo tri velike proteine gp90, gp45 in gp26, in vsak od teh vsebuje široko reaktivne specifične determinante. V vzorcih z dvomljivim AGID rezultatom, je primerna razredčitev seruma 1:20 za izločanje nespecifičnih barvanj ozadja, potem pa sledi dokaz specifične reaktivnosti na virusne antigene. Za primerjavo naj navedemo, da je serološka diagnoza okužbe s HIV opravljena najprej po principu dokaza, da je vzorec ponovljivo pozitiven proti posameznemu antigenu, šele nato pa je potrjen z uporabo multiplih antigenov v »immunoblot« reakciji (Issel in sod., 1999).

4.11.2 NEPOSREDNO DOKAZOVANJE VIRUSA IAK

4.11.2.1 Izolacija virusa IAK

Virus se lahko izolira iz krvi ali z inokulacijo krvi okužene živali na levkocitne kulture, pripravljene iz neokuženih konjev. Produkcija virusa na kulturah se lahko potrdi z dokazom specifičnega virusnega antigena z ELISA, imunofluorescentnim testom, molekularnimi metodami ali z nadaljnjo inokulacijo v dovzetne konje (biološki poskus). Izolacija virusa se sicer redko izvaja zaradi težavne rasti na kulturi levkocitov. Za postavitev diagnoze izolacija virusa običajno ni potrebna (OIE, 2008).

Tako kot ostali retrovirusi so tudi lentivirusi v tkivnih kulturah pogosto izpostavljeni selektivnim vplivom, ki povečajo pojavnost variacij, ki se v genetskih in bioloških značilnostih močno razlikujejo od izvornih izolatov virusa. Poleg tega lahko virusni proteini, ki se izrazijo v dovzetnih celičnih linijah, pokažejo drugačne biološke učinke kot tisti v celicah primarne kulture (naravne, nespremenjene gostiteljske celice). Zato je raziskovanje molekularnih dogodkov, povezanih z različnimi stanji IAK, zapleteno, saj se patogeni izolati ne morejo z lahkoto razmnoževati na celičnih linijah, na tkivnih kulturah prilagojene virusne linije pa so oslABLJENE (Beisel in sod., 1993).

Terenski, divji sevi virusa IAK se *in vivo* lahko pomnožuje le na kulturah konjskih monocitov ali makrofagov, kjer virus po nekaj dneh povzroči citopatski efekt. Če se ti sevi pomnožujejo na kulturah levkocitov, ohranijo svojo patogenost, medtem ko jih pri inokulaciji na druge celične kulture izgubijo. Sevi, prilagojeni na celično kulturo, se lahko obsežno pomnožujejo na primarnih kulturah konjskih dermalnih celic in na fetalnih konjskih ledvičnih celicah ter v nekaterih nekonjskih celičnih linijah, kot so pasje fetalne celice timusa (Cf2th) ter Fea in FEF, ki so mačje celične linije. Na celične kulture prilagojeni virusni sevi ne povzročajo citopatskega efekta, zato se produkcija virusa v takšnih primerih najlažje potrdi s prisotnostjo virusnih antigenov ali z aktivnostjo reverzne transkriptaze v kulturi (Montelaro, 1999).

4.11.2.2 Dokazovanje virusa IAK z molekularnimi metodami

Uporaba verižne reakcije s polimerazo (angl. polymerase chain reaction - PCR) pri virusu IAK se v zadnjih letih pospešeno razvija. S PCR lahko dokažemo provirusno DNA, PCR z uporabo reverzne transkriptaze (RT-PCR) pa dokaže RNA po pomnoževanju. Obe tehniki sta bolj praktični in manj časovno zahtevni kot izolacija virusa. Presenetljivo visoka koncentracija virusa je bila prisotna pri nekaterih kopitarjih brez kliničnih znakov bolezni, kar opozarja na potrebo po kontroli inaparentnih nosilcev virusa IAK (Issel in sod., 1999).

Detekcija provirusne DNA v krvnih celicah s PCR je občutljiva in specifična metoda ne le pri odkrivanju subklinično obolelih živalih, ampak tudi pri nedavno okuženih konjih, ki še niso razvili protitelesnega imunskega odgovora, in tudi pri okuženih žrebetih, ki še imajo kolostralna protitelesa, katera interferirajo s serološkimi testi (Issel in Coggins, 1979; Issel in Cook, 1993).

Zaenkrat še ni podatkov o popolnoma razvitem senzitivnem in specifičnem PCR testu. PCR, razvit in dodelan na levkocitih periferne krvi naravno okuženih konjev lahko igra pomembno vlogo pri prepoznavanju okuženih konjev (Nagarajan in Simard, 2001).

V raziskavi na Irskem so s PCR dokazovali sekvenco *gag* virusa IAK (EIAV_{Ire}). Glede na to, da je do izbruha na Irskem prišlo zaradi vnosa virusa s celinskega dela Evrope, bi lahko bila ta analiza uporabna tudi v drugih državah. V nekaterih primerih je bil PCR bolj občutljiv kot AGID, v nekaterih pa je dal točen rezultat, medtem ko je bil AGID rezultat nejasen. Visoko število kopij virusnih nukleinskih kislin v vranici in jetrih potrjuje, da so ti z makrofagi bogati organi predominantna mesta za virusno replikacijo. Podobne patogene fenotipe virusa so ugotovili kljub različnim variantam v genski sekvenci (npr. EIAV_{Ire} in IEAV_{wyo}), torej tudi z različnim genotipom. Deloma je to rezultat ohranjanja sekvence kritičnih delov znotraj Gag, možno pa je tudi, da ima virus različno aminokislinsko sestavo, vendar ohranja enake trodimenzionalne strukturne in funkcionalne značilnosti antigenov (Quinlivan in sod., 2007).

4.12 POTRDITEV BOLEZNI

Bolezen je po slovenskih predpisih uradno potrjena, če so podani klinični znaki in so hkrati tudi izvidi diagnostičnih preiskav pozitivni, v nasprotnem primeru je bolezen uradno izključena (VURS, 2009).

IAK je na seznamu OIE (International Organization for Animal Health) in spada med obvezno prijavljive bolezni. V skladu z Zakonom o veterinarskih merilih skladnosti iz leta 2006 je treba vsak sum, da se je pojavila IAK, takoj prijaviti najbližji veterinarski organizaciji. Rejci živali morajo biti pozorni na pojav kliničnih znakov bolezni ter dosledno izvajati ukrepe biološke varnosti (OIE, 2008; VURS, 2009).

4.12.1 UKREPI IN ZATIRANJE BOLEZNI

IAK se zatira v skladu s Pravilnikom o ukrepih za ugotavljanje, preprečevanje širjenja in zatiranje kužne malokrvnosti konj iz leta 2006. V skladu z 8. členom pravilnika morajo biti vsi kopitarji, ki se odpremljajo na trge, sejme, razstave, tekmovanja ali druga zbiranja živali ter ob spremembi lastništva, enkrat na leto serološko pregledani na IAK. Rezultat mora biti vpisan v identifikacijski dokument kopitarja. Ta pregled ni potreben za kopitarje, ki se odpremljajo v zakol. V skladu s sklepi Državnega središča za nadzor bolezni (DSNB) je treba vse pozitivne kopitarje izločiti v zakol ali evtanizirati. Zelo pomembno je, da se rejci oziroma imetniki konj zavedajo, da lahko predstavljata ilegalni uvoz in naselitev živali iz nepreverjenih rej največje tveganje za pojav kužne malokrvnosti konj in tudi za druge bolezni. Ob izpolnjevanju vseh predpisanih pogojev je tveganje za širjenje bolezni relativno majhno (VURS, 2009).

4.13 PREVENTIVA IN KONTROLA IAK

Kontrola prenosa IAK se vrši z različnimi postopki k preprečevanju prenosa okužene krvi na druge konje, z zmanjšanjem populacije insektov in predvsem z odkrivanjem in izločitvijo serološko pozitivnih konjev. Ukrepi za

preprečevanje širjenja bolezni so še izločanje in separacija sumljivih živali, paša, ki je oddaljena od gozdnih površin, zavetje za živali pred piki žuželk, manj učinkovit je uporaba repelentov in insekticidov. Verjetno najpomembnejši dejavnik v preventivi IAK pa je redno izvajanje presejalnih testov (monitoring) v populaciji konj (Kuhar in sod., 2009).

Trenutno ne obstaja učinkovito cepivo za preventivo okužbe in nastanka bolezni. Glavni izziv pri razvoju učinkovitega cepiva je, kako premagati antigensko raznolikost virusa. Sposobnost imunskega sistema z virusom IAK okuženih konjev, da omogoči imunski nadzor nad virusno replikacijo in boleznijo nam daje vedeti, da je teoretično popolnoma mogoče razviti učinkovino cepivo. Obstaja sicer živo atenuirano cepivo, razvito na podlagi raziskav na ponavljajočih pasažah v opičjih celicah, ki so jo s 70% učinkovitostjo v zgodnjih 80. letih uporabili na Kitajskem in na Kubi. To cepivo je bilo v teh državah aplicirano milijonom konjev z veliko varnostjo in učinkovitostjo, vendar je v zahodnem svetu o tem cepivu le malo poznanega. (Montelaro, 1999; Desrosiers, 2007; Nagarajan in Simard, 2007;).

Zanimivo je, da so raziskave z virusom IAK okuženih kopitarjev, s SIV ali HIV-1 okuženih opic in HIV-1 okuženih ljudi razkrile skupno pot dozorevanja protiteles, ki se kaže v spremembah titrov protiteles, konformacijski odvisnosti in protitelesni aktivnosti. Razvoj učinkovitega cepiva proti HIV-1 in HIV-2 je glavni cilj tega stoletja. Natančno poznana naravna sposobnost okuženih kopitarjev, da učinkovito kontrolirajo virusno replikacijo že po nekaj mesecih, bi lahko pomagala pri dosegu tega cilja (Leroux in sod., 2004).

5. NAMEN IN HIPOTEZA

V Sloveniji se je v začetku leta 2009 pojavilo večje število primerov IAK pri konjih. Ker je okužba z virusom IAK doživljenjska in so okužene živali rezervoar virusa za druge živali, bolezen pa vodi v kronično hiranje, je potrebno zanesljivo in hitro postaviti diagnozo. Virus se prenaša med živalmi preko pikov velikih krvosesnih insektov, zato je širjenje okužbe razmeroma težko zaustaviti in še manj predvideti in nadzorovati. Edini zanesljiv preventivni ukrep je izločanje živali, ki so okužene.

S serološkimi diagnostičnimi metodami bomo v populaciji konjev našli okužene živali, pri takšnih živalih bomo iz vzorca polne krvi ali tkiva vranice izolirali virusno nukleinsko kislino ter determinirali nukleotidno zaporedje virusa, ki nam bo služilo za določanje izvira okužbe in s tem osnovo za raziskovanje molekularne epidemiologije. Poznavanje izvira okužbe se lahko uporabi za pripravo preventivnih ukrepov in za pripravo predpisov, ki zagotavljajo zdravstveno varstvo pred to boleznijo.

V Sloveniji je IAK že dolgo prisotna, vendar še nihče ni opravil molekularne epidemiologije širjenja bolezni ter genetske determinacije izoliranih virusov. Predvidevamo namreč, da bodo sekvence virusov iz različnih rej med seboj drugačne v primerjavi s sekvencami iz reje, kjer smo izolirali virus pri več živalih. S primerjavo sekvenc bi lahko teoretično določili tudi pota okužbe. Dobljene podatke bomo namreč primerjali s podobnimi podatki iz drugih držav.

Znanstveni pomen ima tudi določanje intrauterine okužbe žrebeta, saj so med obolelimi tudi breje živali. Pri transplacentarnem prenosu še vedno veljajo razmeroma stari podatki iz dobe pred molekularno diagnostiko, ki trdijo, da je prenos redek, pri čemer bi lahko z našimi rezultati pomembno podkrepili ali ovrgli to trditev.

Metode, ki jih bomo uporabili pri raziskovanju, so izolacija DNA, merjenje koncentracije DNA, PCR, gelska elektroforeza, sekveniranje genoma.

6. MATERIALI IN METODE

V raziskovalni nalogi smo v letu 2009 zbirali vzorce tistih konjev, ki so bili zaradi pozitivnih rezultatov v cELISA (Idexx) in AGID (Idexx) potrjene, da imajo protitelesa proti virusu IAK. Ker smo želeli z molekularnim testom PCR dokazati virusno nukleinsko kislino, smo pridobili krvne vzorce z antikoagulantnim sredstvom EDTA (etilendiaminotetraocetna kislina), iz katerih smo izolirali levkocite. Od živali, ki so jih v skladu s Pravilnikom o ukrepih za ugotavljanje, preprečevanje širjenja in zatiranje malokrvnosti konj evtanazirali, pa smo pridobili vranice. Iz levkocitov in vranične pulpe smo želeli izolirati virusno DNA in z metodo PCR dokazati prisotnost virusne nukleinske kisline. Od živali smo pridobili še podatka o starosti in občini prebivanja. Vsi podatki o vzorcih so zbrani v Tabeli 1.

Tabela 1: Podatki o vzorcih, uporabljenih v raziskovalni nalogi

ŽIVAL	VZOREC	OZNAKA DNA	STAROST*	OBČINA	REJA
1	VRANICA	EIAV1/09-1	2	VIPAVA	1
2	VRANICA	EIAV1/09-2	1	VIPAVA	1
3	VRANICA	EIAV1/09-3	**	VIPAVA	1
4	KRI EDTA LEVKOCITI VRANICA	EIAV2/09-7 EIAV3/09-2 EIAV4/09-5	5	VIPAVA	1
5	KRI EDTA LEVKOCITI VRANICA	EIAV2/09-8 EIAV3/09-3 EIAV4/09-1	4	VIPAVA	1
6	KRI PLOD VRANICA VRANICA PLOD	EIAV2/09-2 EIAV2/09-4 EIAV2/09-5	15	VIPAVA	1
7	KRI EDTA LEVKOCITI VRANICA	EIAV2/09-9 EIAV3/09-4 EIAV4/09-7	11	VIPAVA	1
8	LEVKOCITI VRANICA VRANICA PLOD	EIAV3/09-5 EIAV4/09-8 EIAV4/09-9	7	VIPAVA	1
9	KRI EDTA LEVKOCITI VRANICA	EIAV5/09-2 EIAV3/09-6 EIAV4/09-2	6	VIPAVA	1
10	KRI EDTA ŽREBE LEVKOCITI ŽREBE	EIAV5/09-3 EIAV3/09-7	**	VIPAVA	1
11	KRI EDTA LEVKOCITI VRANICA VRANICA PLOD	EIAV5/09-4 EIAV3/09-8 EIAV4/09-10 EIAV4/09-11	9	VIPAVA	1
12	KRI EDTA LEVKOCITI VRANICA VRANICA PLOD	EIAV5/09-5 EIAV3/09-9 EIAV4/09-12 EIAV4/09-13	3	VIPAVA	1
13	KRI EDTA LEVKOCITI VRANICA	EIAV5/09-6 EIAV3/09-10 EIAV4/09-3	3	VIPAVA	1
14	KRI EDTA LEVKOCITI VRANICA	EIAV2/09-1 EIAV1/09-6 EIAV1/09-4	9	BOHINJ	2
15	KRI EDTA LEVKOCITI	EIAV5/09-7 EIAV3/09-11	12	IVANČNA GORICA	3
16	KRI EDTA LEVKOCITI VRANICA	EIAV2/09-6 EIAV3/09-1 EIAV2/09-10	7	ORMOŽ	4
17	VRANICA	EIAV7/09-1	9	ŠKOCJAN	5
18	KRI EDTA LEVKOCITI VRANICA	EIAV5/09-8 EIAV3/09-12 EIAV4/09-4	**	CERKLJE NA GORENJSKEM	6
19	KRI EDTA LEVKOCITI	EIAV5/09-9 EIAV5/09-10	7	TREBNJE	7
20	VRANICA	EIAV6/09-1	**	VELIKE LAŠČE	8
21	VRANICA	EIAV6/09-2	**	VELIKE LAŠČE	9
22	VRANICA	EIAV9/09-2	9	ŠKOCJAN	10
23	VRANICA	EIAV10/09-1	15	VODICE	11
24	VRANICA	EIAV10/09-2	7	LJUTOMER	12
25	VRANICA PLOD	EIAV10/09-3	**	LJUTOMER	12

* Starost v letih. ** Nismo uspeli pridobiti podatkov o starosti.

6.1 PRIPRAVA VZORCEV

Za molekularno diagnostiko smo morali najprej ustrezno obdelati vzorce za nadaljnjo preiskavo.

6.1.1 ORGANSKA SUSPENZIJA VRANIC

V preiskavo smo dobili vzorce vranic evtanaziranih konjev, za katere smo zaprosili veterinarske inšpektorje. Organi so bili do priprave zamrznjeni pri -70°C . Iz sredine vzorca smo s škarjami sterilno odvzeli 1 cm^3 velik košček tkiva, ga razrezali na majhne koščke in razredčili v razmerju 1:10 z gojiščem RPMI 1640 (GIBCO; Invitrogen) ter vzorec s homogenizatorjem (IKA ULTRA-TURRAX® Tube Drive) homogenizirali. Za vsak vzorec posebej smo uporabili nov sterilni material. Organsko suspenzijo, ki je nismo uporabili za takojšnjo izolacijo DNA, smo do nadaljnje uporabe shranili v zamrzovalno skrinjo pri -70°C .

6.1.2 KRVNI VZORCI

V naši raziskovalni nalogi smo za izolacijo DNA uporabili tudi vzorce krvi z antikoagulantom etilendiaminotetraocetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic acid - EDTA). Iz dela krvi smo direktno izolirali DNA, iz preostanka krvi pa smo izolirali levkocite. Delu krvi za izolacijo levkocitov smo dodali pufer za lizo eritrocitov (angl. red cell lysis buffer - RCLB), pripravljen iz amonijevega klorida, kalijevega bikarbonata in EDTA, v razmerju 1:3 (en del krvi, tri dele RCLB), vsebino premešali in pustili stati 10 minut na sobni temperaturi. Nato smo vzorec centrifugirali (10 minut, 2000 obratov). Supernatant smo zavrgli in dodali enako količino pufra RCLB kot na začetni stopnji. Vzorec smo premešali, centrifugirali (10 minut, 2000 obratov), zavrgli supernatant in dodali fosfatni pufer brez pozitivno nabitih ionov (angl. phosphate buffered saline, v nadaljevanju PBS-A) v razmerju 1:3 glede na začetno količino krvi. Vzorec smo ponovno centrifugirali (10 minut, 2000 obratov) in odlili supernatant. Izolirane levkocite smo razredčili v gojišču RPMI 1640 in jih do nadaljnje uporabe shranili pri -70°C .

6.2 IZOLACIJA DNA

Iz prej omenjenih vzorcev smo izolirali DNA z uporabo DNeasy, Blood&Tissue Kit (Qiagen). Izolacijo smo izvajali v prostoru, namenjenem izolaciji DNA, uporabljali smo rokavice, potrošni material, prost RNAz, ter pipetne nastavke s filtri v izogib kontaminaciji vzorcev.

Po navodilih proizvajalca smo v epico odpipetirali 20 µl Proteinaze K, dodali 200 µl organske suspenzije ali levkocitov ter 200 µl AL pufra in epico pulzno vorteksirali. V primeru krvnega vzorca smo najprej odpipetirali 60 µl krvi z EDTA v epico, dodali 150 µl RPMI, premešali, v novo epico odpipetirali 200 µl vzorca in 20 µl Proteinaze K. Nato smo vzorce inkubirali (vzorce levkocitov 10 minut, organske suspenzije pa 60 minut) pri 56°C in ob rahlem tresenju (Thermomixer compact; Eppendorf).

Pri vsakem poskusu smo v test vključili tudi negativno kontrolo, in sicer NFW H₂O (angl. nuclease free water).

Po inkubaciji smo v epico dodali 200 µl 96% etanola, premešali in centrifugirali. Vsebinsko epice smo odpipetirali na kolono, centrifugirali (1 minuta pri 8000 obratih), filtrat iz zbirne epruvete zavrgli, kolono prenesli v novo zbirno epruveto, dodali 500 µl AW1 pufra, centrifugirali (1 minuta pri 8000 obratih), kolono prenesli v novo zbirno epruveto in dodali 500 µl AW2 pufra. Po centrifugiranju (3 minute pri 14000 obratih) smo kolono prenesli v sterilno epico in dodali 100 µl AE pufra. Po 5 minutni inkubaciji na sobni temperaturi in centrifugiranju (1 minuta pri 8.000 obratih) smo izolirano in raztopljeno DNA v NFW H₂O shranili v zamrzovalniku pri -20°C.

6.2.1 MERJENJE KONCENTRACIJE CELOKUPNE DNA

Koncentracijo celokupne DNA naših vzorcev smo izmerili po navodilih Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kits (Invitrogen), ki je primeren za merjenje koncentracije DNA s fluorometrom (Qubit™, Invitrogen). Delovno razredčino smo pripravili z redčenjem Quant-iT dsDNA BR reagenta s pufrom Quant-iT dsDNA BR buffer v razmerju 1:200. Po 190 µl delovne razredčine smo odpipetirali v epici za standarde, dodali 10 µl Quant-iT standarda (Standard

#1, Standard #2) in premešali. 195 μ l delovne raztopine smo dodala po 5 μ l izolirane DNA. Nato smo flourometer (Qubit™) najprej umerili s standardoma, nato pa izmerili koncentracijo DNA naših vzorcev v μ g/ml.

6.3 PCR

Z metodo PCR smo pomnoževali 285 nukleotidov dolg odsek virusnega genoma, ki se nahaja na sredini regije LTR in začetnem delu gena *gag*.

6.3.1 IZBOR ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV

Za raziskovalno nalogo smo uporabili začetne oligonukleotide, ki so jih opisali Quinlivan in sodelavci leta 2007 (Quinlivan in sod., 2007), vendar smo jih na podlagi prileganja sekvenc iz genske banke NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) z naslednjimi dostopnimi številkami (angl. accession number): AF016316, AF028231, AF028232, AF033820, AF247394, AF327877, AF327878, M16575 in UO1866, priredili. S programom Clustal X smo izvedli prileganje teh sekvenc, izbrali več parov začetnih oligonukleotidov ter na podlagi internetnega programa Integrated DNA Technologies izbrali najprimernejši par, ki je predstavljen v tabeli. Začetni oligonukleotid EIAV F1 se nahaja znotraj regije LTR, začetni oligonukleotid EIAV R1 pa na začetku regije *gag* (Quinlivan in sod., 2007).

Tabela 2: Začetna oligonukleotida, uporabljena v raziskovalni nalogi

ime začetnega oligonukleotida	sekvenca (5' proti 3')	mesto nahajanja ^a
EIAV F1	TGCGGTCTGAGTCCCTTCTC	206-225
EIAV R1	ACTTCTTGAGCGCYTTGCTC	470-490

^a glede na referenčni genom EIAV_{UK} (GenBank AF016316)

6.3.2 REAKCIJSKA MEŠANICA ZA PCR

Po navodilih proizvajalca (Invitrogen) smo pripravili reakcijsko mešanico za PCR: 5 μ l 10 X PCR pufra, 1.5 μ l 50 mM MgCl₂, 1 μ l 10 mM dNTP, 35,3 μ l ddH₂O, po 1 μ l začetnega oligonukleotida EIAV F1 in EIAV R1 (20 pmol/ μ l) ter 1 U Platinum® *Taq* polimeraze. K pripravljene reakcijski mešanici smo dodali 5 μ l

izolirane DNA. Končni volumen reakcijske mešanice je bil 50 μ l. PCR je potekala v avtomatskem termopomnoževalniku T3 Thermocycler (Biometra). Na podlagi več poskusov z različnimi temperaturami prileganja smo ugotovili, da smo najboljši rezultati dobili pri temperaturi prileganja 60°C. Tako je po navodilih proizvajalca najprej 2 minuti pri 94°C potekala denaturacija in aktivacija encima. Nato je sledilo 35 ponovitev naslednjega ciklusa: denaturacija 30 sekund pri 94°C, vezava začetnih oligonukleotidov 30 sekund pri 60°C, podaljševanje 1 minuto pri 72°C. Nato je sledilo ohlajanje produktov PCR pri 4°C. PCR produkte smo do nadaljnje uporabe shranili pri -20°C.

6.4 GELSKA ELEKTROFOREZA

Za dokaz specifične velikosti produktov PCR smo uporabili metodo dokazovanja velikosti produktov z elektroforezo v 1,8% agaroznem gelu, pripravljenem iz 1,8 g agaroze v prahu (Invitrogen, ZDA) in 100 ml TAE (Tris-Acetat-EDTA) pufra. PCR produkte smo obarvali z nanašalnim pufrom, sestavljenem iz 25% bromfenol modrila, 0,25% ksilen cianola in 40% saharoze v 5 mM EDTA, v razmerju 1:5 (3 μ l barvila, 15 μ l vzorca) in vsak vzorec prenesli v posamezno jamico na gelu. Na koncu smo dodali še 5 μ l standarda DNA (100 bp DNA Ladder, Promega, ZDA), in sicer mešanico 2 μ l nanašalnega pufra in 3 μ l standarda. Po končani elektroforezi je bilo potrebno gel še obarvati v etidijevem bromidu za 15 minut. Nato smo gel slikali z UV transiluminatorjem (GelDoc1000, Biorad).

6.5 SEKVENCIRANJE PCR PRODUKTOV

6.5.1 ČIŠČENJE PRODUKTOV

Ker smo želeli analizirati sekvence izolirane DNA, smo morali produkte pomnoževanja s PCR očistiti. V ta namen smo produkte nanesti na agarozni gel v vsako drugo jamico in ponovili postopek, opisan v prejšnjem poglavju (6.4). produkte pomnoževanja s PCR, velike 285 bp, smo na UV transiluminatorju vsakega posebej, s sterilnim skalpelom izrezali iz gela in jih očistili po navodilih proizvajalca Promega (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega Corporation).

Izrezane produkte smo dodali po 10 µl Membrane Binding Solution (MBS) na 10 mg vzorca. Vzorce smo ob rahlem stresanju inkubirali 10 minut pri 56°C. Nato smo raztopljeni vzorec odpipetirali na kolono in centrifugirali (1 minuta na 16000 obratih). Vsebino zbirnih epruвет smo zavrgli in na kolono odpipetirali po 700 µl Membrane Wash Solution (MWS) z dodanim etanolom ter centrifugirali (1 minuta na 16000 obratih). Vsebino zbirnih epruветk smo ponovno odlili ter nanegli na kolono 500 µl MWS. Nato smo vzorce centrifugirali (5 minut na 16000 obratih), vsebino odlili ter ponovno centrifugirali (1 minuta na 16.000 obratih). Kolone smo prenesli v epice, dodali po 50 µl ddH₂O, inkubirali 1 minuto na sobni temperaturi, nato pa centrifugirali (1 minuta na 16.000 obratih). Tako pripravljene filtrate s prečiščenim produktom pomnoževanja s PCR smo do pošiljanja na sekvenčno analizo (Macrogen Inc, Korea) shranili pri -20°C.

6.6 ANALIZA PCR PRODUKTOV

6.6.1 UREJANJE SEKVENC

Izpise sekvenčnih reakcij smo obdelali z računalniškim programom družbe DNASTAR (Lasergen, ZDA) in nekaterimi na internetu dostopnimi programi. Tako smo uporabili program SeqMan™ II, ki omogoča analizo posamezne ali več sekvenc hkrati. S tem programom smo poravnali sekvenci, ki smo ju dobili pri sekveniranju istega vzorca z dvema začetnima oligonukleotidoma. Preverili smo, če se ujemata v vseh nukleotidih po celotni dolžini odseka. Urejeno sekvenco smo shranili v programu EditSeq pod imenom izolata.

Za urejanje posamezne sekvence smo uporabljali tudi program BLAST (Basic local alignment search tool), ki je prosto dostopen na internetnem naslovu <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, s katerim smo primerjali preiskovano sekvenco s sekvencami, dostopnimi v genski banki (GenBank). S tem programom smo lahko preverili našo sekvenco, morebitno insercijo, delecijo ali zamenjavo posameznih nukleotidov in s tem ugotovili delež homologije med našo in primerjanimi sekvencami (Toplak, 2004).

S programom ClustalW smo poravnali izbrana nukleotidna zaporedja naših sekvenc ter analizirali odstotek enakosti oziroma različnosti med sekvencami.

7. REZULTATI

7.1 REZULTATI MERJENJA KONCENTRACIJE CELOKUPNE DNA

V vzorcih, iz katerih smo izolirali DNA, smo želeli izmeriti koncentracijo celokupne genomske DNA in s tem preveriti, v katerih vzorcih je koncentracija DNA večja. V ta namen smo izmed vseh izbrali po 7 krvnih vzorcev, 7 vzorcev levkocitov in 7 vzorcev vranic. V vzorcih krvi z EDTA smo izmerili od 3,3 do 20,7 µg DNA v 1 ml vzorca. V vzorcih levkocitov je bila koncentracija DNA od 28,5 µg/ml do 73,2 µg/ml. V vzorcih vranice pa smo izmerili od 128,2 do 539,5 µg DNA v 1 ml vzorca (Tabela 3).

Tabela 3: Rezultati merjenja koncentracije celokupne DNA

VZOREC	DNA	koncentracija DNA (µg/ml)
KRI EDTA	EIAV2/09-2	3,3
KRI EDTA	EIAV2/09-3	4,0
KRI EDTA	EIAV2/09-7	20,7
KRI EDTA	EIAV2/09-8	15,2
KRI EDTA	EIAV2/09-11	11,8
KRI EDTA	EIAV5/09-1	8,3
LEVKOCITI	EIAV3/09-2	48,9
LEVKOCITI	EIAV3/09-3	60,7
LEVKOCITI	EIAV3/09-4	28,5
LEVKOCITI	EIAV3/09-5	55,5
LEVKOCITI	EIAV3/09-6	36,8
LEVKOCITI	EIAV3/09-7	54,0
LEVKOCITI	EIAV3/09-8	73,2
VRANICA	EIAV4/09-1	400,2
VRANICA	EIAV4/09-2	340,9
VRANICA	EIAV4/09-3	200,0
VRANICA	EIAV4/09-4	128,2
VRANICA	EIAV4/09-5	350,1
VRANICA	EIAV4/09-6	539,5
VRANICA	EIAV4/09-7	382,2

7.2 REZULTATI IZOLACIJE VIRUSNE DNA

Skupno smo pregledali vranice 26 živali, od tega 21 odraslih živali in 5 vranic plodov, ter 14 vzorcev krvi z EDTA in 14 vzorcev levkocitov (Tabela 1). Iz vseh vzorcev smo izolirali DNA in z začetnima oligonukleotidoma EIAV F1 in EIAV R1 z metodo PCR pomnoževali 285 nukleotidov dolg odsek virusne nukleinske kisline, ki sega od sredine regije LTR do začetka gena *gag*.

7.2.1 REZULTATI GELSKE ELEKTROFOREZE

Vse produkte pomnoževanja s PCR smo nanesti na agarozni gel in z gelsko elektroforezo ločili produkte. Če je bil v produktu prisoten produkt, velik 285 bp, je bila v vzorcu dokazana prisotnost virusa IAK (Slika 4).



Slika 4: Primer elektroforetske ločitve produktov pomnoževanja s PCR, velikih 285 bp (baznih parov). EIAV1/09-1, EIAV1/09-2, EIAV1/09-3, EIAV1/09-4, EIAV1/09-6 - pozitivni vzorci, EIAV1/09-7, EIAV1/09-8 - negativna vzorca, -K - negativna kontrola, M - standard DNA velikosti 100 bp.

7.2.2 REZULTATI DOKAZOVANJA VIRUSNE DNA

V vseh 21 vranicah odraslih živali smo potrdili prisotnost virusne nukleinske kisline, medtem ko pri vranicah petih plodov virusne nukleinske kisline nismo dokazali (Tabela 4). Od 14 vzorcev krvi z EDTA smo s PCR dokazali virusno DNA le v treh vzorcih (Tabela 5). V treh od 14 vzorcev levkocitov smo uspeli dokazati prisotnost virusne DNA (Tabela 6). Virusno DNA smo v vzorcih krvi z EDTA in levkocitih dokazali pri istih vzorcih (žival št. 11, 13 in 14).

Tabela 4: Rezultati dokazovanja virusne DNA v vzorcih vranic

ŽIVAL	OZNAKA DNA	REZULTAT PCR
1	EIAV1/09-1	POZ
2	EIAV1/09-2	POZ
3	EIAV1/09-3	POZ
4	EIAV4/09-5	POZ
5	EIAV4/09-1	POZ
6	EIAV2/09-4	POZ
6	EIAV2/09-5	NEG*
7	EIAV4/09-7	POZ
8	EIAV4/09-8	POZ
8	EIAV4/09-9	NEG*
9	EIAV4/09-2	POZ
10	EIAV4/09-10	POZ
11	EIAV4/09-11	NEG*
12	EIAV4/09-12	POZ
12	EIAV4/09-13	NEG*
13	EIAV4/09-3	POZ
14	EIAV1/09-4	POZ
16	EIAV2/09-10	POZ
17	EIAV7/09-1	POZ
18	EIAV4/09-4	POZ
20	EIAV6/09-1	POZ
21	EIAV6/09-2	POZ
22	EIAV9/09-2	POZ
23	EIAV10/09-1	POZ
24	EIAV10/09-2	POZ
25	EIAV10/09-3	NEG*

* Vranica ploda

Tabela 5: Rezultati dokazovanja virusne DNA v vzorcih krvi z EDTA

ŽIVAL	OZNAKA DNA	REZULTAT PCR
4	EIAV2/09-7	NEG
5	EIAV2/09-8	NEG
6	EIAV2/09-2	NEG
7	EIAV2/09-9	NEG
9	EIAV5/09-2	NEG
10	EIAV5/09-3	NEG
11	EIAV5/09-4	POZ
12	EIAV5/09-5	NEG
13	EIAV5/09-6	POZ
14	EIAV2/09-1	POZ
15	EIAV5/09-7	NEG
16	EIAV2/09-6	NEG
18	EIAV5/09-8	NEG
19	EIAV5/09-9	NEG

Tabela 6: Rezultati dokazovanja virusne DNA v vzorcih levkocitov

ŽIVAL	OZNAKA DNA	REZULTAT PCR
4	EIAV3/09-2	NEG
5	EIAV3/09-3	NEG
7	EIAV3/09-4	NEG
8	EIAV3/09-5	NEG
9	EIAV3/09-6	NEG
10	EIAV3/09-7	NEG
11	EIAV3/09-8	POZ
12	EIAV3/09-9	NEG
13	EIAV3/09-10	POZ
14	EIAV1/09-6	POZ
15	EIAV3/09-11	NEG
16	EIAV3/09-1	NEG
17	EIAV3/09-12	NEG
19	EIAV5/09-10	NEG

7.2.3 PORAVNAVA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ

Vse produkte PCR, v katerih smo dokazali prisotnost virusne nukleinske kisline, smo izrezali iz gela in jih očistili po postopku, opisanem v podpoglavju Čiščenje produktov. Očiščene produkte smo poslali na sekvenčno analizo. Izpise sekvenčnih reakcij smo z računalniškimi programi obdelali in izbrana nukleotidna zaporedja poravnali (Slika 5).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
EIAV4-09-8  TGCTGGGCTA--ACAAGCCTTGATAATAAATATA--ATTCTCTGCTTAGTCCCTGTTTCCAAGTCTTGTGTTTCAA-GAT
EIAV4-09-10  .....
EIAV2-09-4  .....
EIAV4-09-1  .....
EIAV4-09-3  .....
EIAV1-09-3  .....
EIAV1-09-2  .....
EIAV4-09-7  .....
AF327878    .....GACT.T.....G.....GG.....CTT.GT.T.....
AF327877    .....-ACT.T.....G.....C.....CTT.GTCT.....-G.
EIAV9-09-2  .....-T.....TG.....A.C.AGT...TG.ATT..T.T.....
EIAV2-09-10 .....--GCT.....ACC.....TA.....C.-.....-T...T.A-...G.A...
EIAV6-09-1  .....-A.T.....ACC.....TA.....C.-.....T.....G...G...
EIAV1-09-4  .....--A.A.....CT.....C...T...CG.T...T.....
EU240733    .....-A.A.G.....CT.....A.C...T...G.T...TA...CT.GG.T...
AB008196    .....G--A.A.G.....TG.....A.C.....C.T.GT.T...GT.CG--
U01866      .....G--A.A.G.....TG.....A.C.....C.T.GT.T...GT.CG--
AB008197    .....G--A.A.G.....TG.....A.C.....C.T.GT.T...GT.CG--
Clustal Consensus *****          *****          ***** **          *          *          *          *
      110     120     130     140     150     160     170     180
EIAV4-09-8  AACAGGGACCTGAGAGGGGCGCAGACCTGCTGAACCTGGCTGATCGTAGGATCCCTAGGGCGGCAGAGGAGAAGCTTAC
EIAV4-09-10  .....
EIAV2-09-4  .....
EIAV4-09-1  .....
EIAV4-09-3  .....
EIAV1-09-3  .....
EIAV1-09-2  .....
EIAV4-09-7  .....
AF327878    .....---.....A.....A.A.....
AF327877    .....A.---.....A.A.....
EIAV9-09-2  .....A.....A.....
EIAV2-09-10 .....A...T...A.....A.....G.
EIAV6-09-1  .....A...T...A.....
EIAV1-09-4  .....A.....A.A.....
EU240733    .....A.....A.A.....
AB008196    .....A...T...CG.A.A.....
U01866      .....A...T...CG.A.A.....
AB008197    .....A...T...CG.A.A.....
Clustal Consensus ***** **          *****          *****          *****          * * *****
      210     220     230     240     250
EIAV4-09-8  GTTCTGGCCACAACACAGGAGGACAGGTAAGATGGGAGACCCCGTGACATG
EIAV4-09-10  .....
EIAV2-09-4  .....
EIAV4-09-1  .....
EIAV4-09-3  .....
EIAV1-09-3  .....
EIAV1-09-2  .....
EIAV4-09-7  .....
AF327878    ..C.....A.....T.TT.....
AF327877    ..C.....A.....T.TT.....
EIAV9-09-2  ..C.....A.....A.....
EIAV2-09-10 .....C.....G.G.....A.....AC.A.....
EIAV6-09-1  ..C.....A.....A.....AC.C.C..
EIAV1-09-4  ..C.C...G.G...A.....AC.....
EU240733    ..C.....G.G.....A.....A.....
AB008196    ..C.....G.....TT.....
U01866      ..C.....G.....TT.....
AB008197    ..C.....G.....TT.....
Clustal Consensus *** * ***** * ***** *****          * * * **

```

Slika 5: Poravnava nukleotidnih zaporedij 12 slovenskih virusov IAK (EIAV4-09-8, EIAV4-09-10, EIAV2-09-4, EIAV4-09-1, EIAV4-09-3, EIAV1-09-3, EIAV1-09-2, EIAV4-09-7, EIAV9-09-2, EIAV2-09-20, EIAV6-09-1, EIAV1-09-4) in šestih sevov

iz genske banke (AF327878, AF327877, EU240733, AB008196, UO1866, AB008197).

7.2.4 ODSOTOK IDENTIČNOSTI IN RAZLIČNOSTI

Iz poravnave nukleotidnih zaporedij slovenskih izolatov in sevov iz genske banke smo oblikovali še tabelo, v kateri je prikazan odstotek identičnosti in različnosti med posameznimi virusnimi nukleotidnimi zaporedji (Slika 6).

Iz poravnave nukleotidnih zaporedij slovenskih sevov IAK je razvidno, da so zaporedja EIAV4-09-1, EIAV4-09-7, EIAV4-09-8, EIAV4-09-5, EIAV4-09-3, EIAV4-09-2, EIAV4-09-12, EIAV4-09-10, EIAV3-09-10, EIAV1-09-1, EIAV1-09-2, EIAV1-09-3 in EIAV2-09-4 identična. Ta identična zaporedja izvirajo iz vzorcev živali iz iste reje, in sicer reje 1. Od ostalih zaporedij slovenskih sevov se razlikujejo od 8,7 % do 11,1 %. Primerjava z nukleotidnimi zaporedji izbranih sevov iz genske banke (AB008196, MI6575, AF0163316, UO1866, EU240733, AF327878, AF327877) pa kaže, da se od teh razlikujejo za 9,3 % do 12,6 %.

Nukleotidno zaporedje EIAV2-09-10 se v 10,5 % razlikuje od EIAV9-09-2, v 7,9 % od EIAV1-09-4 in v 6,0 % od EIAV6-09-1. Od sevov iz genske banke AB008196, MI6575, AF0163316, UO1866 in AB008197 se razlikuje v 14,3 %, od AF327878 in AF327877 v 13,8 %, od EU240733 pa v 10,2 %.

Nukleotidno zaporedje EIAV6-09-1 se v 10,4 % razlikuje od EIAV9-09-2 in v 8,8 % od EIAV1-09-4. Od izbranih sevov iz genske banke (AB008196, MI6575, AF327878, AF0163316, AF327877, UO1866 in AB008197) se razlikuje v 13,2 %, od EU249733 pa v 11,1 %.

Nukleotidno zaporedje EIAV9-09-2 se v 9,8 % razlikuje z EIAV1-09-4. S sevi iz genske banke AB008196, MI6575, AF0163316, UO1866 in AB008197 se razlikuje v 11,8 %, s sevoma AF327878 in AF327877 v 11,4 % nukleotidnih zaporedjih, od EU240733 pa se razlikuje v 9,9 %.

Nukleotidno zaporedje EIAV 1/09-4 se v 12,1 % razlikuje od referenčnega seva AF327878, v 11,1 % od AF327877 in v 10,7 % od referenčnih sevov AB008196, MI6575, AF0163316, UO1866 in AB008197. Od referenčnega seva EU240733 se razlikuje v 4,6 %.

8. RAZPRAVA

Virus IAK je član družine *Retroviridae* in pripada rodu *Lentivirus*. Retrovirusi so edinstveni v tem, da kodirajo reverzno transkriptazo. V replikacijskem ciklusu nastane iz virusne RNA dvojnovijačna DNA, ki se kot provirus vključi v gostiteljsko DNA. Replikacijo spremlja visoka frekvenca mutacij (DeVico in sod., 1991, Bakhanashvili in Hizi, 1993).

Glavni znak lentivirusov je genetska raznolikost, ki prispeva k njihovi patogenezi. Virus IAK je med vsemi lentivirusi edinstven v tem, da kljub hitri virusni replikaciji in antigenskim spremembam večina živali preide iz kronične v inaparentno obliko bolezni (Leroux in sod., 2004). Virus IAK je živalski model za študije HIV, zato ga nekateri imenujejo tudi »podeželski bratranec HIV« (Leroux in sod., 2004).

IAK je že dolgo prisotna v svetu in je pogosta bolezen kopitarjev, ki je tudi na seznamu Mednarodnega urada za kužne bolezni (OIE, 2008). Ker je okužba persistentna in neozdravljiva, je potrebno v skladu s Pravilnikom o ukrepih za ugotavljanje, preprečevanje širjenja in zatiranje kužne malokrvnosti kopitarjev bolne živali neškodljivo odstraniti (Pravilnik, 2006).

Provirusno DNA virusa IAK lahko dokažemo s PCR (Langemeier in sod., 1996; Nagarajan in Simmard, 2001; Cook in sod., 2002). Neposreden dokaz virusne nukleinske kisline ima več prednosti. Ta metoda je bolj enostavna in manj časovno potratna kot virusna izolacija, ki zahteva monocitne/makrofagne kulture, ki jih je težko vzdrževati v *in vitro* pogojih za daljše časovno obdobje. Poleg tega metoda PCR omogoča tudi genetsko karakterizacijo virusa (Hines in Maury, 2001).

V letu 2009 je bil v Sloveniji odkrit izbruh IAK (VURS, 2009). Zaradi aktualnosti bolezni smo se odločili molekularno diagnosticirati virus IAK in determinirati virusna nukleotidna zaporedja, kar je prvo takšno delo v Sloveniji.

V tej raziskavi smo v letu 2009 zbirali vzorce serološko pozitivnih konjev. Tem živalim so s testoma ELISA in AGID v serumu ugotovili prisotnost protiteles

proti virusu IAK. Od še živih živali smo pridobili vzorce krvi z EDTA in iz njih izolirali levkocite, od evtanaziranih živali pa smo pridobili vranice.

Tako smo zbrali vzorce 25 konjev iz 12 različnih rej in iz 10 različnih slovenskih občin. Od teh živali smo pridobili tudi podatek o starosti.

Vse vzorce smo ustrezno pripravili za izolacijo DNA. Izolacija DNA je potekala po navodilih proizvajalca. Na podlagi članka (Quinlivan in sod., 2007), v katerem so izolirali prvi Evropski divji izolat (EIAV_{Ire}), smo izbrali možne pare začetnih oligonukleotidov in jih na podlagi nukleotidnih zaporedij iz genske banke priredili. S PCR smo pomnožili 285 nukleotidov dolg odsek, ki se nahaja približno na sredini regije LTR in sega do začetka gena *gag*. Za dokaz specifične velikosti produktov PCR smo uporabili metodo elektroforeze v agaroznem gelu.

Ugotovili smo, da smo iz krvnih vzorcev in vzorcev levkocitov uspeli dokazati virusno DNA le pri treh od štirinajstih vzorcev. Zato menimo, da vzorci krvi in levkocitov niso primerni za dokazovanje provirusne DNA, kar je v skladu z dejstvom, da poteka virusna replikacija v tkivnih makrofagih in ne v levkocitih (Sellon in sod., 1992; Montelaro, 1999). Sklepamo lahko tudi, da je količina virusne nukleinske kisline tako majhna, da je z metodo PCR nismo zaznali. V primeru, ko smo imeli samo vzorec krvi, vranice pa ne, pa bi bil vzrok negativnemu rezultatu lahko tudi neujemanje med začetnimi oligonukleotidi in virusnim nukleinskim zaporedjem zaradi pogostih mutacij. Iz tega sklepamo, da metoda PCR v primeru krvnih vzorcev ni uporabna kot diagnostična metoda dokazovanja provirusne DNA virusa IAK.

V literaturi je opisana izolacija provirusne DNA iz levkocitov oslov, ki so jih okužili s Kitajskim v levkocitih oslavljenim virusom IAK, prilagojenim na osle. Tega so pripravili tako, da so *in vitro* izvedli 124 pasaž na osle prilagojenega virusa IAK v levkocitih osla (Liu in sod., 2001).

Tudi v Kanadi so izolirali genomsko DNA iz vzorcev periferne krvi z EDTA in izoliranih levkocitov, vendar nismo zasledili podatka, iz koliko vzorcev od 54 AGID pozitivnih vzorcev so uspeli izolirati DNA (Nagarajan in Simard, 2007).

Iz tkiva vseh 21 vranic odraslih živalih smo uspeli izolirati virusno DNA. Takšen rezultat smo tudi pričakovali, saj je vranica poleg jeter predominantno mesto

replikacije virusa IAK (Sellon in sod., 1992; Oaks in sod., 1998; Harrold in sod., 2000). Iz vranice so izolirali virusno nukleinsko kislino v več različnih raziskavah. Tako so v Grčiji provirusno DNA uspešno izolirali iz vranic okuženih mul (Spyrou in sod., 2005). Na Irskem pa so virusno DNA in RNA izolirali ne samo iz vranic, ampak tudi iz pljuč, jeter, nadledvičnih žlez, timusa, ledvic in bezgavk (Quinlivan in sod., 2007) in s tem potrdili razširjenost virusa IAK v različnih organih (Cook in sod., 1998; Montelaro, 1999; Desrosiers, 2007).

Želeli smo tudi preveriti intrauterini prenos iz matere na ploda. Pri nobeni od petih vranic plodov nismo izolirali virusne DNA, kar potrjuje redkost tega prenosa, ki je opisana v literaturi (Kemen in Coggins, 1972, Montelaro, 1999). Transplacentalni prenos je namreč zelo redek, vendar se zgodi v primeru, ko pride pri kobilah do akutne klinične oblike IAK in do viremije med brejostjo. V eni izmed študij so v 12 od 52 žrebet, starih 1 do 6 mesecev, katerih matere so bile okužene z virusom IAK, dokazali prisotnost virusa IAK. V neki drugi raziskavi v ZDA pa z metodo RT-PCR niso izolirali virusa IAK pri nobenem od 12 žrebetov, katerih matere so bile okužene z virusom IAK (Mealey, 2007).

V tej raziskavi smo želeli tudi določiti nukleotidno zaporedje odseka virusa IAK, ki smo ga pomnoževali. Izmed 27 pozitivnih vzorcev smo izbrali 12 produktov pomnoževanja s PCR, jih prečistili in jim določili nukleotidno zaporedje. Pri poravnavi nukleotidnih zaporedij tega odseka in primerjanju med našimi izolati smo ugotovili, da so sekvence virusne DNA živali iz reje 1 identične, ostale pa se med sabo razlikujejo od 7,9 % pa do 11,1 %. Zaradi narave virusa in njegove hitre mutacije smo razlike v izolatih iz različnih rej pričakovali. Ko smo primerjali odstotek različnosti med našimi izolati ter med izolati iz genske banke, smo ugotovili od 4,6 % pa do 12,6 % različnost. To so pričakovani rezultati, saj so vsi referenčni sevi, s katerimi smo primerjali naše sekvence, izolirani v drugih državah, in jih s slovenskimi tako nismo mogli primerjati, ker jih še ni. Razlike v izolatih so opisali tudi v različnih študijah (Nagarajan in Simard, 2007; Quinlivan in sod., 2007).

Na Irskem so leta 2007 določili nukleotidno zaporedje gena *gag* virusa IAK, kar je prva sekvenca evropskega seva virusa IAK (Quinlivan in sod., 2007). Ugotovili so, da je ta gen le 80 % do 81 % homologen z ameriškimi in azijskimi sevi, in s tem dokazali, da se sekvence *gag* močno razlikujejo med geografsko

oddaljenimi izolati. Njihovo delo nasprotuje z raziskavami izolatov v ZDA, kjer so trdili, da je gen *gag* močno ohranjen (Leroux in sod., 2004).

Podobno raziskavo so opravili tudi pri naravno okuženih konjih v Kanadi, kjer so določali *gag* genetsko heterogenost virusa IAK. Tudi oni so ugotovili slabšo ohranjenost gena *gag*, kar je v nasprotju s prepričanjem v preteklosti (Nagarajan in Simard, 2007).

Pričujoče delo je prva molekularna analiza virusa IAK v Sloveniji. Razvoj PCR metode za dokazovanje virusa IAK, ki smo jo opisali v tej nalogi, bi lahko pomagal pri odkrivanju tistih živali, ki so okužene, vendar so serološko testirane pred razvojem imunskega odziva. Tudi odkritje okužbe novorojenih živali bi bilo lahko olajšano, saj maternalna protitelesa proti virusu IAK ostanejo prisotna do 6 mesecev, pasivna maternalna ter aktivna okužba pa se z metodama ELISA ali AGID ne razlikujeta (Langemeier in sod., 1996). Poleg tega bi lahko PCR služil kot dodatna metoda pri odkrivanju okuženih konjev v primeru nejasnih rezultatov metod AGID in ELISA.

Ker do sedaj še ni bilo narejene obsežne filogenetske študije, ki bi povzemala stanje po svetu, nismo mogli opraviti filogenetske analize. Vsekakor pa bi morali za filogenetsko študijo pregledati druge odseke genoma, kot so *gag*, *pol* ali *env*. To je delo, h kateremu se želimo usmeriti v prihodnje.

9. ZAKLJUČKI

- To delo opisuje prvo molekularno raziskavo virusa IAK v Sloveniji.
- V letu 2009 smo zbirali vzorce 25 konjev iz 12 različnih rej. Tem živalim so bila z metodama AGID in ELISA dokazana protitelesa proti virusu IAK, zato so jih v skladu s Pravilnikom o ukrepih za ugotavljanje, preprečevanje širjenja in zatiranje kužne malokrvnosti konj, evtanazirali. Od živih živali smo pridobili vzorce krvi z EDTA, iz katere smo izolirali levkocite, od evtanaziranih pa vranice.
- Iz vseh vzorcev smo izolirali DNA, nato pa smo z metodo PCR pomnoževali 285 nukleotidov dolg odsek.
- Za dokaz specifične velikosti produktov PCR smo uporabili metodo dokazovanja velikosti produktov z elektroforezo v agaroznem gelu.
- V vseh vranicah odraslih živali smo dokazali prisotnost virusne nukleinske kisline, medtem ko je v vranicah plodov nismo našli.
- Od 14 vzorcev krvi z EDTA smo s PCR dokazali provirusno DNA le v treh vzorcih.
- Od 14 vzorcev levkocitov smo s PCR dokazali prisotnost virusne nukleinske kisline v treh vzorcih.
- Razlike med nukleotidnimi sekvencami naših izolatov so od 6,0 % do 11,1 %. Nukleotidne sekvence izolatov iz reje 1 so identične.
- Pri primerjanju različnosti med našimi izolati ter med izolati iz genske banke smo ugotovili od 4,6 % pa do 14,3 % različnost.

10. ZAHVALA

Najprej se želim zahvaliti Veterinarski fakulteti in dekanu, prof. dr. Marjanu Koscu, ki je omogočil izvedbo te raziskovalne naloge. Pri raziskovanju tako pomembne in aktualne bolezni sem pridobila pomembne izkušnje, ki mi bodo koristile pri dokončanju študija, še bolj pa pri bodočem delu na področju veterinarstva.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim na Inštitutu za virologijo, še posebno Urški Kuhar, mladi raziskovalki, ki me je uvedla v laboratorijsko delo, mi posredovala svoje izkušnje, mi z veseljem pomagala reševati zagate in probleme ter budno spremljala izdelavo te naloge. Zahvaljujem se tudi doc. dr. Ivanu Toplaku, ki mi je razložil analizo sekvenčnih reakcij in mi pomagal pri urejanju sekvenc.

Posebna zahvala pa gre mentorju, doc. dr. Tadeju Malovrhu, ki mi je zaupal tako odgovorno delo, z vso vestnostjo opravljal poslanstvo mentorja, me spodbujal, usmerjal, a hkrati tudi puščal proste roke pri ustvarjanju, predvsem pa je bil vedno na razpolago za pomoč in pogovor.

11. LITERATURA

Bakhanashvilli M, Hizi A. Fidelity of DNA synthesis exhibition in vitro by the reverse transcriptase of the lentivirus equine infectious anemia virus.

Biochemistry 1993; 32: 7559-67.

Beisel CE, Edwards JF, Dunn LL, Rice NR. Analysis of multiple mRNAs from pathogenic equine infectious anemia virus (EIAV) in an acutely infected horse reveals a novel protein, Ttm, derived from the carboxy terminus of the EIAV transmembrane protein. J Virol 1993; 67: 832-42.

Brangan P, Bailey DC, Larkin JF, Myers T, More SJ. Management of the national programme to eradicate equine infectious anaemia from Ireland during 2006: A review. Equine Vet J 2008; 40: 702-4.

Cheevers WP, Archer BG, Crawford TB. Characterization of RNA from equine infectious anemia virus. J Virol 1977; 24: 489-97.

Coggins L, Norcross NL. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. Cornell Vet 1970; 60:330-5.

Cook RF, Cook SJ, Li FL, Montelaro RC, Issel CJ. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). J Virol Methods 2002; 105: 171-9.

Cook RF, Leroux C, Cook SJ et al. Development and characterization of an in vivo pathogenic molecular clone of equine infectious anemia virus.

J Virol 1998; 72 (2): 1383-93.

Craig JK, Barnes S, Zhang B et al. An EIAV fields isolate reveals much higher levels of subtype variability than currently reported from the equine lentivirus family. Retrovirology 2009; 6: 95.

Cullinane A, Quinlivan M, Nelly M. The 2006 outbreak of equine infectious anaemia in Ireland - new insights into an old disease.

In: 3rd Annual Meeting EPIZONE. Antalya, 2009: 80.

DeVico A, Montelaro RC, Gallo RC, Sarngadharan MG. Purification and partial characterization of equine infectious anemia virus transcriptase.

J Virol 1991; 185: 387-94.

Desrosiers R. Nonhuman lentiviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, eds. Fields virology. 5th ed.

Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 2216-43.

Grom J. Splošna veterinarska virologija.

Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2004: 19.

Hammond SA, Cook SJ, Lichtenstein DL, Issel CJ, Montelaro RC. Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process.

J Virol 1997; 71:3840-52.

Harrold SM, Cook SJ, Cook RF, Rushlow KE, Issel CJ, Montelaro RC. Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids.

J Virol 2000; 74:3112-21.

Issel CJ, Coggins L. Equine infectious anemia: current knowledge.

J Am Vet Med Assoc 1979; 174: 727-33.

Issel CJ, Cook SJ, Cook RF, Cordes TR. Optimal paradigms to detect reservoirs of equine infectious anemia virus (EIAV). J Equine Vet Sci 1999; 19: 728-32.

Jurca J. Splošna mikrobiologija. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1998: 81.

Kemen MJ, Coggins L. equine infectious anaemia: transmission from infected mares to foals. *J Am Vet Assoc* 1972; 161: 496-99.

Koren S, Avšič-Županc T, Drinovec B, Marin J, Poljak M. Splošna medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi, 1998: 23-34.

Kruljc P. Kužne bolezni konj: učbenik za študente veterinarske medicine. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2010: 44-54.

Kuhar U, Završnik J, Usenik A, Malovrh T. Infekcijska anemija kopitarjev na Vipavskem. *Vestn Vet Zborn* 2009; 2: 8-10.

Langemeier JL, Cook SJ, Cook RF, Rushlow KE, Montelaro RC, Issel CJ. Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1481-7.

Leroux C, Cadoré JL, Montelaro RC. Equine infectious anemia virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet Res* 2004; 35: 485-512.

Leroux C, Issel CJ, Montelaro RC. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. *J Virol* 1997; 71: 9627-39.

Ligné M. Mémoire et observations sur une maladie de sang, connue sous le nom d'anémie hydrohémie, cachexie acquise du cheval. *Rec Med Vet Ec Alfort* 1843; 30-44.

Mealey RH. Equine infectious anemia. In: Sellon DC, Long MT. Equine infectious disease. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007: 213-9.

Mealey RH, Fraser DG, Oaks JL, Cantor GH, McGuire TC. Immune reconstitution prevents continuous equine infectious anemia virus replication

in an arabian foal with severe combined immunodeficiency: lessons for control of lentiviruses.

Clin Immunol 2001; 101: 237-47.

Montelaro C. Equine infectious anemia virus (Retroviridae). In: Granoff A, Webster R, eds.

Encyclopedia of virology. San Diego: Academic Press, 1999: 515-22.

More SJ, Anzar I, Bailey DC, Larkin JF, et al. An outbreak of equine infectious anaemia in Ireland during 2006: Investigation methodology, initial source of infection, diagnosis and clinical presentation, modes of transmission and spread in the Meath cluster. Equine Vet J 2008; 40: 706-8.

Nagarajan MM, Simard C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction.

J Virol Methods 2001; 94: 97-109.

Nagarajan MM, Simard C. Gag genetic heterogeneity of equine infectious anemia virus (EIAV) in naturally infected horses in Canada.

Virus Res 2007; 129: 228-35.

Oaks JL, McGiure TC, Ulibarri C, Crawford TB. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection.

J Virol 1998; 72: 7263-9.

OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals : mammals, birds, and bees. Equine infectious anaemia.

Paris: OIE, 2008: 866-70.

Pang H, Kong XG, Sentsui H, et al. Genetic variation of envelope gp90 gene of equine infectious anemia virus isolated from an experimentally infected horse.

J Vet Med Sci 1997; 59: 1089-95.

Payne SL, Rausch J, Rushlow K, et al. Characterization of infectious molecular clones of equine infectious anemia virus. *J Gen Virol* 1994; 75: 425-9.

Pravilnik o ukrepih za ugotavljanje, preprečevanje širjenja in zatiranje kužne malokrvnosti konj (*Anaemia infectiosa equorum*).

Uradni List RS 2006; 99: 10203.

Quinlivan M, Cook RF, Cullinane A. Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anaemia virus based on sequence determination of the *gag* gene. *Vet Rec* 2007; 160: 611-8.

Sabirovic M, Roberts H, Lopez M, Hancock R. International disease monitoring, October to December 2009. *Vet Rec* 2010; 166: 160-2.

Sellon DC, Perry ST, Coggins L, Fuller FJ. Wild-type equine infectious anemia virus replicated in vivo predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. *J Virol* 1992; 66: 5906-13.

Spyrou V, Papanastassopoulou M, Koumbati M, Nikolakaki SV, Koptopoulos G. Molecular analysis of the proviral DNA of equine infectious anemia virus in mules in Greece. *Virus Res* 2005; 107: 63-72.

Tagmyer TL, Craigo JK, Cook SJ, Even DL, Issel CJ, Montelaro RC. Envelope determinants of equine infectious anemia virus vaccine protection and the effects of sequence variation on immune recognition.

J Virol 2008; 82: 4052-63.

Toplak I. Molekularna epidemiologija bovine virusne diareje (BVD) v Slovenskih plemenskih rejah govedi : doktorska disertacija.

Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 200: 45-6.

Tu YB, Zhou T, Yuan XF et al. Long terminal repeats are not the sole determinants of virulence for equine infectious anemia virus.

Arch Virol 2007; 152 (1): 209-18.

VURS. Infektivna anemija kopitarjev - IAK. Ljubljana: VURS (14.9.2009)

http://www.vurs.gov.si/si/zdravje_zivali/infektivna_anemija_kopitarjev_iak

(8.5.2010)

Wang L, Tong G, Liu H et al. Proviral genomic sequence analysis of Chinese donkey leukocyte attenuated equine infectious anemia virus vaccine and its parental virus strain Liaoning. *Sci China* 2002; 45 (1): 57-67.

Zheng YH, Sentsui H, Kono Y, Ikuta K. Mutations occurring during serial passage of Japanese equine infectious anemia virus in primary horse macrophages.

Virus Res 2000; 68: 93-8.