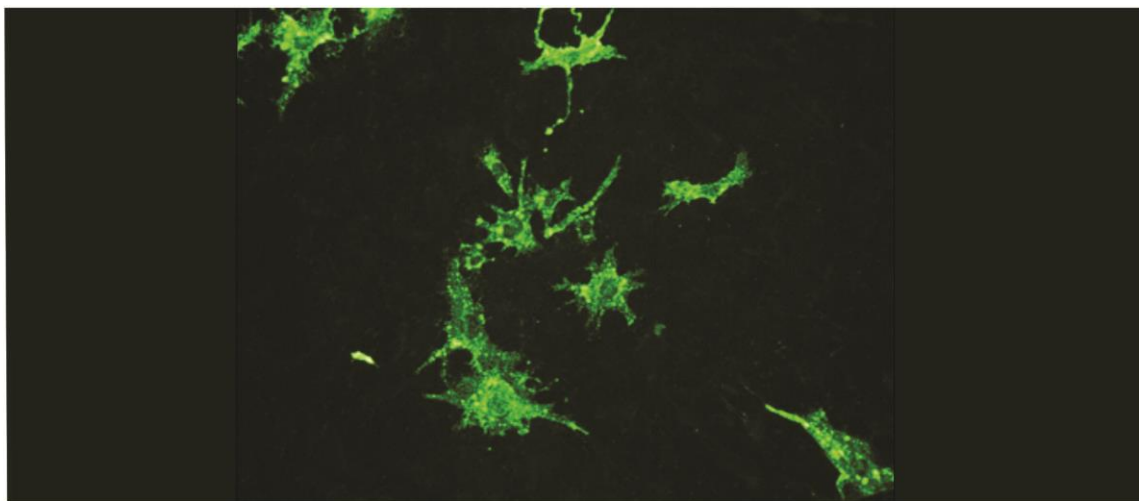
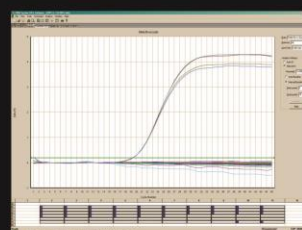
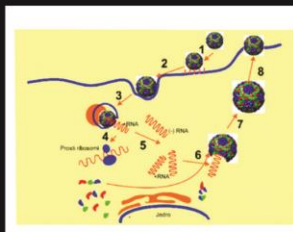
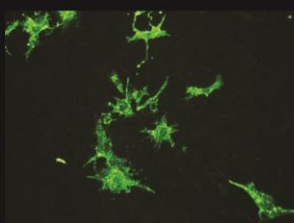


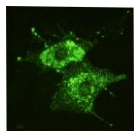


IZBRANA POGLAVJA IZ VETERINARSKÉ VIROLOGIJE



PETER HOSTNIK
Učbenik za študente veterine

Ljubljana, 2013



Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine

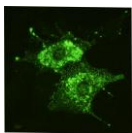
Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta
Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo

IZBRANA POGLAVJA IZ VETERINARSKE VIROLOGIJE

Učbenik za študente drugega letnika Veterinarske fakultete

Peter Hostnik

Ljubljana, 2013



Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta
Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo

IZBRANA POGLAVJA IZ VETERINARSKE VIROLOGIJE

Avtor: prof.dr.Peter Hostnik, dr.vet.med.

Recenzenta: viš.znan.sod.dr.Ivan Toplak, dr.vet.med.
akademik prof.dr. Josip Madić, dr.vet.med.

Lektorica: Vida Meško [vida.mesko@gmail.com]

Oblikovanje:

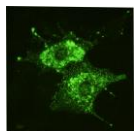
Izdajatelj: Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

Kraj izdaje: Ljubljana

Založnik: Zobozdravstvena ordinacija, Hribar Hostnik Andreja, dr.stom.

Naklada: digitalni tisk

Število izvodov: 100



VSEBINA

DRUŽINE VIRUSOV Z ENOVIJAČNIM DNA GENOMOM

1. *Parvoviridae*

DRUŽINE VIRUSOV Z DVOJNOVIJAČNIM DNA GENOMOM

2. *Papillomaviridae*
3. *Adenoviridae*
4. *Herpesviridae*
5. *Asfviridae*

DRUŽINE VIRUSOV Z ENOJNOVIJAČNIM POZITIVNO ORIENTIRANIM RNA GENOMOM

6. *Picornaviridae*
7. *Flaviviridae*
8. *Arteriviridae*
9. *Coronaviridae*

DRUŽINE VIRUSOV S SEGMENTIRANIM POZITIVNO ORIENTIRANIM RNA GENOMOM

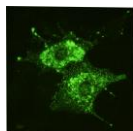
10. *Retroviridae*

DRUŽINE VIRUSOV Z NEGATIVNO ORIENTIRANIM RNA GENOMOM

11. *Paramyxoviridae*
12. *Rhabdoviridae*
13. *Orthomyxoviridae*

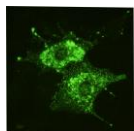
DRUŽINE VIRUSOV Z DVOJNOVIJAČNIM RNA GENOMOM

14. *Reoviridae*



KAZALO VSEBINE

Predgovor	14
DRUŽINE VIRUSOV Z ENOJNOVIJAČNIM DNA GENOMOM	16
1 PARVOVIRIDAE	16
Splošne lastnosti in klasifikacija parvovirusov	16
Zgradba parvovirusov	17
Virusni genom	17
Pomnoževanje parvovirusov	17
VRSTA: PARVOVIRUS PSOV (ANGL. CANINE PARVOVIRUS 2)	19
VRSTA: VIRUS MAČJE PANLEVKOPENIJE (ANGL.: FELINE PARVOVIRUS)	20
VRSTA: PRAŠIČJI PARVOVIRUS - PPV (ANGL.: PORCINE PARVOVIRUS)	21
VRSTA: GOVEJI PARVOVIRUS (ANGL.: BOVINE PARVOVIRUS)	22
Priporočeni študijski viri	22
DRUŽINE VIRUSOV Z DVOJNOVIJAČNIM DNA GENOMOM	23
2 PAPILLOMAVIRIDAE	23
Genom papilomavirusov	24
Dodatni študijski viri:	28
3 ADENOVIRIDAE	29
Splošne lastnosti in klasifikacija adenovirusov	29
Genom adenovirusov	31
Pomnoževanje adenovirusov	31
Diagnostika adenovirusov	33
Dodatni študijski viri:	36
4 HERPESVIRIDAE	37
Splošne lastnosti in klasifikacija herpesvirusov	37
Zgradba herpesvirusov	39
Genom herpesvirusov	40
Diagnostika IBR/IPV – metode za dokazovanje virusa	47
Metode za dokazovanje specifičnih protiteles	49
Cepiva in cepljenje proti IBR/IPV	51
VRSTA: VIRUS KOITALNEGA IZPUŠČAJA KOBIL/EHV-3 (ANGL. EXANTEMA VESICULOSUM COITALE EQUI)	56
VRSTA: HERPESVIRUS PSOV (ANGL. CANINE HERPESVIRUS 1)	56
VRSTA: HERPESVIRUS MAČK (FELINE HERPESVIRUS 1)	56
VRSTA: VIRUS AVIARNEGA INFEKCIOSNEGA LARINGOTRAHEITISA	56
VRSTA: VIRUS MAREKOVE BOLEZNI (GALLID HERPESVIRUS 2),	57
VRSTE: SALMONID HERPESVIRUS 1 IN CYPRINID HERPESVIRUS.	57
Dodatni študijski viri:	57
5 ASFAVIRIDAE	59
VRSTA: VIRUS AFRIŠKE PRAŠIČJE KUGE, APK (ANGL. AFRICAN SWINE FEVER VIRUS)	59
Obstojnost	59
Zgradba virusa APK	59
Genom asfavirusov	60



Pomnoževanje virusa APK	60
Patogeneza virusa APK	61
Epidemiologija	61
Diagnostika okužb z virusom APK	62
Dodatni študijski viri:	65

VIRUSI, KI IMAJO ENOVIJAČNI POZITIVNO ORIENTIRANI RNA GENOMOM 66

6 PICORNAVIRIDAE 66

Splošne lastnosti in klasifikacija pikornavirusov	66
Morfološke značilnosti	68
Virusni genom	69
Pomnoževanje virusa slinavke in parkljevke	70
VRSTA: VIRUS SLINAVKE IN PARKLJEVKE (SIP), (ANGL. FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS, FMD)	71
Patogeneza virusa Slinavke in parkljevke:	73
Odpornost virusa	74
Laboratorijska diagnostika SIP	76
Primer epizootije izbruha SIP v Angliji leta 2001	80
VRSTA: VIRUS VEZIKULARNE BOLEZNI PRAŠIČEV	82
VRSTA: VIRUS TESCHENSKE BOLEZNI	83
VRSTA: VIRUS ENCEFALOMIELITISA PERUTNINE/ (ANGL. AVIAN ENCEPHALOMYELITIS VIRUS)	83
Dodatni študijski viri:	83

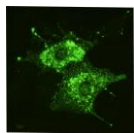
7 FLAVIVIRIDAE 84

Splošne lastnosti in klasifikacija Flavivirusov	84
Zgradba flavivirusov	85
Virusni genoma virusov v družini <i>Flaviviridae</i>	86
Pomnoževanje virusa	86
VRSTA: VIRUS JAPONSKEGA ENCEFALITISA (ANGL. JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS)	88
VRSTA: VIRUS ZAHODNEGA NILA (ANGL. WEST NILE VIRUS, WNV)	88
VRSTA: MURRAY VALLERY ENCEPHALITIS VIRUS	89
VRSTA: ST. LOUIS ENCEPHALITIS VIRUS	89
VRSTA: VIRUS DENGUE	89
VRSTA: VIRUS RUMENE MRZLICE (ANGL. YELLOW FEVER VIRUS)	90
VRSTA: VIRUS KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA (ANGL. TICK-BORNE DISEASE VIRUS)	90
VRSTA: VIRUS LOUPING ILL	90
Bolezni, ki jih povzročajo virusi iz rodu <i>Pestivirus</i>	90
VRSTA: VIRUS GOVEJE VIRUSNE DIAREJE 1 IN 2/MUKOZNE BOLEZNI (ANGL. BOVINE VIRAL DIARHOEA VIRUS 1 AND 2/MUCOSAL DISEASE–BVD/MD)	91
VRSTA: VIRUS BORDERSKE BOLEZNI (ANGL. BORDER DISEASE VIRUS)	93
VRSTA: VIRUS KLASIČNE PRAŠIČJE KUGE, KPK (ANGL. CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS, CSF)	93
Dodatni študijski viri:	96

8 ARTERIVIRIDAE 97

Morfološke značilnosti virusa	97
Genom arterivirusov	98
Pomnoževanje arterivirusov	98
VRSTA: VIRUS KUŽNEGA ARTERITISA KOPITARJEV (ANGL. EQUINE ARTERITIS VIRUS)	100
Diagnostika virusa KAK	101
VRSTA: VIRUS PRAŠIČJEGA REPRODUKCIJSKEGA IN RESPIRATORNEGA SINDROMA (ANGL. PORCINA REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SINDROM VIRUS, PRRS)	103

9 CORONAVIRIDAE 106



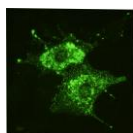
Splošne lastnosti koronavirusov	106
Morfološke značilnosti koronavirusov	107
Virusni genom	108
Pomnoževanje koronavirusov	109
Diagnostika koronavirusnih infekcij	110
VRSTA: VIRUS TRANSMISIBILNEGA GASTROENTERITISA (TGE) IN PRAŠIČJI RESPIRATORNI KORONAVIRUS (ANGL.: TRANSMISIBLE GASTROENTERITIS VIRUS (TGEV) AND PORCINE RESPIRATORY CORONAVIRUS, PRCV)	111
VRSTA: PORCINE HEMAGGLUTINATING ENCEPHALOMYELITIS VIRUS	112
VRSTA: PORCINE ENDEMIC DIARRHEA VIRUS	112
VRSTA: GOVEJI KORONAVIRUS (ANGL. BOVINE CORONAVIRUS)	112
VRSTI: VIRUS KUŽNEGA PERITONEITISA MAČK (ANGL. FELINE CORONAVIRUSIN CANINE CORONAVIRUS)	112
VRSTA: VIRUS KUŽNEGA BRONHITISA PERUTNINE (ANGL. AVIAN CORONAVIRUS)	113
VRSTA: KORONAVIRUS PURANOV (ANGL. TURKEY CORONAVIRUS)	113
ROD TOROVIRUS	113

VIRUSI S SEGMENTIRANIM POZITIVNO ORIENTIRANIM RNA GENOMOM **114**

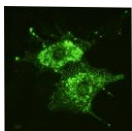
10	RETROVIRIDAE	114
Splošne lastnosti in klasifikacija retrovirusov		114
Morfološke lastnosti retrovirusov		115
Genom retrovirusov		116
Pomnoževanje retrovirusov		116
VRSTA: VIRUS AVIARNE LEVKOZE /AVIAN LEUKOSIS VIRUS		117
VRSTA: VIRUS GOVEJE ENZOOTSKE LEVKOZE (ANGL.: BOVINE LEUKEMIA VIRUS)		118
VRSTA: VIRUS MAČJE LEVKEMIJE (ANGL.: FELINE LEUKEMIA VIRUS (FeLV)		119
VRSTA: FELINE SARKOMA VIRUS		121
VRSTA: VIRUS IMUNSKE POMANJKLIVOSTI PRI MAČKAH (SINONIM: MAČJI AIDS VIRUS, ANGL.: FELINE IMMUNODIFICIENCY VIRUS (FIV)		121
VRSTA: VIRUS INFEKCIOSNE ANEMIJE KOPITARJEV (IAK), (ANGL.: EQUINE INFECTIOUS ANEMIA (EIA)		122
VRSTI: VIRUS KOZJEGA ARTRITISA IN ENCEFALITISA (ANGL: CAPRINE ARTHRITIS ENCEPHALITIS VIRUS) IN VIRUS MAEDI/VISNA (ANGL: VISNA/MAEDIA VIRUS)		123

VIRUSI Z NEGATIVNO ORIENTIRANIM RNA GENOMOM **125**

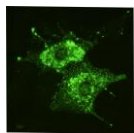
10	PARAMYXOVIRIDAE	125
Splošne lastnosti in klasifikacija paramiksovirusov		125
Zgradba paramiksovirusov		126
Biološki pomen virusnih proteinov		126
Genom paramiksovirusov		128
Pomnoževanje paramiksovirusov		128
VRSTA: VIRUS ATIPIČNE KOKOŠJE KUGE (ANGL. NEWCASTLE DISEASE VIRUS)		129
VRSTA: VIRUS GOVEJE PARAINFLUENCE 3 (ANGL.: BOVINE PARAINFLUENZA 3 VIRUS, PI-3)		131
VRSTA: VIRUS PARAINFLUENCE 2 PRI PSIH (ANGL. CANINE PARAINFLUENZA 2)		132
VRSTA: GOVEJI RESPIRATORNI SINCICIALNI VIRUS (RSV) (ANGL. BOVINE RESPIRATORY SYNCICIAL VIRUS, BRSV)		132
VRSTA: VIRUS PASJE KUGE (ANGL. CANINE DISTEMPER VIRUS)		133
VRSTA: RHINOTRAHEITIS PURANOV		134
VRSTA: PESTE DE PESTIS RUMINANTS VIRUS (PPRV)		134
VRSTA: VIRUS GOVEJE KUGE (ANGL. RINDERPEST VIRUS)		134
11	RHABDOVIRIDAE	136



Splošne lastnosti in klasifikacija rabdovirusov	136
Struktura rabdovirusov	137
Genom rabdovirusov	138
Virusni proteini	139
<i>Kemična sestava rabdovirusov</i>	141
Pomnoževanje virusa stekline	141
VRSTA: VIRUS STEKLINE (ANGL. RABIES VIRUS)	143
Občutljivost virusa:	145
Patogeneza stekline	145
Diagnostika stekline:	146
Dokaz virusnega antigena:	146
Serologija stekline:	148
Razširjenost stekline:	148
Preventiva stekline:	149
STEKLINA IN NJENO ZATIRANJE V SLOVENIJI	149
ROD VESICULOVIRUS	150
VRSTE: VESICULAR STOMATITIS NEW JERSEY VIRUS, VESICULAR STOMATITIS INDIANA VIRUS IN VESICULAR STOMATITIS ALAGOAS VIRUS	150
ROD EPHEMEROVIRUS	151
VRSTA: VIRUS GOVEJE GROZNICE (ANGL. BOVINE EPHEMERAL FEVER VIRUS)	151
RABDOVIRUSI PRISOTNI PRI RIBAH	151
VRSTA: VIRUS HEMORAGIČNE SEPTIKEMIJE POSTRVI (VHS)	151
VRSTA: VIRUS KUŽNE HEMATOPOETSKE NEKROZE POSTRVI (ANGL. INFECTION HAEMATOPOETIC NECROSIS VIRUS)	152
VRSTA: VIRUS POMLADANSKE VIREMIJE KRAPOV (ANGL. SPRING VIRAEMIA OF CARP VIRUS, SVCV)	153
Dodatni študijski viri:	154
12 ORTHOMYXOVIRIDAE	155
Klasifikacija in osnovne lastnosti ortomiksovirusov	155
Genom ortomiksovirusov	158
Pomnoževanje ortomiksovirusov	159
VRSTA: VIRUS INFLUENCE KONJ (ANGL. EQUINE INFLUENZA VIRUS)	160
VRSTE: VIRUS INFLUENCE PRAŠIČEV	161
VRSTA: INFLUENZA PERUTNINE (ANGL. VIRUS AVIARNE INFLUENCE)	162
VRSTA: VIRUS INFLUENCE PSOV / CANINE INFLUENZA VIRUS	163
VRSTA: KUŽNA ANEMIJA LOSOSOV / INFECTIOUS SALMON ANEMIA VIRUS (ISA)	163
Dodatni študijski viri:	164
VIRUSI Z DVOJNOVIJAČNIM RNA GENOMOM	165
13 REOVIRIDAE	165
Splošne lastnosti in klasifikacija reovirusov	165
Morfologija virusa	166
Struktura in funkcije posameznih proteinov	166
Občutljivost virusa	167
Zgradba genoma orbivirusov	168
Pomnoževanje orbivirusov	168
VRSTA: VIRUS BOLEZNI MODRIKASTEGA JEZIKA (ANGL. BLUETONGUE DISEASE VIRUS)	169
VRSTA: VIRUS AFRIŠKE KONJSKE KUGE (ANGL. AFRICAN HORSE SICKNESS VIRUS)	172
DRUGI ORBIVIRUSI:	173
ROD ROTAVIRUS	173

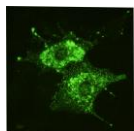


Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine



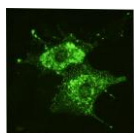
KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica 1: Klasifikacija virusov, pomembnih za veterinarsko medicino znotraj družine Parvoviridae</i>	<i>16</i>
<i>Preglednica 2: Klasifikacija virusov, pomembnih za veterinarsko medicino znotraj družine Papillomaviridae.....</i>	<i>24</i>
<i>Preglednica 3: Razvrstitev adenovirusov pomembnih za veterinarsko medicino z osnovnimi podatki o gostiteljih in kliničnih znakih bolezni.</i>	<i>30</i>
<i>Preglednica 4: Klasifikacija herpesvirusov, pomembnih za veterinarsko medicino po ICTV (http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1).</i>	<i>38</i>
<i>Preglednica 5: V družino Picornaviridae je uvrščenih 12 rodov, za veterino je zanimivih 8, v katere so uvrščeni virusi, patogeni za domače živali.</i>	<i>67</i>
<i>Preglednica 6: Razvrstitev virusa slinavke in parkljevke v serotipe.</i>	<i>68</i>
<i>Preglednica 7: Klasifikacija virusov v družini Flaviviridae pomembnih za veterinarsko medicino...</i>	<i>85</i>
<i>Preglednica 8: Razvrstitev virusov znotraj družine Coronaviridae.</i>	<i>107</i>
<i>Tabela 8: Razvrstitev virusov znotraj družine Retroviridae</i>	<i>115</i>
<i>Preglednica 9: Razvrstitev virusov znotraj družine Paramyxoviridae, pomembnih za veterinarsko medicino.</i>	<i>125</i>
<i>Preglednica 10: Klasifikacija virusov znotraj družine Rhabdoviridae.</i>	<i>137</i>
<i>Preglednica 11: Posamezni rodovi znotraj družine Orthomyxoviridae.</i>	<i>156</i>
<i>Preglednica 12: Klasifikacija virusov znotraj družine Reoviridae.....</i>	<i>166</i>
<i>Preglednica 13: Struktura in funkcije proteinov znotraj družine Reoviridae.....</i>	<i>167</i>
<i>Preglednica 14: Proteini pri rotavirusih.</i>	<i>173</i>

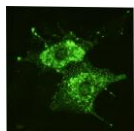


KAZALO SLIK

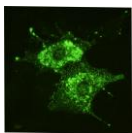
Slika 1: Shematski prikaz parvovirusov.	17
Slika 2: Videz virusa pod elektronskim mikroskopom,	17
Slika 3: Razmnoževalni cikel parvovirusov:	19
Slika 4: Prikaz sorodnosti med parvovirusi psov in mačk.	19
Slika 6: Papilomavirus, posneto s presejalnim elektronskim mikroskopom	24
Slika 5: Shematski prikaz zgradbe papilomavirusov.	24
Slika 7: Deli epitelija, kjer poteka razmnoževanje in sestavljanje govejega papilomavirusa.	26
Slika 8: Shematski prikaz zgradbe adenovirusa.	31
Slika 9: Elektronsko mikroskopski posnetek adenovirusov(http://www.ivdcare.com/adeno.html). ...	31
Slika 10: Replikacijski cikel adenovirusov:	32
Slika 11: Sprememba barve (modra) roženice pri psu se pojavi pri 20% psih okuženih z adenovirusom.....	34
Slika 12: Shematski prikaz herpesvirusov (prilagojeno po; http://dx.doi.org/10.1051/vetres:200661), 23.02.2012.....	40
Slika 13: Elektronsko mikroskopski posnetek herpesvirusa (povzeto po http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016817020900118X , 23.02.2012.)	40
Slika 14: Shema pritrjevanja herpesvirusov na površino celice.	41
Slika 15: Shematski prikaz vstopanja herpesvirusov v celico.	42
Slika 16: Skica prikazuje replikacijski cikel herpesvirusov:	44
Slika 17: Celična kultura linije govejih ledvic AUBEK.	48
Slika 19: Herpesvirus: večjedrne celice z intranuklearnimi inkluzijami (barvano hematoksilin-eozin).....	48
Slika 18: Citopatski efekt (CPE) kot posledica razmnoževanja govejega herpesvirusa na celični kulturi.	48
Slika 20: Epitelne celice, pridobljene z nosnim brisom – pozitiven rezultat na prisotnost virusa IBR/IPV v testu IF.	49
Slika 21: Rezultat SN testa. V jamicah, kjer zaradi prisotnosti specifičnih protiteles ni prišlo do CPE, je dno jamic obarvano modro. Vzorec 1: močno pozitiven, vzorec 2: nizko pozitiven.....	50
Slika 23: Prikaz odstotka rej, okuženih z virusom IBR/IPV v Sloveniji v letu 2006.....	52
Slika 24: Značilne spremembe pri korici gangrenozni.....	54
Slika 26: Elektronski mikroskopski posnetek virusa afriške prašičje kuge	60
Slika 25: Shematski prikaz virusa afriške prašičje kuge	60
Slika 27: Pot širjenja in ohranjanja virusa APK v naravi.	62
Slika 29: Vranica je značilno črne barve.	62
Slika 28: Ledvice; izliv krvi v pelvis z močnimi hemoragijami.	62
Slika 30: Vranica.....	62
Slika 31: Shema prikazuje laboratorijske metode za diagnostiko APK v primeru postavitve suma bolezni	63
Slika 32: Prikaz izvedbe imunoblot testa za dokaz specifičnih protiteles proti virusu APK.	64
Slika 33: Model virusa slinavke in parkljevke, 3D (Povzeto po: http://www.virology.wisc.edu/virusworld/viruslist.php?virus=fmd (24.04.2012).....	68
Slika 33: Morfološki videz virusa slinavke in parkljevke pod elektronskim (povzeto po: http://www.virology.wisc.edu/virusworld/viruslist.php?virus=fmd , 24.04.2012)	68
Slika 34: Shematski prikaz zgradbe virusa slinavke in parkljevke. Zunanji sloj je zgrajen iz proteinov VP1, VP3 in VP3, pod njimi leži še VP4.	69



Slika 35: Vezava proteina VP4 enterovirusov (A) ter virusa slinavke in parkljevke (B) na celični receptor.	69
Slika 36: Organizacija genoma virusa slinavke in parkljevke.	70
Slika 51: Prikaz nastanka perzistentnih izločevalcev virusa.	92
Slika 52: Petehialne krvavitve in hemoragije po ušesih in trebuhu kože94	94
Slika 53: Krivulja prikazuje pojav in količino virusa ter specifičnih protiteles v dnevih po okužbi. ..94	94
Slika 54: Model dokazovanja okužbe z virusom KPK pri prašičih.95	95
Slika 56: Elektronsko mikroskopski posnetek arterivirusa98	98
Slika 55: Shematski prikaz arterivirusa98	98
Slika 57: Prikaz poteka replikacije arterivirusov.....99	99
Slika 58: Splošna shema pomnoževanja genoma virusa EAV.....100	100
Slika 59: Pot širjenja virusa KAK.103	103
Slika 60: Pujski v gnezdu, okuženi z virusom PRRS.....104	104
Slika 62: Elektronsko mikroskopski posnetek koronavirusov108	108
Slika 61: Shematski prikaz koronavirusa.108	108
Slika 63: Shematski prikaz genoma koronavirusov.....109	109
Slika 64: Pomnoževanje koronavirusov110	110
Slika 65: Shematski prikaz retrovirusov.....115	115
Slika 66: Elektronsko mikroskopski posnetek retrovirusov.....115	115
Slika 67: Pomnoževalni krog retrovirusov117	117
Slika 68: Model prenosa virusa aviarne levkoze v naravi.118	118
Slika 70: Elektronako mikroskopski posnetek paramiksovirusa127	127
Slika 69: Shematski prikaz paramiksovirusov127	127
Slika 72: RSV z rastjo na celični kulturi tvori sincicije in inkluzije133	133
Slika 73: Sorodstveni odnosi med vrstami znotraj rodu Lyssavirus s prikazom vrst pri katerih je bila posamezna vrsta potrjena137	137
Slika 75: Elektronsko mikroskopski posnetek virusa stekline138	138
Slika 74: Shematski prikaz zgradbe rabdovirusa138	138
Slika 76: Shematski prikaz genoma rabdovirusov.....139	139
Slika 77: Prikaz pomnoževanja virusa143	143
Slika 78: Patogeneza virusa stekline.....146	146
Slika 79: Pozitiven rezultat direktnega imunofluorescenčnega testa. Slika A: odtisek možganskega tkiva, slika B: virus stekline, pomnožen na celični kulturi mišjih celic nevroblastoma. Mesta, na katera se veže specifičen konjugat proti virusu stekline, so obarvana zeleno.147	147
Slika 80: Ugotovljeni primeri stekline v Evropi leta 2000149	149
Slika 81: Prikaz števila ugotovljenih primerov stekline ob začetku izvajanje peroralne vakcinacije lisic in v letu 1995 in primerjalno v letu 2011150	150
Slika 82: Prikaz prenosa virusa vezikularnega stomatitisa iz ene vrste na drugo.....151	151
Slika 83: Celična kultura EPC (Epiteloma papulosum cyprini) in citopatski efekt (CPE) kot posledica rasti virusa IHN.....153	153
Slika 84: Označevanje posameznih izolatov virusa influence156	156
Slika 85: Shematski prikaz ortomiksovirusov.157	157
Slika 86: Virus influence157	157
Slika 87: Shema receptorskih mest na HA proteinu157	157
Slika 88: Shematski prikaz replikacije virusov iz družine Orthomyxoviridae.160	160
Slika 89: Najpogostejša pota širjenja različnih vrst virusov iz rodu influenzavirus A160	160
Slika 90: Patogeneza virusa bolezni modrikastega jezika pri govedu.170	170
Slika 91: Prikaz področij, kjer se v Evropi pojavljajo posamezni serotipi virusa BTV172	172
Slika 92: Shematski prikaz rotavirusov (A) in elektronsko mikroskopski posnetek (B)174	174



Slika 93: *Pomnoževanje rotavirusov v citoplazmi enterocitov.....175*



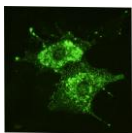
Predgovor

Virologija je razmeroma mlada veda. Njen razvoj je bil izredno počasen vse do odkritja elektronskega mikroskopa. S tem so se odprle možnosti opazovanja posameznih virusnih delcev. Začetek razvoja virologije sega v leto 1789 in ga pripisujejo Edvardu Jennerju. Delal je na zaščiti človeka pred okužbami s črnimi kozami. Pomemben pionir virologije je pravtako Louis Pasteur, saj je prvi uspel izdelati cepivo proti virusni bolezni, in sicer proti virusu stekline.

V tem obdobju se je vedelo le, da obstajajo določeni agensi, manjši od bakterij, ki povzročajo določene bolezni. Zaradi tega, ker so ti agensi prehajali filtre, ki so bakterije zadrževali, so za viruse do odkritja mikroskopa uporabljali izraz filtrabilni agensi. Friedlich Loeffler je šele leta 1898 kot prvi dokazal, da tudi povzročitelji danes poznanih bolezni virusne etiologije povzročajo filtrabilni agensi. Povzročitelja slinavke in parkljevke je tako uvrstil med filtrabilne agense. Hitrejši razvoj virologije omogoči odkritje elektronskega mikroskopa leta 1938. Hiter razvoj virologije v smislu proučevanja povzročiteljev virusnih bolezni, priprave sodobnih protivirusnih cepiv ter uvedbe učinkovite in zanesljive diagnostike se tako začne po drugi svetovni vojni, ko uvedejo metode gojenja celične kulture v *in vitro* pogojih za potrebe pomnoževanja različnih virusov. Mejnika moderne ere genetike sta odkritje strukture deoksiribonukleinske kisline (F. Crick in J. Watson, 1953) in leta 1983 predstavljena metoda nadzorovanega pomnoževanja nukleinske kisline, metoda PCR (angl. *polymerase chain reaction*) raziskovalca Karyja Muillsa.

Pionirsko delo na področju veterinarske virologije v Sloveniji sta opravila prof. dr. Zoran Železnik in prof. dr. Jože Grom. Profesor Železnik se je z veterinarsko virologijo začel ukvarjati leta 1958 na takratnem Znanstvenem veterinarskem zavodu v Ljubljani, zametku Veterinarske fakultete. V takratni Jugoslaviji je prvi uspešno gojil ledvične celice prašiča in pomnožil virus Aujeszkijske bolezni. Njegov največji prispevek k razvoju veterinarske znanosti v Sloveniji pa je vsekakor razvitje diagnostičnih metod in zatiranje virusnih kužnih bolezni, predvsem stekline. Profesorju Gromu pa pripisujemo zasluge pri razvoju in implementaciji diagnostičnih metod s področja encimskoimunskih in molekularnih tehnik in izdelavi monoklonalnih protiteles za potrebe sodobne diagnostike.

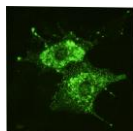
Na veterinarski fakulteti v Ljubljani virologijo poučujemo v okviru predmeta mikrobiologija z imunologijo. Mnoge virusne bolezni pri živalih povzročajo visoke ekonomske izgube, saj se pri nekaterih ob pojavu okužbe srečujemo tudi s 100-odstotnim poginom v posamezni reji. Na področju veterinarske medicine ni ustreznih protivirusnih zdravil, zato se pred pojavom virusnih bolezni lahko borimo le s preprečevanjem vnosa kužnine v čredo ali preventivnim cepljenjem. Doktor veterinarske medicine, ki se vsakodnevno srečuje s problematiko virusnih bolezni, mora najprej dobro poznati povzročitelja, zato so ti skripti namenjeni predvsem študentom veterinarske medicine in kolegom v veterinarski praksi. Z razvrščanjem



virusov v rodove, družine, vrste, podvrste, genotipe in topotipe se ukvarja mednarodni komite za taksonimijo virusov (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>).

Vsebina skript je razdeljena na 13 poglavij. Vsako poglavje obravnava posamezno virusno družino. Na ta način se bo študent lažje seznanil z značilnostmi posameznih povzročiteljev virusnih bolezni.

Skripta so namenjena predvsem študentom veterinarske medicine. Obravnavana poglavja so razvrščena po povzročiteljih virusnih bolezni. Posamezno poglavje obravnava določeno družino. Opisane so le vrste virusov, ki so pomembne za veterinarsko medicino, zato klasifikacije virusov posameznih družin niso popolne; in humanih, rastlinskih vrst virusov. Predstavljene so osnovne značilnosti klasifikacije, morfoloških lastnosti in pomnoževalnih značilnosti virusov uvrščenih v posamezne družine. Predstavljene so tudi posamezne vrste virusov, ki po oceni avtorja povzročajo pomembne ekonomske škode v živilski proizvodnji ali pomembnejše klinične simptome pri ljubiteljskih vrstah živali. Diagnostičnih metod ne obravnava v ločenem poglavju, ampak je sam postopek in princip posameznih diagnostičnih metod natančneje predstavljen v okviru posameznega povzročitelja bolezni. Tako je predstavljena metoda, ki se tudi v praksi uporablja v diagnostiki dotične bolezni. Za poglobljeno znanje veterinarske virologije se mora študent seznaniti tudi z drugo literaturo, navedeno na koncu, predvsem pa s knjigo avtorjev Jamesa N. MacLachlana in Edvarda J. Dubovija *Fenner's Veterinary Virology*, 2011.



VIRUSI Z ENOJNOVIJAČNIM DNA GENOMOM

1. Parvoviridae

1

PARVOVIRIDAE

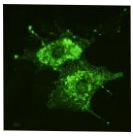
Splošne lastnosti in klasifikacija parvovirusov

Parvoviruse so najprej odkrili pri psih in kunah. Za te viruse je značilno, da se razmnožujejo v hitro razmnožujočih se celicah, kot so epitelne celice črevesja, hematopoetskih organov in fetusa. Gospodarsko pomembna je zlasti parvoviroza pri prašičih. Parvoviruse so ugotovili tudi pri drugih ekonomskih vrstah domačih živali, vendar okužbe običajno ne izzovejo zaznavnih kliničnih znakov obolenja. So eni od najpreprosteje sestavljenih živalskih virusov. Zaradi majhnega genoma je pomnoževanje genoma odvisno od gostiteljskih celic ali virusov pomočnikov. Parvoviruse delimo v skupino, ki je sposobna lastne replikacije, in skupino, ki je vezana na encime drugih virusov, bodisi adeno- ali herpesvirusov, govorimo o »adeno-associated« parvovirusih.

Parvovirusi spadajo med manjše viruse, ki so zelo razširjeni v naravi. Družino *Parvoviridae* so razdelili v dve poddružini; *Parvovirinae* in *Densovirinae*. Za rod *Bucavirus* je v genomu značilen tretji bralni okvir (ORF) z oznako NP1. V poddružino *Densovirinae* so uvrščeni parvovirusi insektov in je ne bomo obravnavali. Znotraj poddružine *Parvovirinae* se nahaja pet rodov. Humane vrste parvovirusov so uvrščene v rod *Erythrovirus*.

Poddružina (Rod)	Vrsta	Bolezniški znaki
PARVOVIRINAE		
AMDOVIRUS	<i>Aleutian mink disease virus</i> (Slo.: <i>Parvovirus minkov</i>)	Glomerulonefritis, abortusi
BOCAVIRUS	<i>Bovine parvovirus</i> (Slo.: <i>Goveji parvovirus</i>)	blaga diareja zlasti pri teletih
	<i>Canine minute virus</i>	neonatalne okužbe,
DEPENDOVIRUS	<i>Goose parvovirus</i> (Slo.: <i>Parvovirus gosi</i>)	blagi simptomi diareje
	<i>Duck parvovirus</i>	hepatitis, miokarditis
PARVOVIRUS	<i>Chicken parvovirus</i> (Slo.: <i>Parvovirus rac)s</i>	hujšanje, enteropatije
	<i>Canine parvovirus</i> (Slo.: <i>Pasji parvovirus</i>)	krvava diareja, bruhanje, dehidracija
	<i>Feline panleukopenia virus</i> (Slo.: <i>Virus mačje panleukopenije)s</i>	generalizirana bolezen mačk, prisotna levkopenija, enteritis, možganska hipoplazija
	<i>Porcine parvovirus</i> (Slo.: <i>Prašičji parvovirus)s</i>	generalizirano obolenje, enteritis, diareja, bruhanje, miokarditis, limfopenija

Preglednica 1: Klasifikacija virusov, pomembnih za veterinarsko medicino znotraj družine Parvoviridae



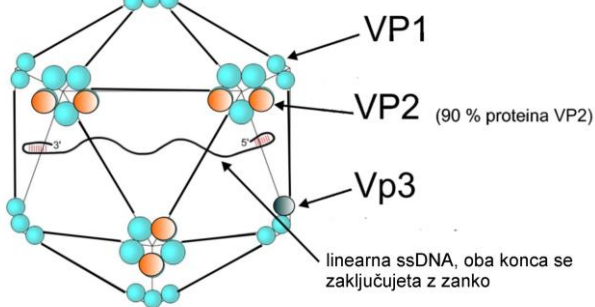
Zgradba parvovirusov

Virusi poddružine *Parvovirinae* so brez lipoproteinske ovojnice, okroglaste oblike, ikozaedralne simetrije, velikosti od 20 do 25 nm v premeru. Kapsida je zgrajena iz 32 kapsomer oziroma 90-ih proteinskih molekul z oznakami VP1, VP2 in VP3. Skoraj devetdeset odstotkov izmed vseh proteinov predstavlja molekula VP2. Približno šestdeset odstotkov celotne teže virusa predstavljajo proteini, štirideset pa virusna DNA. V imunološkem smislu so pomembni trije polipeptidi VP1, VP2 in VP3, ki sestavljajo kapsido, najpomembnejši pa je VP2 ker je najbolj imunogen. Proteinske molekule na površini virusa formirajo udrtine, tako da površina virusa ni ravna, ampak je hrapava. Parvovirusi so zelo stabilni v okolju, odporni na razkužila in spremembo pH. 0,5-odstotni formalin jih inaktivira v 3 dneh, UV-sevanje jih inaktivira v 6 urah. Odporni so na eter, kloroform in tripsin. Pri inkubaciji pri 56 °C izgubijo infektivnost šele po 6 urah.

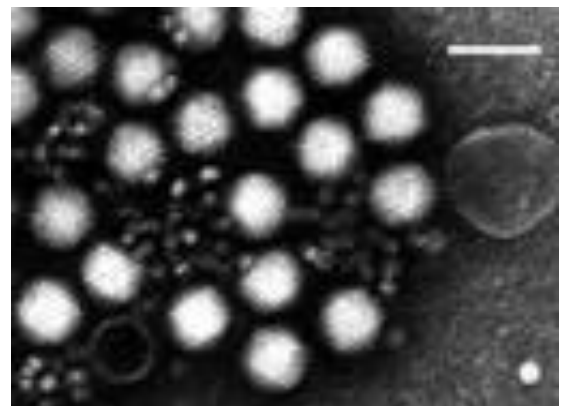
Virusni genom

Genom predstavlja enojnovijačna linearna molekula DNA, velikosti 5–5,2 kbp, odvisno od vrste virusa. V fazi replikacije se oblika genoma spreminja in se virusna DNA pojavlja tudi v cirkularni obliki. Genom sestavljata dva bralna okvirja (angl. *open reading frame*, ORF), levo polovico genoma predstavlja ORF1, (imenovan tudi gen REP), ki kodira nestrukturne proteine z oznakami NS1, NS2 in NS3, ter ORF2 na desni polovici genoma, ki kodira strukturne proteine; VP1, VP2 in VP3. Nukleotidno zaporedje na 5' koncu se ponovi na 3' konca imata obliko zanke. Na obeh koncih najdemo identično nukleotidno zaporedje, ki predstavlja začetni signal za polimerazo. Ponovitevno regijo sestavlja od 120 do 300 nukleotidov. Zanka na koncu genoma je potrebna za začetek replikacije virusnega genoma in tudi predstavlja prepoznavno mesto za vrvanje genoma v kapsido. Genom nekaterih vrst se lahko integrira v celični kromosom. Veliko parvovirusov se pomnožuje avtonomno, adenovirusom pridruženi virusi (satelitni virusi ali dependovirusi) pa so defektni in rabijo adenovirus ali herpesvirus kot svoj pomočniški virus.

Nukleokapsida je izgrajena iz 32 kapsomer, vsaka kapsomera pa iz 90 molekul VP proteinav



Slika 1: Shematski prikaz parvovirusov.

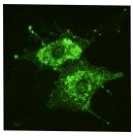


Slika 2: Videz virusa pod elektronskim mikroskopom,

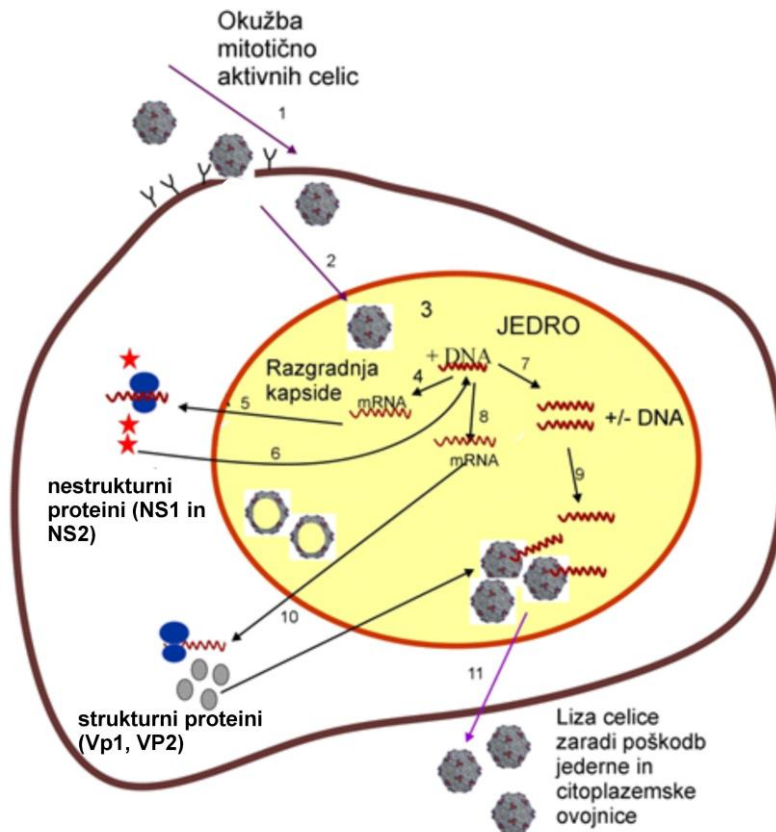
100.000-kratna povečava, (povzeto po <http://www.epa.gov/nerlcwww/graphics/adeno.jpg>)

Pomnoževanje parvovirusov

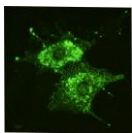
Parvovirusi se pomnožujejo v mitotično aktivnih celicah. Zaradi majhnega genoma in omejenega števila genov je pomnoževanje parvovirusov odvisno od encimov celice. Virus ima afiniteto do



eritrocitov, retikulocitov, kariocitov, celic endotelija. Množi se tudi v celicah placent, fetusa, predvsem pa v jetrih in srcu. V celico vstopi celoten virus. Preden vstopi v celico, se veže na receptorska mesta na površini celice, kot so molekule transferinov, heparin sulfata ali fibroblastnega rastnega faktorja, nekatere vrste parvovirusov lahko vstopijo v celico brez predhodne vezave. Do slačenja virusa pride v celični citoplazmi s pomočjo delovanja celičnih proteaz, tako da se pogosto v jedro skozi jedrne pore prevede le virusna DNA. Sicer pa je parvovirus dovolj majhen, da lahko



pasira jedrne pore, tako da v nekaterih primerih vstopi v jedro celoten virus in pride do slačenja šele tu. Pomnoževanje se začne, ko celica vstopi v fazo S. Celična polimeraza se pripne na zanko 3' konca virusnega genoma in začne s prepisovanjem proti 5' koncu, tako da nastane dvojnovijačna DNA. Na levem koncu verige se nahaja promotor sinteze mRNA. Celična RNA polimeraza II generira verige mRNA za nestrukturna proteina NS1 in NS2. mRNA molekule potujejo v citoplazmo celice, kjer se sintetizirata dva nestrukturna proteina – NS1 in NS2, ki se nato transportirata v jedro celice in nastopata kot regulatorna encima nadaljnje replikacije virusa. Pomnoževanje virusne DNA poteka s polimeraznim prepisom, ki poteka od 5' konca do 3' konca. Na 5' konec se pripne NS1, polimeraza pa nadaljuje s prepisom v drugi smeri. Ko pride do 3' konca, se na konec verige ponovno pripne NS1 in na ta način se podvojevalni cikel ponovi. Pomnoževanju virusne DNA sledi ekspresija genov za proteina VP1 in VP2. Novonastale molekule mRNA potujejo v citoplazmo in se v ribosomih prevedejo v protein VP1 in VP2. Protein VP2 celične proteaze cepijo na dva proteina, na VP2 in VP3. Novonastali proteini potujejo v jedro celice, formirajo kapsido ikozaedralne oblike, protein NS1, ki je pripet na verigo virusne DNA, pa uvede virusni genom v kapsido. Sam način izstopanja virusa iz celice ni povsem poznan, je pa posledica lize celične stene. Ker se celična polimeraza DNA, potrebna za replikacijo virusa, vključni le v fazi mitoze celice, je pomnoževanje virusa vezano na hitro razmnožujoče se celice, kot so epitelne celice prebavil in druge.

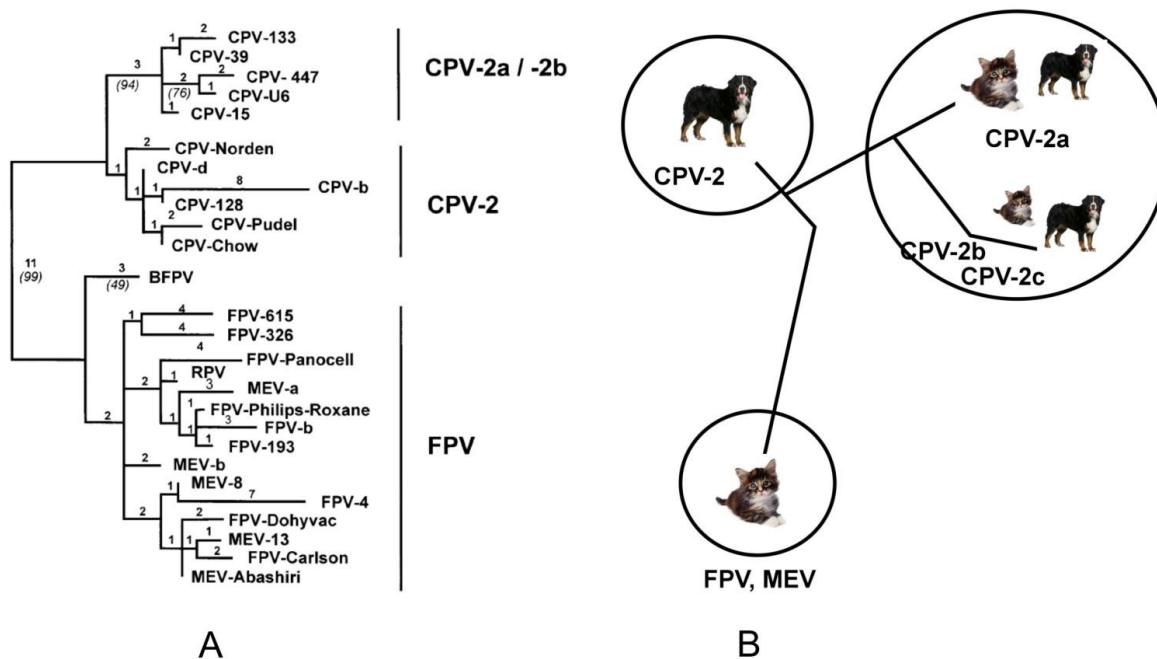


Slika 3: Razmnoževalni cikel parvovirusov:

(1) Virus lahko vstopi v celico na dva načina; brez predhodne vezave na celično steno ali se veže na celične receptorje (transferin receptor ali sialična kislina) in vstopi v celico z endocitozo. (2) V jedro celice lahko vstopi celoten virus, ali pa pride do razgradnje kapside že v citoplazmi, ali pa le virusna DNA. (3) Prepisovanje, pomnoževanje in sestavljanje parvovirusov poteka v jedru celice. (4) Prepišejo se geni za nestrukturne proteine, (5) mRNA potuje na proste ribosome, kjer se (6) sintetizirajo nestrukturni proteini, ki nato potujejo v jedro celice. (7) NS1 in NS2 regulirata replikacijo genoma, (8) sledi prepis genov za strukturne proteine in sinteza virusne molekule DNA. (10) Strukturni proteini se v jedru združijo v kapsido, v kateri se uvede virusna DNA. (11) Virus zapusti celico zaradi lize celične stene.

Vrsta: Parvovirus psov (angl. *Canine parvovirus 2*)

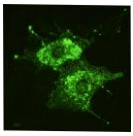
Parvovirus psov (angl. *Canine parvovirus*) je uvrščen v rod *Parvovirus*, za razliko od vrste *Canine minute virus*, ki je uvrščen v rod *Bocavirus*. Slednji povzroča blaga enterična obolenja in je slabo patogen le za mlade pse. Za pse je najbolj patogena vrsta *Canine parvovirus 2*, z genetskima skupinami 2a, 2b in 2c. Parvovirozne infekcije pri psih so se v Evropi pojavile v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja. Virus je v okolju zelo obstojen. Občutljive so vse vrste živali iz družine *Canidae*, kot so psi, volkovi, kojoti in druge. Poznani so trije podtipi virusa CPV2 z oznakami, CPV2a, CPV2b in CPV2c (*Canine Parvovirus*).



Slika 4: Prikaz sorodnosti med parvovirusi psov in mačk.

(Prikazano s filogenetskim drevesom v računalniškem programu DNA star® (A) in Philip® (B) na osnovi filogenetske analize gena za VP2 protein).

Virus ima afiniteto do epitelnih celic v kriptah jejunuma, limfnih organov, lahko se razširi na vse organe. Zaradi poškodb sluznice prebavnega trakta se pojavi diareja in bruhanje. Fecesu je pogosto primešana kri. Virus se razmnožuje tudi v srčni mišici. Posledica tega je miokarditis in nenaden



pogin. Preživeli psi pa imajo pogosto težave s srcem (kardiomiopatije). Prizadeto je tudi limfatično tkivo. Virus povzroči destrukcijo limfocitov, posledica tega je slabša zaščita pred sekundarnimi infekcijami. Najbolj občutljivi so mladiči, stari od 6 tednov do 6 mesecev. Okužijo se ob kontaktu z bolnimi ali v kontaminiranem okolju. Posledica pomnoževanja v limfocitih je limfopenija. Na okužbo so posebno občutljivi mladi psi. Ti poginjajo zaradi miokaditisa. Preboli ga le nizek odstotek psov in ti imajo posledice okužbe vse življenje. Okužba običajno poteka oronazalno, pojavi se profuzna driska. V krvi obolelih psov lahko že od 5. do 7. dne po okužbi ugotovimo specifična nevtralizacijska protitelesa. Zaščita je dosmrtna. Maternalna protitelesa ščitijo mladiče pred obolenjem, ta zaščita pa lahko traja tudi samo od treh pa do 12 dveh tednov.

Klinično diagnozo potrdimo v histološki rezini tankega črevesja z imunoperoksidaznim testom, elektronsko mikroskopsko preiskavo blata, metodo PCR, ali serološko, z dokazovanjem protiteles skupine IgM. V blatu bolnega psa lahko dokažemo prisotnost virusa tudi s hemaglutinacijskim testom. Virus hemaglutinira prašičje ali opičje eritrocite v mediju s pH 6,5. Za vzorec uporabimo ekstrakt fecesa. Najuporabnejša pa je metoda PCR. Klasifikacija temelji na osnovi razlik nukleotidnega zaporedja na genu za protein VP2. Na voljo so tudi hitri lateral-flow testi, primerni zlasti za uporabo v ambulantni praksi.

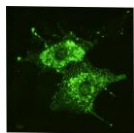
Parvoviroza psov v Sloveniji: Okužbe psov s parvovirusi so v Sloveniji prisotne. Preventivno lahko pse cepimo z atenuiranimi cepivi, vendar moramo biti pri tem pozorni na to, ali so psički v času cepljenja brez maternalnih protiteles. Kritično obdobje za okužbo mladih psov je vsekakor starost med dvema in štirimi tedni, ko nivo maternalnih protiteles že pade do te mere, da so psički že občutljivi na okužbo. Zelo pomembno je, da v desetdnevnem obdobju po vakcinaciji živali ne izpostavljammo okužbi. Prvi primeri parvoviroz psov v Sloveniji so bili patohistološko in laboratorijsko potrjeni že leta 1980.

Vrsta: Virus mačje panlevkopenije (angl. *Feline parvovirus*)

Parvovirus mačk je prav tako uvrščen v rod *Parvovirus*: Mačji parvovirus je močno podoben pasjemu parvovirusu. Patogen za vse živali iz družine *Felidae*. Virus je v naravnem okolju zelo obstojen. Na genu za protein VP2 je samo nekaj nukleotidnih zamenjav. Posledica tega je sprememba v aminokislinskem zaporedju in posledično spremenjeno afiniteto za vrsto živali. Na virus mačje panlevkopenije so občutljive vse vrste iz družine *Felidae* ne glede na starost. Živali se okužujejo nazo-oralno. Virus se najprej namnoži v področju faringealnih limfnih vozlov in se od tu po krvni poti razširi po drugih organih. Prizadeti so limfatični organi, zaradi tega lahko v krvi najdemo tudi zmanjšano število limfocitov, nevtrofilcev in monocitov, prisotna pa je tudi trombopenija. Afiniteto ima do hitro se delečih celic. Prizadene zlasti reproduktivne organe vključno s timusom, kostnim mozgom, bezgavkami, vranico in Payerjevo ploščo. V fazi gravidnosti virus prizadene tudi možgane plodu, zaradi tega se po rojstvu pojavi ataksija. Ob neonatalni infekciji se virus množi v germinalnem epitelu cerebeluma, posledica tega je hipoplazija cerebeluma.

Obolenje se pojavlja tako pri odraslih mačkah kot mladičih. Kaže se v povišani temperaturi, bruhanju in driski, blato je sluzavo in krvavo. Žival pogine zaradi dehidracije. Virus vstopa v nevrone, zaradi tega pride do ataksije in tremorja. Prisotna je destrukcija epitelijskega tkiva v kriptah jejunuma. Gravidne mačke pogosto abortirajo, rodijo se mumificirani ali mrtvi mladiči. Motnja v razvoju možganov je pogosto posledica perinatalne okužbe. Pojavi se cerebralna hipoplazija. Zaradi okvare limfatičnega tkiva je prisotna levkopenija in trombopenija. Razmnožuje se tudi v mieloidnih celicah kostnega mozga. Posledica tega je upad števila nevtrofilcev.

Diagnostika temelji na dokazovanju virusnega antigena. Na voljo so tudi hitri testi (angl. *lateral flow tests*), primerni za uporabo v ambulantni. Specifična protitelesa se v krvi pojavijo že 5. dan po okužbi.



Mladiči so preko maternalnih protiteles zaščiteni do 16. tedna starosti. Največje razlike med izolati se pojavljajo na genu za protein VP2. Tipizacija izolatov pa se opravlja na osnovi razlik v nukleotidnem zaporedju na tem genu. V molekularni diagnostiki uporabljamo zlasti metodo PCR. Pomnožujemo odsek gena za protein VP2. Kot preventivni ukrep se uporablja cepljenje mladičev z atenuiranim ali inaktiviranim cepivom po navodilu proizvajalca cepiva.

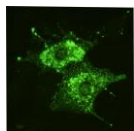
Ukužbe z mačjim parvovirusom so prisotne tudi v Sloveniji.

Vrsta: Prašičji parvovirus - PPV (angl. *Porcine parvovirus*)

Klasifikacija ICTV uvršča *Porcine parvovirus* v rod *Parvovirus*. Virion je sestavljen iz 32 kapsomer, 80 % mase predstavljajo proteini, ostalo pa DNA. Pri prašičih je poznan enoten serotip, vendar sta poznani dve filogenetski skupini, in sicer A in B. Vsi ugotovljeni sevi imajo hemaglutinacijske lastnosti, aglutinirajo eritrocite morskega prašička, eritrocite človeka s krvno skupino 0, opice, kokoši in miši. Virus je v naravnem okolju zelo stabilen. Rezistenten je na temperaturo do 60 °C in pH med 3 in 9. Virulentne seve so najprej izolirali iz mumificiranih plodov. Ti ob okužbi prehajajo placento in povzročajo infekcijo imunonekompetentnih plodov. Nekateri sevi povzročajo dermatitise. V ciklus razmnoževanja virusa je vključena celična polimeraza v fazi S celice (faza sinteze DNA). Parvovirusne infekcije so pri prašičih močno razširjene tudi pri nas. V patogenezi virusnega razvoja imajo pomembno vlogo breje živali. Breja žival se običajno okuži po peroralni poti, do plodu pa virus prispe v 15 do 20 dneh. Do odmrta plodu pride zlasti ob okužbi pred 70. dnem starosti. Po tej starosti je plod prašiča sposoben tvoriti zaščitna protitelesa. Plodovi se okužijo v fazi viremije, vendar ne vsi hkrati, zato del plodov odmre, del mumificira, del pa jih preživi. Če pride do infekcije pred vgnezditev (ca. 13. dan gravidnosti), pride do odmrta vseh blastocist, kasneje odmre le del blastocist, zaradi tega so gnezda manjša. Če se plodovi okužijo po 70. dnevu starosti, jih večina preživi. Bolezen se kaže v reproduktivnih motnjah, prisotne so zgodnje pregonitve, prihaja do odmrta plodov. Če pride do okužbe med brejostjo, so plodovi mumificirani in pujski ne vitalni. Najpogostejše so neonatalne anomalije in težave v reprodukciji. Če pride do okužbe med 30. in 70. dnem gravidnosti, nekateri plodovi odmrejo; rodijo se mrtvi, mumificirani pujski, živi pujski pa so lahko tudi perzistentni izločevalci virusa. Če se okužijo po 70. dnevu gravidnosti, pa se rodijo živi, slabo vitalni pujski. Abortusi v 2. tretjini brejosti niso ravno pogosti, ker virus ne prizadene endometrija maternice. Parvovirusnim infekcijam pripisujemo sindrom SMEDI (angl. *stillbirth, mumification, embryonic death, infertility*). Virus se razmnožuje tudi v limfatičnih organih, tonzilah, timusu kot tudi v perifernih limfocitih. Okuženi merjasci izločajo virus tudi s spermo. Obolenje povzroča velike izgube zlasti v primeru okužbe neimune reje prašičev.

V diagnostiki uporabljamo imunohistološke metode, metodo PCR in test inhibicije hemaglutinacije. Zaradi splošne razširjenosti virusa uporaba seroloških metod nima velike praktične vrednosti. Virus dokažemo v blatu bolne živali, uporabni so parenhimski organi plodu ob abortusu. Lahko pripravimo histološko rezino ter s specifičnimi protitelesi, markiranimi s fluorokromi, barvamo preparat. Konjugat se veže na celice, okužene s PPV (imunofluorescenčni test).

V Sloveniji je večina rej prekuženih z virusom PPV, zato matere prenašajo zaščitna protitelesa na novorojence. V serološki diagnostiki se uporablja test inhibicije hemaglutinacije in test ELISA za dokaz specifičnih protiteles proti PPV. Virusni antigen dokažemo z imunohistološkimi metodami, v histološkem preparatu tankega črevesja. Kritična kategorija živali so mladice, ki imajo ob pripustu nizek nivo protiteles, zato sindrom SMEDI opazamo zlasti pri mladica. Eden od preventivnih ukrepov v reji je vakcinacija mladic pred pripustom. Okužbe s PPV so razširjene po vsem svetu. Pujski imunih mater so zaščiteni pred infekcijo preko maternalnih protiteles do 4 mesecev starosti. Pogosto se v preventivne namene uporablja cepljenje z atenuiranimi ali inaktiviranimi cepivi. Najbolj imunogen je protein VP2.

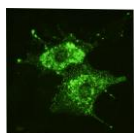


Vrsta: Goveji parvovirus (angl. *Bovine parvovirus*)

Goveji parvovirus je uvrščen v rod *Bucavirus*. Genom virusov iz tega rodu vsebuje še dodaten ORF, ki kodira nestrukturni protein NS1. Virus je patogen predvsem za teleta. Razmnožuje se v intestinalnem in urogenitalnem traktu. Obolenje se kaže v obliki diarej, zlasti pri teletih. V krvi odraslih živali lahko ugotovimo zaščitna protitelesa. Ne povzroča velikih ekonomskih izgub. Virus ima hemaglutinacijske lastnosti.

Priporočeni študijski viri

- Ariane Steinel, Colin R. Parrish, Marshall E. Bloom in Uwe Truyen. *Parvovirus Infections in Wild Carnivores. Journal of Wildlife Diseases*, 37(3), 2001, pp. 594–607.
- Hoelzer K, Parrish CR. The emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet Res* 2010; 41: e 39 (13 str.)
- Gombač M, Švara T., Tadić M., Pogačnik M. Retrospective study of canine parvovirolosis in Slovenia. *Slo vet res* 2000. 2 : 74 – 78.
- Štukelj M., Valenčak, Z.: Razširjenost prašičjega parvovirusa pri mladica na velikih farmah in v manjših rejah = Prevalence of the porcine parvovirus in gilts on large and small farms. V: CESTNIK, Vojteh (ur.), POGAČNIK, Azra (ur.). 6. *Konferenca Slovenske veterinarske zveze*, 24. in 25. november 2000, Brdo pri Kranju, (Veterinarske novice, letn. 26, suplement 1). [Ljubljana: Slovenska veterinarska zveza], 2000, str. 39-42.
- GROM J., POLJŠAK-PRIJATELJ M, ŽELEZNIK Z, VALENČAK Z, DRINOVEC B, Virusni enteritis psov = Canin viral enteritis : dokaz parvovirusov : detection of parvoviruses. *Zb. Bioteh. fak. Univ. Edvarda Kardelja Ljubl., Vet.*, 1981; (18): 67-70.



VIRUSI Z DVOJNOVIJAČNIM DNA GENOMOM

1. *Papillomaviridae*
2. *Adenoviridae*
3. *Herpesviridae*
4. *Asfaviridae*

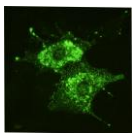
2 PAPILLOMAVIRIDAE

Splošne lastnosti in klasifikacija

Papilomavirusi spadajo v skupino virusov z dvojnovijskim DNA genomom, kamor so uvrščene še naslednje družine: *Herpesviridae*, *Poxviridae* in *Adenoviridae*. Po sedanji klasifikaciji mednarodnega komiteja za klasifikacijo virusov družino *Papillomaviridae* sestavlja 30 rodov, večina vrst je patogenih za človeka. (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>). Papilomavirusi so okroglaste oblike z dvoslojno kapsido in so brez ovojnice. Nukleokapsida je ikozaedralne oblike. V premeru merijo od 45 do 55 nm.

Papilomavirusi živali, uvrščeni v družino *Papillomaviridae*, so etiološko povezani z nastankom različnih benignih sprememb kože in celičnega epitelijskega sluznic. Klasifikacija papilomavirusov temelji na skladnosti nukleotidnega zaporedja med virusnimi genomi različnih virusov. Glede na to, da papilomavirusov ni mogoče kultivirati na celičnih kulturah, jih ne moremo razvrščati niti v seve niti v serotipe, ker okužba pogosto ne izzove zadostnega odgovora s tvorbo protiteles. Goveji papilomavirusi so uvrščeni v tri rodove: *Deltapapillomavirus*, vrsta goveji papilomavirus-1 (angl. *bovine papillomavirus 1*, BPV-1), rod *Epsilonpapillomavirus*, vrsta BPV-5 in *Lambdapapillomavirus* z vrsto BPV-3. Znotraj posameznih vrst nastopa veliko število genotipov, ki so definirani z razlikami v nukleotidnem zaporedju gena za strukturni protein L1. Nov genotip se mora razlikovati vsaj za 10 % od vseh drugih priznanih genotipov. Trenutno je poznanih 189 različnih genotipov virusov papiloma, od tega 120 humanih papilomavirusov in 69 živalskih, od tega 11 papilomavirusov goveda. Papilomavirusi so striktno vrstno specifični, poznan je le primer govejega papilomavirusa (angl. *bovine papillomavirus*, BPV) genotip 1 in 2, ki sta patogena tudi za kopitarje.

Rod/Vrsta	Gostitelj	Simptomi
DELTAPAPILLOMAVIRUS		
<i>Bovine papillomavirus 1 (BPV-1)</i> , (Slo.: Goveji papilomavirus)	govedo	bradavice pri govedu po neodlakanih delih kože, sluznici sečil, sarkoidoza pri konjih
<i>Deer papillomavirus</i> (Slo.: Papilomavirus jelenov)	jeleni	bradavice po neodlakanem delu kože
<i>Ovine papillomavirus</i> (Slo.: Ovčji papilomavirus)	ovce	bradavice po neodlakanem delu kože
EPSILONPAPILLOMAVIRUS		
<i>Bovine papillomavirus 5 (BPV-5)</i> , (Slo.: Goveji papilomavirus))	govedo	fibropapilomatozne spremembe
KAPPAPAPILLOMAVIRUS		
<i>Rabbit oral papillomavirus</i> (Slo.: Kunčji papilomavirus)	kunci	bradavice



LAMBDA PAPILLOMAVIRUS		
<i>Feline papillomavirus</i> (Slo.: <i>Mačji papilomavirus</i>)	mačke	kožne fibropapilomatozne spremembe, sarkoidi, karcinom
<i>Canine papillomavirus</i> (Slo.: <i>Pasji papilomavirus</i>)	psi	bradavice po ustih, pigmentirane kožne spremembe
XIPAPILOMAVIRUS		
<i>Bovine papillomavirus 3</i> (BPV-3), (Slo.: <i>Goveji papilomavirus</i>)	govedo	bradavice po koži in gornjem prebavnem traktu
ZETA PAPILLOMAVIRUS		
<i>Equine papillomavirus 1</i> (Slo.: <i>Papilomavirus konj</i>)	konji	bradavice po koži, nozdrveh

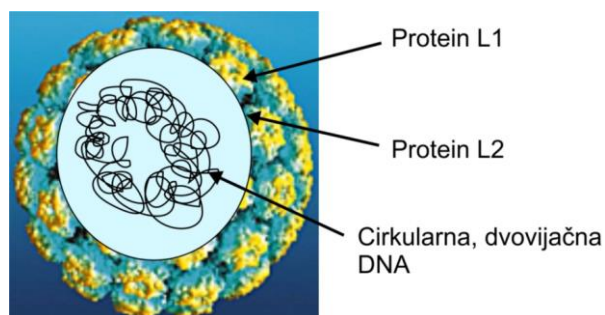
Preglednica 1: Klasifikacija virusov, pomembnih za veterinarsko medicino znotraj družine Papillomaviridae.

Zgradba papilomavirusov

Virusna kapsida je sestavljena iz 72 kapsomer, posamezno kapsomero sestavljata dva proteina z oznakama L1 in L2. Virus je zgrajen iz peterostraničnih kapsomer. Genom pa sestavlja ena dvojnovijačna molekula DNA, velikosti 8 (rod *Papilomavirus*) oziroma 5 (rod *Polyomavirus*) kilobaznih parov. Papilomaviruse sestavlja nukleokapsida, ki je ikozaedralne oblike. Premer virusa je od 55 do 60 nm. Virus nima lipidne ovojnice.

Genom papilomavirusov

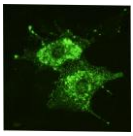
Genom predstavlja dvojnovijačna cirkularna molekula DNA, velikosti od 6,8 do 8,4 kbp in kodira dva strukturna in 8 nestrukturnih proteinov. Genom virusa glede na funkcijo lahko razdelimo v več regij: regulatorna regija, ki kodira nestrukturne proteine, regije, ki regulirajo transkripcijske in translacijske proteine, sledijo geni, ki regulirajo replikacijo virusne DNA, in geni, ki kodirajo strukturne proteine.



Slika 5: Shematski prikaz zgradbe papilomavirusov.



Slika 6: Papilomavirus, posneto s presejalnim elektronskim mikroskopom (povzeto po www.euskonews.com)

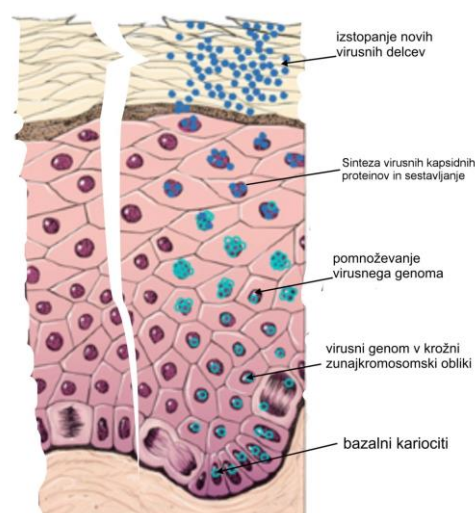


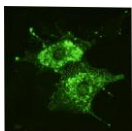
Pomnoževanje papilomavirusov

Papilomavirusi se pomnožujejo v jedru epitelnih celic kože in sluznic, zlasti v celicah germinativnega sloja kože. Vstopno mesto virusa je koža ali sluznica. Za virus BPV (*Bovine papillomavirus*) so dovzetne bazalne celice večvrstnega ploščatega epitelija. Na mesto bazalnega sloja kože ali sluznice se virus vnese preko majhnih poškodb ali s pikom krvosesihi insektov. Za vezavo BPV na gostiteljske celice je ključen heparan sulfatni proteoglikan, ki je sestavni del membrane bazalnih celic. Virus se veže na celične receptorje, to so molekule MHC ali na molekule sialične kisline, in vstopi v celico po principu endocitoze. V lizosomu potuje do jedra celice. Virusna kapsida se odpre v lizosomih, virusna DNA pa se s pomočjo strukturne beljakovine L2 prenese v jedro bazalnih celic. Podvajanje virusnega genoma se odvija v bazalnih celicah skupaj s celičnim podvajanjem. V citoplazmi poteka slačenje virusa in sledi vstopanje virusne DNA v jedro celice. Virusna DNA je v cirkularni obliki. Prepisovanje virusne DNA je razdeljeno v zgodnjo in pozno fazo. Najprej pride do transkripcije na eni verigi DNA, prepišejo se zgodnji geni v mRNA. Po translaciji nastanejo zgodnji proteini – to so encimi, ki regulirajo replikacijo, nadaljnje pomnoževanje, ekspresijo poznih genov ter nastanek strukturnih proteinov in virusne DNA. Pomnoževanje virusa je vezano tudi na razvoj in staranje celice. Virusna nukleinska kislina se razmnožuje v bazalnih celicah kože, tvorba kapsidnih proteinov pa poteka v sloju diferenciranih keratocitov, tako da je virusno pomnoževanje odvisno od diferenciacije celice kože. Virus povzroči hiperplazijo celic. Prepisovanje genoma delimo v zgodnjo in pozno fazo. V jedru celice poteka prepis z polimerazo RNA II, ki je celičnega izvora. Najprej poteka prepis enega dela verige DNA, to je zgodnja faza, nato pa še prepis druge verige – pozna faza. Novonastala molekula mRNA se razcepi na dva fragmenta (veliki in mali fragment T). Proteinska molekula (veliki antigen T –protein E1), nastala iz fragmenta T mRNA, se veže s celičnimi proteini p53 in Rb, kar omogoča celicam vstop v fazo S. Mali antigen T (protein E2) pa se veže na verigo DNA in s tem prekine sintezo mRNA. Temu sledi podvojevanje virusne DNA. Posledica podvojevanja je nastanek novih cirkularnih verig. Tej fazi sledi prepis poznih mRNA ter sinteza proteinov L1 in L2. Do akumulacije proteinov pride v jedru celice.

V obdobju celične proliferacije določeni virusni proteini spodbujajo celico k stalnemu podvajanju, zato nastane sloj celic, ki vsebujejo virusno DNA. Izražanje virusnih beljakovin v tej fazi je omejeno, zato virus ni izpostavljen imunskemu sistemu gostitelja. Tako se vzpostavi okužba goveda z govejim papilomavirusom brez odgovora imunskega sistema. Sinteza virusnih proteinov in zorenje virusa nastopi šele v keratocitih. Posledica infekcije je hiperplazija s posledično hiperkeratinizacijo epitelija kože in sluznic. Prve spremembe se pojavijo že od 4 do 6 tednov po okužbi. Bradavice vztrajajo od 6 do 12 mesecev, nato običajno spontano odpadejo, kar pa je odvisno od višine titra specifičnih protiteles proti BPV.

okužba skozi poro (kontakt, insekti)





Slika 7: Deli epitelijskega tkiva, kjer poteka razmnoževanje in sestavljanje govejega papilomavirusa.

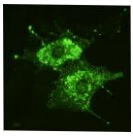
Razširjenost okužbe in genetska raznolikost virusov BPV v Sloveniji ni poznana. Okužbi so izpostavljene zlasti mlade živali na paši. Podatki iz Nemčije kažejo, da so najpogostejše odkrili vrsto BPV-8, sledijo pa BPV-6, BPV-1, BPV-10, BPV-2, BPV-4, BPV-5 in BPV-6. Posamezna žival je pogosto nosilec več različnih genotipov virusa BPV.

Vrste: Papilomavirusi pri govedu (angl. Bovine papillomavirusov)

Goveji papilomavirusi so uvrščeni v tri rodove:

1. *Deltapapillomavirus*, v katerega sta uvrščena vrsti goveji papilomavirus 1 in 2 (BPV-1 in BPV-2). V ta rod je uvrščen tudi ovčji in jelenji papilomavirus. Za skupino ovčjih in jelenjih papilomavirusov je značilno, da se razmnožujejo le v keratocitih. Ostali papilomavirusi se razmnožujejo tudi v fibroblastih, tako povzročajo proliferacijo keratocitov in fibroblastov, kar vpliva tudi na pojav patoloških sprememb pri okuženih živalih. Znotraj vrste BPV-1 sta poznana dva genotipa z oznakama BPV-1a in BPV-1b. Oba genotipa povzročata bradavice in neoplastične spremembe ob neodlakani perigenitalni regiji, na seskih, po koži (na vratu in glavi), po prebavnem traktu in sečnem mehurju. Velikost sprememb sega od riževega zrna pa do velikosti pomaranče. Bradavica ima fibrozno sredico, zunanji sloj pa je hiperkeratiniziran. Površina večjih oblik je karfiolasta, ki s starostjo nekrotizira. Zaradi mehanskih poškodb pogosto prihaja do krvavitev in zapletov zaradi bakterijskih okužb. BPV-1 povzroča bradavice zlasti po vimenu, BPV-2 pa bradavice po koži, prebavnem traktu in tumorje v sečnem mehurju. Bradavice najdemo zlasti na koži hrbta, vratu, glave in vimena pri mladem govedu, predvsem pri prvesnicah. Bolne živali se ližejo in na ta način okužijo še sluznico ustne votline. Genotipa BPV-1 in BPV-2 sta kužna tudi za kopitarje, sprožita sarkoidozo – kožni tumor, ki se lahko pojavi kjer koli na telesu. Bradavice na genitalnem področju in področju vimena povzročajo bolečino, zmanjšujejo mlečnost in povečajo pojave mastitisov zaradi nepopolne molže. Pri dalj časa trajajočih oblikah se bradavice pojavljajo tudi v gornjem delu prebavnega trakta, kar otežuje prehranjevanje in dihanje. Tumori na sečnem mehurju so pogosto povezani s prisotnostjo BPV-1 ali BPV-2 okužb. Poročajo, da so kar v 50–80 % tumorjev v sečnem mehurju potrdili prisotnost virusa BPV-1 ali BPV-2. Opisana je tudi visoka stopnja povezave med hematurijo pri govedu in BPV okužbami urinarnega trakta.

2. *Xipapillomavirus* predstavlja vrsta BPV-3, v katero so uvrščeni genotipi BPV-3, 4, 6, 9, 10 in 11. Njihova značilnost je, da nimajo gena za onkogeni protein E6. Povzročajo papilomatozne spremembe na koži (genotip BPV-3), gornjem alimentarnem traktu (genotip BPV-4) ter vimenu in seskih (BPV-6). Bradavice, ki jih povzročajo genotipi, uvrščeni v rod *Xipapillomavirus*, lahko dosežejo velikost pesti in so karfiolaste površine. Pojavljajo se na glavi, vratu in drugih delih telesa. Kožne bradavice, ki se pojavljajo le lokalno na koži, običajno ne predstavljajo velikega problema in lahko tudi zaradi zadostnega imunskega odgovora brez posega same odpadejo. Bolne živali z vidnimi spremembami pa pogosto niso primerne za razstavo ali prodajo ter nadaljnjo rejo. Večji problem predstavljajo genitalne bradavice ali bradavice po prepuciju, ki vplivajo na reprodukcijsko sposobnost živali. Krave z bradavicami po vimenu pogosto ni mogoče normalno molsti, bradavice pa so pogosto vzrok dodatnih kontaminacij z bakterijami, kar vodi do mastitisov. Kožne bradavice genotipa BPV-4 nastopajo kot kofaktor za razvoj malignih sprememb v gastrointestinalnem traktu,



genotipa BPV-1 in BPV-2 pa lahko vplivata na razvoj malignih sprememb na urinarnem traktu, patogena sta tudi za kopitarje ter povzročata sarkoidne in tumurozne spremembe na koži konj.

3. *Epsilonpapillomavirus* predstavlja vrsti BPV-5 in BPV-8. Povzročata papilomatozo in fibropapilomatozne spremembe. Za genotip BPV-7 ni poznano, da bi povzročal klinično zaznavne spremembe. BPV-5 povzroča zlasti drobne bradavice velikosti riža predvsem po vimenu. Bradavice vsebujejo veliko količino infektivnega virusa, ki je relativno stabilen. Okužba se prenaša s kontaktom, okuženim priborom in piki insektov. Dovzetne so zlasti mlajše živali do starosti dveh let. Opažajo, da se zlasti pri pašnih živalih bradavice pojavljajo sezonsko. Do prenosov okužbe prihaja na pašniku preko pikov insektov, bradavice pa se razvijejo v zimskem obdobju leta.

Za okužbo so dovzetne vse kategorije goveda, bolezen se najbolj izrazi pri mladih živalih. Serotipi 1, 2 in 5 povzročajo rast bradavic karfiolaste oblike. Bradavice se pojavljajo zlasti po trebuhu in vimenu. Serotipi 3, 4 in 6 povzročajo ulcerativne spremembe na sluznicah prebavnega trakta. Razvije se karcinom prebavil. Živali se okužijo preko poškodovane kože, okužbo prenašajo krvosesi insekti. Papilomatoza je tako klinično prepoznavna in za postavitev diagnoze običajno ni potrebna laboratorijska preiskava. Živali je mogoče preventivno zaščititi pred obolenjem s preventivnim cepljenjem. Potrebno je uporabiti vrstno specifično vakcino za prizadete živali, ker ni navzkrižne zaščite. V času okužbe, ko so že prisotne kožne spremembe, je mogoče iz bradavic izdelati avtovakcino. Tkivo bradavice zmeljemo in pripravimo suspenzijo tkiva. S filtracijo suspenzije skozi ustrezen filter odstranimo bakterije, filtrat pa inokuliramo globoko muskularno. Za ozdravitev običajno zadoščata že dve zaporedni aplikaciji v količini od 1 do 2 mililitrov avtovakcine. Bradavice običajno odpadejo že v nekaj tednih po intramuskularni aplikaciji cepiva.

V Sloveniji se zlasti pri govedu, ki je na paši zelo pogosto srečujemo s papilomatozo. Bolezen je mogoče zdraviti z intramuskularno aplikacijo cepiva, posledično tvorbo specifičnih protiteles in nato odpravo nadležnih bradavic.

Vrsta: Papilomavirusi pri konjih (angl. *Equine papillomavirus*)

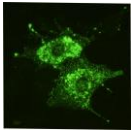
Spada v rod *Zetapapillomavirus*. Pri kopitarjih se običajno papilomatozne bradavice pojavijo po neodlakani koži smrčka, ustnicah in nozdrveh, pojavlja se tudi v obliki fibrosarkoma, ki pa ne metastazira. Lokalno je zelo vztrajen in se pogosto ponavlja tudi po kirurški intervenciji. Konji so občutljivi tudi za goveji papilomavirus.

Vrsti: Pasji in mačji papilomavirusi (angl. *Canine papillomavirus and feline papillomavirus*)

Obe vrsti spadata v rod *Lambdapapillomavirus*. Pasjega papilomavirusa ni mogoče razmnoževati na celičnih kulturah. Psi se okužujejo s kontaktom, preko poškodb kože. Inkubacija traja od 4 do 8 tednov. Klinično se bradavice izrazijo na sluznici gobca, jeziku, mehkem nebu in sluznicah nosu. Sčasoma lahko spontano odpadejo. Do spontanе ozdravitve lahko pride v enem letu. Do regresije pride zaradi aktivnosti CD4 in CD8 limfocitov. CD4 celice aktivirajo makrofage, ki uničijo inficirane karioците. V primeru subkutane ali intramuskularne aplikacije suspenzije okuženega tkiva žival razvije obrambne mehanizme, ne da bi prišlo do kožne oblike papilomatoze.

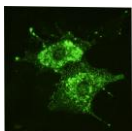
Bradavice lahko klinično zamenjamo z različnimi oblikami tumorjev. Diagnostiko opravimo z elektronsko mikroskopsko preiskavo ali imunohistološkimi preiskavami bradavice.

Virusi iz rodu *Polyomavirus* niso patogeni za domače živali, z izjemo nekatere vrste pri pticah, in ne povzročajo pomembnejših ekonomskih izgub v veterinarski medicini.



Dodatni študijski viri:

- Hostnik P., Toplak I. Papilomatoza pri govedu. *Vestnik Veterinarske zbornice Slovenije*, 2012, 7; 12-14.
- Schmitt M, Fiedler V, Müller M. Prevalence of BPV genotypes in a German cowshed determined by a novel multiplex BPV genotyping assay. *J Virol Methods* 2010; 170(1/2): 67–72.
- Wosiacki SR, Claus MP, Alfieri AF, Alfieri AA. Bovine papillomavirus type 2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(6): 635-8



3

ADENOVIRIDAE

Splošne lastnosti in klasifikacija adenovirusov

Adenovirusi so pogosto izolirani tako pri domačih kot pri prostoživečih živalih, najpogosteje iz gornjih dihalnih poti pa tudi iz fecesa – praviloma so vrstno specifični. Niso podvrženi pogostim mutacijam in so se evolucijsko spreminjali skupaj z gostitelji, saj jih lahko delimo glede na skupine vretenčarjev: adenovirusi sesalcev, ptic, plazilcev in dvoživk. Razmnožujejo se v dihalnem in prebavnem in urinarnem traktu ter na sluznicah vek. Okužba lahko vztraja več mesecev. Obolenje pri živalih pogosto poteka subklinično, razen v primeru naknadne infekcije s sekundarci. Nekateri podtipi adenovirusov povzročajo rakaste novotvorbe. Za veterinarsko medicino

Goveji herpesvirus 5no so pomembni zlasti adenovirsi psov in adenovirusi perutnine.

Virus je stabilen pri nizkih temperaturah, temperatura 56 °C ga inaktivira v 10 minutah. Ker nimajo ovojnice, so odporni tudi na detergente in druga maščobna topila.

V skladu z mednarodnim odborom za taksonomijo virusov ICTV družino *Adenoviridae* sestavlja pet rodov, in sicer *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Mastadenovirus*, *Siadenovirus* in *Ichtadenovirus*. Adenovirusne infekcije so razširjene praktično pri vseh vrstah domačih živalih. Karakterizacija posameznih izolatov temelji na osnovi antigenskih razlik med rodovoma in gostitelji kot tudi razlik v organizaciji genoma, razlik v strukturi genoma, dobljenimi s separacijo virusne DNA, ter z določanjem razlik nukleotidnega zaporedja v genu za polimerazo DNA in heksonskega proteina z navzkrižnim nevtralizacijskim testom in hemaglutinacijsko aktivnostjo. Velikost posameznih fragmentov določijo z elektroforezo v agaroznem gelu.

Razvrstitev adenovirusov v podtype temelji na osnovi hemaglutinacijske aktivnosti, velikosti vlaken na površini virusa in homologije virusne DNA. Klasifikacija temelji tudi na razmerju med količino gvanidina in citozina v virusnem genomu.

V posamezne rodove so uvrščene naslednje za veterinarsko medicino pomembne vrste: V rod *Atadenovirus* je uvrščenih pet vrst, od tega tri vrste najdemo pri domačih živalih in sicer: goveji adenovirus D, adenovirus rac in ovčji adenovirus. Virusi, uvrščeni v rod *Atadenovirus*, nimajo natančno določenega gostitelja, pač pa se pojavljajo pri gostiteljih iz različnih razredov vretenčarjev. Ugotovljeni so bili pri sesalcih, pticah in plazilcih. Gen za polimerazo je v družini *Adenoviridae* zelo dobro ohranjen, zato se prisotnost odseka genoma adenovirusov z začetnimi pari oligonukleotidov, ki pomnožujejo odsek gena za od DNA odvisne polimeraze, pogosto uporabljajo v diagnostiki z metodo PCR. Gen za beljakovino hekson je zelo variabilen in se uporablja za tipizacijo adenovirusov.

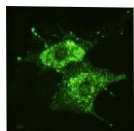
V rod *Aviadenovirus* je uvrščenih 7 različnih vrst, od tega adenovirus perutnine A, B, C, D in E ter adenovirus gosi in golobov. Virusi uvrščeni v ta rod imajo najdaljši genom glede na ostale viruse v družini *Adenoviridae*.

V rod *Mastadenovirus* je uvrščenih 22 vrst, od tega goveji adenovirus A, B in C, adenovirus kopitarjev A in B, adenovirus prašičev A, B in C, adenovirus psov in adenovirus ovac A in B ter različne humane vrste.

V rod *Siadenovirus* so uvrščene 3 vrste, za nas je zanimiva vrsta adenovirus puranov A.

Morfološke lastnosti adenovirusov

Adenovirusi so pod elektronskim mikroskopom videti okroglaste oblike, so brez lipoproteinske ovojnice, za njih je značilna tudi ikozaedralna simetrija nukleokapside, kar pomeni, da ga gradi struktura dvajsetih ploskev enakostraničnih trikotnikov, ki tvorijo 12 oglišč in 30 robov. Proteini



Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine

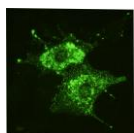
formirajo 252 kapsomer, od tega jih je 240 heksagonalnih in 12 pentagonalnih. Velikost viriona je v premeru med 70 in 110 nm. Adenovirusi pa spadajo med srednje velike viruse.

Rod / Vrsta	Gostitelj	Osnovni klinični znaki
ATADENOVIRUS		
<i>Bovine adenovirus D</i> (Slo. Goveji adenovirus D)	govedo	blaga respiratorna obolenja
<i>Ovine adenovirus D</i> (Slo. Ovčji adenovirus tip D)	ovce	blaga respiratorna obolenja
<i>Duck adenovirus A</i> (Slo. Adenovirus rac)	perutnina	padec nesnosti, hepatitis
AVIADENOVIRUS		
<i>Fowl adenovirus A, B, C, D, E</i> (Slo. Adenovirusi perutnine)	perutnina	blag padec nesnosti, hepatitis (ostali tipi)
<i>Falcon adenovirus A</i> (Slo. Sokolji adenovirus)	sokol	
<i>Goose adenovirus</i>	gosi	blag padec nesnosti
<i>Duck adenovirus</i> (slo.: Virus padca nesnosti perutnine)	race	blag padec nesnosti, pri kokoših povzroča bolezen Egg drop sindrom
ICHTADENOVIRUS		
MASTADENOVIRUS		
<i>Canine adenovirus</i> (Slo. Virus kužnega hepatitisa psov)	psi	kužni hepatitis psov (tip 1) kužni treheobronhitis psov (tip 2)
<i>Equine adenovirus A, B</i> (Slo. Adenovirusi konj)	konji	blaga respiratorna obolenja
<i>Porcine adenovirus A, B, C</i> (Slo. Adenovirusi prašičev)	prašiči	blaga respiratorna obolenja
<i>Ovine adenovirus A, B</i> (Slo. Ovčji adenovirusi, tip A in B)	ovce	blaga respiratorna obolenja in diareje pri jagnjetih
<i>Bovine adenovirus A, B, C</i> (Slo. Adenovirus goveda, tip A, B, C)	govedo	blaga respiratorna obolenja, pri teletih diareje
SIADENOVIRUS		
<i>Turkey adenovirus A</i> , (Slo. Virus hemoragičnega enteritisa puranov)	purani	blag padec nesnosti, enteritis

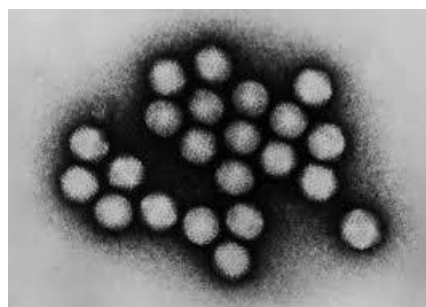
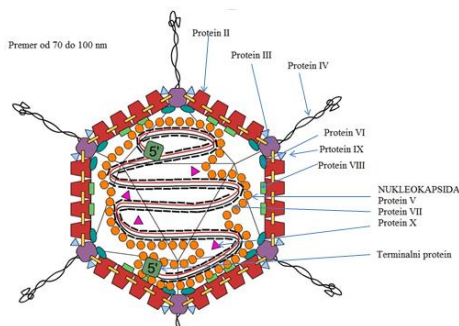
Preglednica 3: Razvrstitev adenovirusov pomembnih za veterinarsko medicino z osnovnimi podatki o gostiteljih in kliničnih znakih bolezni.

Kapsida je zgrajena iz 11 različnih strukturnih proteinov, ki jih označujemo z rimskimi številkami od I do XI, odvisno od molekularne mase posameznega proteina. Heksagonalna kapsomera je zgrajena iz treh polipeptidnih verig (protein II, sinonim hekson), ki se nahajajo v centru, obdajajo pa jih proteini VI, VIII in IX. Pentamerne kapsomere so zgrajene še iz proteina IV, to je molekula v obliki lovke. Te lovke izhajajo iz vsakega od 12 pentonov v kapsidi. Lovka ima koren, vrat in betič. Heksoni, pentoni in lovke so najpomembnejši antigeni adenovirusov. Pentoni imajo "toksično" delovanje, ki povzroča hiter pojav citopatskih efektov in odlepljenje celic s površin, na katerih rastejo, lovke (protein IV) pa imajo tudi hemaglutinacijsko aktivnost.

Protein III in protein IIIa sodelujeta pri penetraciji virusa v celico, protein IV – lovka, nastopa kot hemaglutinin in je tudi odgovoren za vezavo virusa na celico. V sredici virusa se poleg virusne DNA nahaja še protein TP (angl. *terminal protein*), ki je vezan na 5' konec verige genoma in proteina V in



VII.



Slika 8: Shematski prikaz zgradbe adenovirusa.

Slika 9: Elektronsko mikroskopski posnetek adenovirusov(<http://www.ivdcare.com/aden.o.html>).

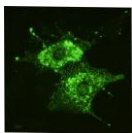
Poliipeptid III je vezan na pentonsko in heksonske baze in je v povezavi s proteinom VI. Vsak virion vsebuje po 60 molekul proteina III. Poliipeptid VI je lociran pod heksonom. Poliipeptid VIII je lociran v notranjosti kapside. Poliipeptid VII obdaja virusno DNA, virion vsebuje 800 kopij tega proteina.

Genom adenovirusov

Organizacija genoma je značilna za posamezni rod. Virusni genom predstavlja linearna nesegmentirana dvojnovijačna molekula DNA s 16 geni. Velik je od 20 do 38 kbp. Virusna DNA ima na vsakem 5' koncu kovalentno vezan protein (angl. *terminal protein*), ki do 100-krat poveča njeno infektivnost. Terminalni protein sproži pomnoževanje virusnega genoma v jedru celice. Viruse uvrščamo v različne skupine po strukturi genoma, ki jo lahko proučujemo z restrikcijskimi endonukleazami. Posamezni izolati znotraj ene skupine morajo imeti homologijo fragmentov DNA višjo od 70 %. Geni z oznakami pol, pTP in DBP kodirajo polimerazne proteine, odgovorne za pomnoževanje virusne DNA. Genom rodu *Mastadenovirus* je krajši v primerjavi z virusi iz rodu *Aviadenovirus*, najkrajši genom imajo iz rodu *Siadenovirus*. Zaporedje baznih parov na 3' koncu verige DNA je ponovljeno v obratnem vrstnem redu na 5' koncu. Genom vsebuje regijo ITR (angl. *inverted terminal repeats*), velikosti od 100 do 200 bp. Regiji ITR sta si na 5' in 3' koncih posamezne verige DNA komplementarni, kar omogoča tvorbo cirkularnih verig DNA. Končni deli genoma se med posameznimi rodovi razlikujejo in so specifični za posamezni rod. Virusni genom kodira 11 strukturnih in najmanj 30 nestrukturnih proteinov.

Pomnoževanje adenovirusov

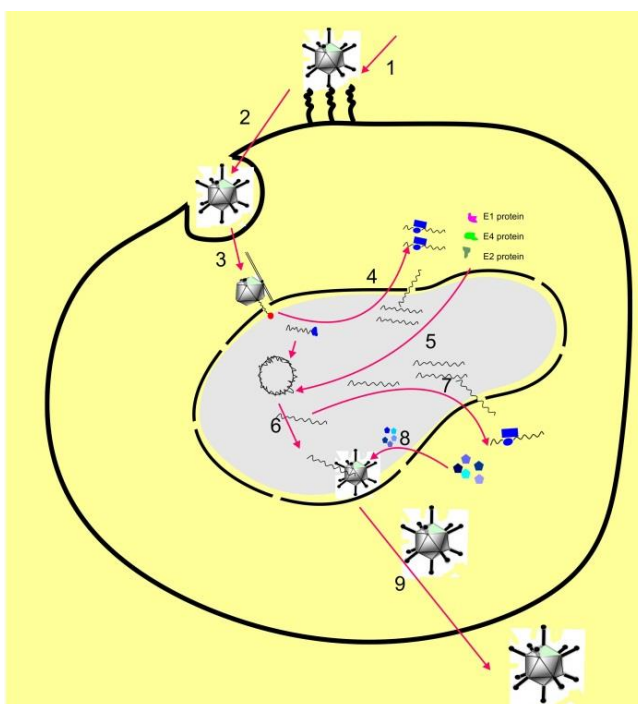
Pomnoževanje adenovirusov; prepis v mRNA, replikacije virusne DNA in sestavljanje viriona poteka v jedru celice. Najprej se virus veže na celico s proteini IV (lovke). Na površini občutljivih celic se nahajajo receptorji (protein integrin) za ta virusni protein. Receptorje predstavljajo tudi molekule MHC in molekule sialoglikoproteinov in tako imenovani receptorji CAR (angl. *coxsackie adenovirus receptor*). V naravi se infekcija najpogosteje zgodi preko aerosola ali s kontaktom preko konjunktive ali oropharingsa. Zelo je pomembna nespecifična obramba organizma, glycocalyx in mucin, ki se nahajata na površini sluznic, v veliki meri inhibirata adsorbcijo virusa. V celico vstopi virus po principu endocitoze, tako da virus-receptor kompleks prodre skozi celično. V endosomu potuje do jedrne membrane celice. Toksična aktivnost virusnih pentamer in sprememba pH v



endosomu povzroči rupturo, le-ta po mikrotubulih potuje do jedrne membrane, tu kapsida delno razpade, tako da prispe do jedrne membrane le virusna DNA, ki vstopi v jedro skozi jedrne pore.

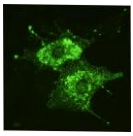
Virusni genom je zgrajen iz dveh verig; levosučne in desnosučne verige. Pred pomnoževanjem genoma poteka takojšen delni prepis DNA v zgodnje mRNA. Prepisujeta se obe verigi. Prepis katalizira celična polimeraza RNA. Gostiteljska celica posledično vstopi v fazo S in se vključi v sintezo virusnih proteinov, potrebnih za replikacijo virusne DNA. Poznano je, da pomnoževanje virusne DNA sprožijo in regulirajo trije proteini, protein TP (angl. *terminal protein*), ki je vezan na 5' konec, bindin-protein DNA in celična od DNA odvisna polimeraza.

Znotraj ene ure po infekciji že nastane nestrukturni protein z oznako E1A. Ta protein regulira nadaljnje prepisovanje in aktivira ekspresijo genov za zgodnje proteine. Nestrukturni protein E1B zavre celično apoptozo. V pomnoževanju virusnega genoma sodelujejo tudi celični proteini. Sledi ekspresija gena E4 in posledično sinteza proteina E4, ki regulira sintezo virusne DNA. Prepisovanje lahko razdelimo v tri faze. V prvi fazi se prepisejo geni odgovorni za regulacijo/ pomnoževanja virusne DNA, z oznako E1A, E1B, E2, E3, in E4. Protein E1A je potreben za sintezo proteinov, vključenih v virusno replikacijo DNA, in ščiti virus pred celičnimi antivirusnimi proteini – interferoni. Prav tako protein E1A neposredno sproži apoptozo celice z aktivacijo celičnega proteina P53 (angl. *tumor suppressor protein*). Proteina E1A in E1B prav tako v nekaterih primerih sprožita onkogeno transformacijo celice. Nestrukturni protein E3 zavira citolizo in blokira prenos molekul MHC na površino celic.



Slika 10: Replikacijski cikel adenovirusov:

(1) pritrjevanje virusa na celične receptorje – integrini, (2) vstop virusa v citoplazmo z uvajanjem citoplazemske membrane ter formiranje endosoma, (3) izstop iz endosoma in potovanje po mikrotubulih do jederne membrane celice, (4) v jedro vstopi le virusna DNA in se prepíše v mRNA za nestrukturne proteine. (5) Nestrukturni proteini iz prostih ribosomov potujejo v jedro celice in sprožijo prepis komplementarne DNA, ki služi kot matrica za nove virusne DNA (6), sledi prepis v mRNA za strukturne proteine. (7) Strukturni proteini se transportirajo v jedro celice (8), kjer pride do sestavljanja kapside in uvajanja virusne DNA v kapsido. (9) Zrel virus tako zapusti najprej jedro celice in celično membrano skozi poškodovane pore.



Pomnoževanje virusne DNA sproži akumulacija proteina E2 in prehod celice v fazo S. Virusna polimeraza DNA (nestrukturni protein E2) se veže na terminalni protein, pripet na 5' konec virusne DNA. Po končani replikaciji DNA se prepíše pozna mRNA, ki se prevede v pozne strukturne proteine. Strukturni proteini se iz citoplazme transportirajo v jedro, kjer se združujejo v kapsido, v katero se uvede virusna DNA.

Adenovirusi pri pomnoževanju adenovirusov na celičnih kulturah povzročajo citopatski efekt. Celice postanejo okroglaste in se združujejo v grozde. V jedru okuženih celic so vidne inkluzije.

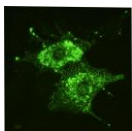
Diagnostika adenovirusov

Najprimernejši vzorci, ki jih odvzamemo bolni živali, so brisi gornjih dihalnih poti, rektalni bris ali bris konjunktive, lahko tudi feces in urin. Za virološko preiskavo ob sekciji odvzamemo košček pljuč, bezgavk in vranice. Prisotnost virusa lahko neposredno dokažemo v odvzetih celicah z imunofluorescenčno metodo ali iz odvzetih brisov opravimo izolacijo virusa na celični kulturi. Adenovirusi perutnine se uspešno pomnožujejo v oplojenih kokošjih jajcih ali na celični kulturi piščančjega izvora. Izolacija siadenovirusov je težavna, ker imajo limfotropne lastnosti, primerna je kultura makrofagov. Serum, ki ga dodajamo gojiščem, ne sme vsebovati protiteles proti adenovirusom, ker le-ti blokirajo rast. Virusno DNA lahko dokažemo z metodo PCR ali hibridizacijskimi tehnikami. Gen za heksoški protein in gen za polimerazni protein sta zelo ohranjena, zato lahko z ustreznim izborom začetnih oligonukleotidov dokazujemo adenoviruse iz vseh poznanih rodov. Virusne antigene je mogoče dokazovati s testom ELISA, adenoviruse lahko prepoznamo tudi pod elektronskim mikroskopom. Glede na veliko razširjenost adenovirusnih infekcij imajo serološke tehnike omejeno uporabo. Na akutno infekcijo kažejo rezultati dokazovanja prisotnosti protiteles skupine IgM ali dvig titra nevtralizacijskih protiteles v dveh primerjalno odvzetih vzorcih v razmiku 14 dni.

Vrsta: Virus kužnega hepatitisa psov (angl. *Canine adenovirus 1*)

Znotraj adenovirusov psov poznamo dva tipa virusov, z oznakama CAV-1 in CAV-2, ki sta si serološko močno sorodni, vendar imata različen celični tropizem. Uvrščeni sta v rod *Mastadenovirus*. Kužni hepatitis psov povzroča adenovirus tip 1. Zanj so dovzetne tudi lisice, volkovi in medvedi. Tip 1 ima topizem predvsem do hepatocitov in renalnih celic, tip 2 pa do epitelnih celic respiratornega in prebavnega trakta. Adenovirus 1 povzroča bolezen, imenovano kužni hepatitis psov, serotip 2 pa povzroča respiratorna obolenja. Razlikovati ju je mogoče z analizami virusne DNA. Dovzetni so zlasti psi, mlajši od 6 mesecev. Virus pasjega hepatitisa je občutljiv na maščobna topila, kot so eter, alkohol, kloroform. V okolju pri temperaturi pod 20 °C virus preživi več tednov, temperatura nad 60 °C pa ga inaktivira v 3–5 minutah. Pasji adenovirus je mogoče razmnoževati v celicah pasjega izvora. Virus običajno vstopi v organizem po nazofaringealni poti in se namnoži v kriptah tonzil ali Payerjevih ploščah. Sledi viremija, vstopa v endotelne in parenhimske celice različnih organov, še posebno v jetra, ledvica, vranico in pljuča. Okužba povzroči masivno destrukcijo hepatocitov, kar pogosto vodi do pogina živali. Pri živalih, ki bolezen prebolijo, se pogosto pojavi glomerulonefritis, ki nastane kot posledica imunskega odgovora na virus-protitelesa kompleksa, zaradi česa se pojavijo edemi. Patohistološko so v okuženih celicah jeter vidne intracelularne inkluzije.

Pri psih se bolezen kaže v različnih oblikah; perakutni obliki, to je (1) hitra oblika, ki se kaže zlasti pri mladičih. Običajno je to nazofaringealna pot okužbe. Tonzile so primarno mesto razmnoževanja virusa, nato se razširi po telesu. V času viremije žival izloča virus z vsemi izločki. Mladiči čez noč poginejo, visok pogin zasledimo tudi pri akutni obliki, ki se najprej kaže v izgubi apetita, povišani



Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine

telesni temperaturi, bruhanju, krvavi driski, večina psov pa zboli za milo obliko bolezni, ki se kaže v povišani telesni temperaturi, apatiji, anoreksiji, ki običajno traja od 4 do 9 dni. Virus povzroča akutni hepatitis, obolenje respiratornih organov in nefritis. V akutni fazi bolezni se virus nahaja v vseh organih, namnoži se tudi v epitelnih celicah roženice, posledica tega je sindrom modrih oči (angl. *blue eye sindrom*). Pri 20% okuženih psov se zaradi očesne lokalizacije virusa v obdobju 4 do 6 dni po okužbi pojavijo spremembe na roženici. Bolna žival je otožna, neješča, pojavi se krvava driska, vidne so petehialne krvavitve po sluznici dlesni, posamezne živali poginejo. Poznana je tudi blaga oblika bolezni (2) z nezaznavnimi kliničnimi znaki. Žival lahko virus izloča z urinom vse do 6 mesecev. Pri lisicah se okužba kaže tudi z nevrološkimi znaki in klinična slika spominja na steklino.



Slika 11: Sprememba barve (modra) roženice pri psu se pojavi pri 20% psih okuženih z adenovirusom (povzeto po http://www.qopetsamerica.com/dog-health/anterior_uveitis.aspx, 23.02.2012).

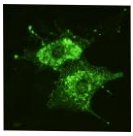
Laboratorijska diagnostika temelji na izolaciji virusa na celični kulturi pasjega izvora. V času viremije je najprimernejši vzorec krvi ali telesni tekočin, vendar se s pojavom zaščitnih protiteles uspešnost izolacije zmanjša. Iz vzorca urina je možno virus izolirati tudi do 6 mesecev po okužbi. Zelo uporabne so molekularne metode. Pri metodi PCR pomnožujemo segment gena za nestrukturni protein E3, ki je zelo ohranjen. Vrsto CAV-1 ločimo od vrste CAV-2 z analizo nukleotidnega zaporedja produkta PCR. Za detekcijo virusnega genoma je primeren tudi vzorec fecesa in urina, saj preboleznik izloča virus še do 6 mesecev. Virus lahko dokažemo tudi z imunofluorescenčnimi metodami v histoloških rezinah jeter ali ledvic. S serološkimi metodami pa lahko dokažemo prisotnost specifičnih protiteles v krvi psa. Preventivno lahko pse tudi cepimo.

Virus kužnega hepatitisa psov je prisoten tudi v Sloveniji. Večvalentna cepiva vsebujejo tudi atenuiran pasji adenovirus. Študija o razširjenosti znotraj populacije psov ni bila opravljena.

Vrsta: Virus kužnega laringotraheitisa psov (angl. *Canine adenovirus 2*)

Adenovirus psov 2 (CAV-2) ima tropizem do respiratornih organov, povzroča tonzilitis, faringitis, traheitis in bronhopnevmonijo. Adenovirus psov tip 2 je zelo razširjen med psi. Diferencialno diagnostično lahko CAV-2 ločimo od CAV-1 z analizo virusne nukleinske kisline. Ob uporabi restrikcijskih encimov dobimo različno dolge fragmente virusne DNA, aminokislinsko zaporedje genoma kaže 70-odstotno sorodnost. Virus aglutinira humane in podganje eritrocite.

Razmnožuje se v celicah respiratornih organov, v celicah sluznic nosne votline, traheje, bronhijev pa tudi v celicah alveol. V od 5 do 6 dneh po infekciji že lahko dokažemo prisotnost nevtralizacijskih protiteles. Virus lahko razmnožujemo v celicah pasjega izvora. Serum, ki ga dodajamo gojiščem za celične kulture, ne sme vsebovati protiteles proti adenovirusom, saj preprečijo pomnoževanje virusa.

**Vrsta: Adenovirusi pri govedu (angl. Bovine adenovirus)**

Pri govedu so adenovirusne infekcije zelo pogoste. V posameznih rejah ugotavljajo do 80-odstotno prevalenco specifičnih protiteles. Poznanih je 10 različnih serotipov adenovirusov pri govedu. Adenovirusi pri govedu so uvrščeni v rodova *Mastadenovirus* in *Atadenovirus*. Pogosto je mogoče virus izolirati iz vzorcev, odvzetih klinično zdravim živalim. Posamezni sevi povzročajo nekroze endotelinih celic respiratornega in gastrointestinalnega trakta. Posledica lokalnih poškodb so zaprtje kapilar in nekroze epitela. V patohistoloških preparatih so vidne intranuklearne inkluzije. Virus lahko dokažemo v vzorcih nosnega ali konjunktivalnega brisa pa tudi v vzorcih fecesa.

Vrsti: Equine adenovirus A in B (sinonim: adenovirusi kopitarjev serotip A in B)

Poznani sta dve vrsti konjskega adenovirusa. Vrsta A ima afiniteto do gornjih dihalnih poti, vrsta B pa je gastrointestinalni tip. Adenovirusi pri konjih povzročajo vnetje gornjih dihalnih poti in pljučnice. Dovzetna so zlasti žrebeta. Sekundarne okužbe z bakterijami so lahko vzrok mukopurulentnemu nosnemu izcedku in kašlju. Diagnozo postavimo na osnovi dokaza povzročitelja z izolacijo virusa na celični kulturi. Metoda PCR je zelo uporabna v diagnostiki. Pomnožujemo specifičen odsek gena za heksonski protein. Virus na celicah konjskega izvora povzroča citopatski efekt.

Vrsta: Adenovirusi perutnine

Kokošji adenovirusi, uvrščeni v rod *Aviadenovirus*, predstavljajo zelo heterogeno skupino. V 5 različnih vrst z oznakami od A do E je uvrščenih osem tipov (Fowl adenovirus: FAdV1 do 8a in še tipi od FAdv 8b do 11). Vsi tipi niso patogeni. Povzročitelj sindroma padca nesnosti pri perutnini (angl: *egg drop syndrome virus*) je uvrščen v rod *Atadenoviridae*, vrsta *duck adenovirus 1* (DAdV-1). Virus DAdV-1 je sicer najbolj patogen za kokoši, vendar so ga najprej ugotovili pri racah, od tod se je tudi ohranila uvrstitev znotraj račjih vrst. Ti virusi imajo hemaglutinacijske lastnosti, aglutinirajo eritrocite kokoši, rac, puranov. Virus lahko namnožimo v oplojenih kokošjih ali račjih jajcih. Prvi klinični znaki so razbarvanje lupine, jajca imajo izredno mehko lupino ali so celo brez nje, sledi padec nesnosti in izguba barve jajčne lupine. Okužba se običajno prenaša z jajci, lahko pa tudi iatrogeno (z ubodom igle ob cepljenju), zato je treba upoštevati pravila uporabe sterilnih igel. Virus se razmnoži v epitelnih celicah uterusa in jajcevodov, prisoten je tudi v vranici in levkocitih.

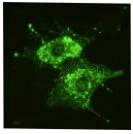
V diagnostiki uporabljamo test izolacije virusa na kokošjih zarodkih in metodo PCR, pri kateri pomnožujemo ohranjene regije gena za heksonski protein.

Vsi znani virusi FAdV povzročajo tudi inkluzijski hepatitis pri brojlerjih (angl. Inclusion body hepatitis - IBH). Bolezenski znaki so neznatni: piščanci so neješčji, zgrbljeni, našopirjeni. Obolevnost je nizka, traja nekaj dni, pogin je do 10-odstoten.

Okužbe z adenovirusi predstavljajo tudi v Sloveniji velik ekonomski problem.

Vrsta: Virus hemoragičnega enteritisa puranov (angl. Turkey adenovirus A)

Hemoragični enteritis je akutna virusna bolezen puranov. Povzročitelj spada v rod *Siadenovirus*. Poznana sta dva serotipa. Obolenje se pojavlja pri puranih, starejših od 4 tednov. To je limfocitolitična bolezen puranov. Intenzivno se razmnožuje v limfocitih in makrofagih. Klinični znaki so potrtost, krvavi iztrebki in pogin. V jati je obolevnost tudi do 100-odstotna, pogin pa do 20-odstoten. Bolezen traja od 7 do 10 dni. Virus se razmnožuje v limfocitih B in makrofagih, zato pride do večje dovzetnosti do sekundarnih infekcij. Zaradi zaviranja normalnega delovanja limfocitov B in makrofagov so purani izredno občutljivi na sekundarne okužbe, zlasti na *E. coli*, kar vodi do

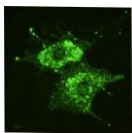


koliseptikemije in lokaliziranega vnetja seroznih open. Do iztekanja tekočine v lumen črevesja prihaja zaradi velike prisotnosti citokinov in histamina, nakopičenega v sluznici dvanajsternika. V preventivne namene purane lahko cepimo z živimi atenuiranimi cepivi.

S problematiko adenovirusnih infekcij v Sloveniji so se še največ ukvarjali na področju perutninske proizvodnje. Dokazana je prisotnost virusa *egg drop* sindroma in mnogih drugih adenovirusov perutnine.

Dodatni študijski viri:

1. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EL. Virus taxonomy: 9th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2012, 153–61.
2. Zadavec M, Slavec B, Krapež U, et al. Inclusion body hepatitis associated with fowl adenovirus type 8b in broiler flock in Slovenia: a case repor. Slov Vet Res 2011; 48(3/4): 107–13.



4

HERPESVIRIDAE

Splošne lastnosti in klasifikacija herpesvirusov

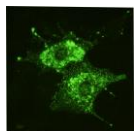
Družina *Herpesviridae* skupaj z družinama *Alloherpesviridae* in *Malacoherpesviridae* tvorijo rod *Herpesvirales*. Herpesvirusi iz družine *Herpesviridae* lahko okužijo sesalce, plazilce in ptice. Pri vseh vrstah domačih živali se srečujemo z ekonomsko pomembnimi boleznimi, ki jih povzročajo virusi iz te družine. Poznanih je okrog 100 različnih vrst herpesvirusov. Ti virusi so razmeroma občutljivi na vplive okolja. Njihovo preživetje izven telesa je kratkotrajno, zato je najpogostejši neposreden prenos virusa. Okužba poteka običajno iz bolne živali na zdravo, zanesljiva je še zlasti, če gre za prenos preko sluznic. Nekatere vrste virusa imajo tudi nevrotropne lastnosti, nekatere imajo afiniteto do tkiva placent, druge pa so limfotropne.

Skupna lastnost herpesvirusom je tudi zmožnost, da se prikrijejo v organizmu. Govorimo o latentni okužbi, kar pomeni, da je žival, ki se je okužila s herpesvirusom, lahko dosmrtni nosilec virusa, ki se periodično reaktivira. Virusni genom se kot cirkularna DNA ohranja v jedru ganglijskih celic ali pa v limfocitih. Herpesvirusi lahko med pomnoževanjem prehajajo iz okužene v neokuženo celico, zato zaščitna protitelesa, ki se nahajajo izven celice (organizem jih tvori ob infekciji ali pa so posledica cepljenja), niso najbolj učinkovita. V tem primeru so učinkovitejše žive vaccine, ki stimulirajo citotoksične limfocite T in take celice uničijo.

Za herpesviruse je značilno, da v gostitelju vzpostavijo trajno (perzistentno), prikrito (latentno) okužbo, ki lahko po določenem času vodi v reaktivacijo okužbe in v sestavljanje novih virionov. Sposobnost herpesvirusov, da lahko v gostitelju vzpostavijo dosmrtno okužbo, je povezana z razvojem učinkovitih protiimunskih mehanizmov, ki so jih virusi pridobili oziroma razvili tekom več milijonov let dolge koevolucije s svojim gostiteljem. Genom herpesvirusov vsebuje zapise za različne imunomodulatorne beljakovine, virokine, ki specifično blokirajo posamezne stopnje imunskega odziva. Herpesvirusi se uspešno izogibajo tako prirojenemu kot pridobljenemu imunskemu odzivu. Ena poglavitnih tarč herpesvirusov je oviranje predstavitve virusnih antigenov, povezanih z molekulami poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa razreda I (PHK I).

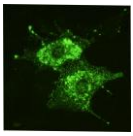
Družina *Herpesviridae* je uvrščena v red *Herpesvirales*, sestavljajo pa jo štiri poddružine: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammapherpesvirinae* in neimenovana poddružina. Ta razdelitev temelji na bioloških značilnostih virusov in zlasti na razliki v zgradbi genoma. Posamezno poddružino sestavlja večje število različnih rodov. Antigenska sorodnost med herpesvirusi je kompleksna, virusi imajo skupne antigene znotraj družine, vendar večje razlike nastopajo v glikoproteinih, ki se nahajajo v plašču virusa. Virusi so razvrščeni v poddružine in rodove, vendar je nivo klasifikacije v rodove pogosto še nepopoln. Prvotno so bili posamezni virusi razvrščeni na osnovi bioloških lastnosti, danes pa klasifikacija temelji na osnovi analize genoma, zato v zadnjih letih prihaja do prerazporejanja znotraj družine.

Obstojnost herpesvirusov je odvisna od temperature in vlage okolja ter pH vrednosti. V zimskih mesecih virus ostane aktiven v naravnem okolju več kot mesec dni, poleti pa le do enega tedna. Zelo stabilen je pri temperaturah, ki so nižje od -20°C . Temperatura 63°C virus inaktivira v eni minuti, v gnojevki pri 5°C ostane kužen do 4 tedne, pri dvigu temperature na 40°C pa samo 2 uri. Virus je stabilen v območju pH od 6,0 do 9,0. Zaradi lipidov v ovojnici je občutljiv na mnoga razkužila, posebno na topila.



Poddružina/Rod/Vrsta	Osnovni simptomi bolezni
ALPHAHERPESVIRINAE	
ILTOVIRUS	.
<i>Gallid herpesvirus 1</i> (Slo.: virus kužnega laringotraheitisa perutnine)	oteženo dihanje, vnetje dihal
MARDIVIRUS	
<i>Gallid herpesvirus 2</i> (Slo.: Virus Marekove bolezni, tip 1)	nevrolimfomatoza, paraliza nog in kril.
<i>Gallid herpesvirus 3</i> (Slo.: Virus Marekove bolezni, tip 2)	ni patogen
SIMPLEXVIRUS	
<i>Bovine herpesvirus 2</i> (Slo.: Virus govejega mamilitisa)	ulcerativne spremembe na koži seskov.
VARICELLOVIRUS	
<i>Bovine herpesvirus 1</i> (Slo.: IBR/IPV)	respiratorno obolenje, abortusi
<i>Bovine herpesvirus 5</i> (Slo.: Virus govejega encefalitisa)	ataksije, paralizirane, krči
<i>Canid herpesvirus 1</i> (Slo.: Pasji herpesvirus)	respiratorno obolenje, abortusi, vezikule po sluznicah
<i>Caprine herpesvirus 1</i> (Slo.: Kozji herpesvirus)	virusni abortus
<i>Equid herpesvirus 1, 4</i> (Slo.: virus konjskega rinopneumonitisa)	respiratorno obolenje, abortusi
<i>Equid herpesvirus 3</i> (Slo.: Virus koitalnega eksantema konj)	motnje v reprodukciji
<i>Equid herpesvirus 8 in 9</i> (Slo.: Konjski herpesvirus 8 in 9)	respiratorno obolenje
<i>Feline herpesvirus 1</i> (Slo.: Herpesvirus mačk)	abortusi, respiratorno obolenje
<i>Suid herpesvirus 1</i> (Slo.: Pseudorabies virus, virus Aujeszkijske bolezni)	pogin pujskov, abortusi, patogen tudi za pse
NEIMENOVANI ROD	
<i>Suid herpesvirus 2</i> (Slo.: Herpesvirus prašičav 2)	ni patogen
MACAVIRUS	
<i>Alcelaphine herpesvirus 1, 2</i> (Slo.: Korica gangrenoza virus (Malignant chatterhal fever))	oboleva govedo, povišana temperatura, poškodba vida
<i>Bovine herpesvirus 6</i> (Slo.: Goveji herpesvirus 6)	Konjunktivitis, blaga respiratorna obolenja
<i>Caprine herpesvirus 2</i> (Slo.: korica gangrenoza virus (Malignant chatterhal fever))	oboleva predvsem govedo in bizoni, povišana telesna temperatura, nosni izcedek, sprememba barve roženice, pogin predvsem pri bizonih
<i>Ovine herpesvirus 2</i> (Slo.: Herpesvirus ovac 2)	Pri ovcah subklinična okužba, patogen za bizone, govedo
<i>Suid herpesvirus 3,4,5</i> (Slo.: Prašičji herpesvirus 3, 4, 5)	Subklinična okužba prašičev
PERCAHERPESVIRUS	
<i>Equid herpesvirus 2 in 5</i> (Slo.: Herpesvirus konj 2 in 5)	Blago respiratorno obolenje
NEIMENOVAN ROD	
<i>Equid herpesvirus 7</i> (Slo.: Herpesvirus konj)	Subklinična okužba

Preglednica 4: Klasifikacija herpesvirusov, pomembnih za veterinarsko medicino po ICTV (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>).



V družino *Herpesviridae* spadajo virusi okroglaste oblike, velikosti od 150 do 300 nm. Sestavljeni so iz štirih komponent: lipoproteinski plašč, amorfni material, imenovan tegumen, ikozaedralna nukleokapsida s kapsomerami in genom.

Virusi iz poddružine *Alphaherpesvirinae* imajo širok spekter gostiteljev, kratek razmnoževalni cikel, hitro širjenje med celicami, delujejo zelo destruktivno na celično kulturo in imajo zmožnost latentne infekcije. Mnogi virusi, uvrščeni v poddružino *Alphaherpesvirinae*, povzročajo lokalne spremembe, spremembe na koži in sluznicah ter genitalijah in respiratornih organih. Virus se običajno širi s kontaktom, najpogostejši prenos je s kontaktom preko sluznic, redkejši pa z aerosolom. Gravidne živali v fazi viremije pogosto abortirajo. Skupna lastnost alfa herpesvirinam je tudi virusni nevrotropizem. Pri alfa herpesvirinah virusna DNA v fazi replikacije preide iz linearne v cirkularno obliko.

Poddružina: *Betaherpesvirinae*

Za to skupino je značilna počasno pomnoževanje virusa. V času latence se virus zadržuje v sekretornih žlezah, ledvicah in limfnih vozlih. Limfotropizem je skupna lastnost virusov poddružine *Betaherpesvirinae*, kar pomeni, da se virus dolgo časa nahaja v limfocitih, sicer pa po primarni okužbi vztraja tudi v osrednjem živčnem sistemu. V to poddružino spadajo nekateri humani herpesvirusi, na primer citomegalovirus. Pomembnejših virusov, uvrščenih v to poddružino, za veterinarsko medicino ne najdemo.

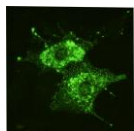
Poddružina *Gammaherpesvirinae*

Za *Gammaherpesvirinae* je značilen limfotropizem, za nekatere vrste pa tudi posledična onkogeno transformacija. Poddružino sestavlja pet rodov, najpomembnejši je rod *Macavirus*, kamor sta uvrščeni vrsti *Alcelaphine herpesvirus 1* in vrsta *Ovine herpesvirus 2*, ki povzročata pri govedu korico gangrenozo.

V poddružino neklasificiranih virusov spada prašičji herpesvirus tip 2 (angl. *suid herpesvirus 2*), ta je limfotropen virus. Okuži zlasti limfocite CD4⁺, se v njih namnoži in se ob lizi celic širi po organizmu. Poleg tega ovira delovanje drugih celic imunskega odziva: z indukcijo apoptoze ubija sosednje neinficirane celice T, spreminja izražanje CD3 in CD4 antigenov na površini celic, vpliva na izločanje citokinov iz okuženih celic in na številne druge načine učinkuje na aktivacijo imunskih celic ter njihovo medsebojno signaliziranje; vse to zagotavlja učinkovit način širjenja virusa po organizmu.

Zgradba herpesvirusov

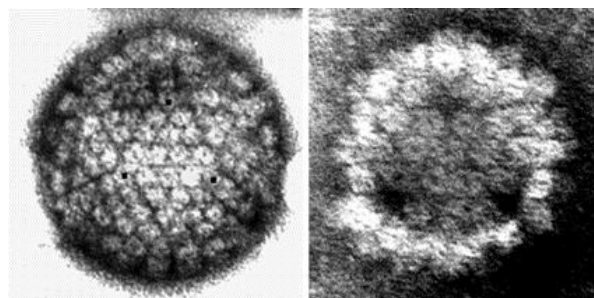
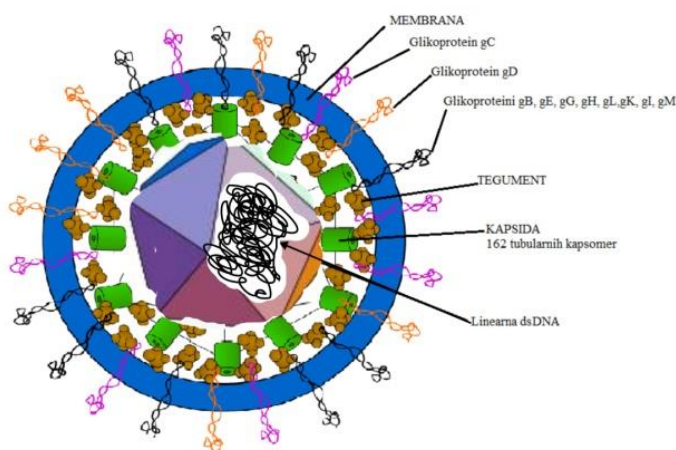
Herpesvirusi so virusi z lipoproteinsko ovojnico, ki izvira iz membran Golgijevega aparata. V ovojnico je vgrajenih 10 različnih proteinov z oznakami (gB, gC, gD, gE, gH, gI, gK, gL, gM, gN). Virus je okroglaste oblike, v premeru od 120 do 250 nm, iz površine štrlijo beljakovinski betiči velikosti od 8 do 10 nm. Vsebujejo nukleokapsido ikozaedralne oblike, ki jo sestavlja 162 kapsomer. Posamezna kapsomera je zgrajena iz 12 pentamer in 150 heksamer. Genom predstavlja molekula DNA, ki je zvita v klobčič, obdaja pa ga kapsida. Velikost nukleokapside v premeru znaša od 95 do 105 nm. Med kapsido in plaščem je razporejena masa glikoproteinskih molekul, poznana pod imenom tegument. Herpesvirusi so sestavljeni iz nad 30 strukturnih proteinov, od tega jih 6 sestavlja



Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine

nukleokapsido in kar 12 proteinov je vgrajenih v plašč viriona. Plašč viriona vsebuje tudi lipide, ki jih pridobi v fazi pomnoževanja.

Virus bolezni Aujeskega (angl. *suid herpesvirus 1*) vsebuje več kot 20 različnih strukturnih proteinov. V frakciji virusne ovojnice so izolirali 9 glikoproteinov, ki so označeni z gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL in gK. Glikoproteini gB, gD, gH in gL so nujni za replikacijo virusa, proteini, kot so gC, gE, gI in gK, pa niso nujni. Zelo imunogen je protein gB. Pomemben je za tvorbo specifičnih protiteles in je nujno potreben za prehajanje virusa iz celice v celico.



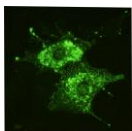
Slika 12: Shematski prikaz herpesvirusov (prilagojeno po; <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:200661>), 23.02.2012.

Slika 13: Elektronsko mikroskopski posnetek herpesvirusa (povzeto po <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016817020900118X>, 23.02.2012.)

Protein gD je vključen v penetracijo virusa v celico in je tudi nosilec imunogenosti živali. Živali vakcinirane s proteinom gD so zaščitene pred infekcijo. Dobro je proučen protein gE, ker je pri analizi nevirulentnih sevov vedno ugotovljeno, da protein gE tem sevom manjka, zato se sevi, ki nimajo gE proteina, uporabljajo za pripravo delatiranih vakcin, ki omogočajo ločevanje vakciniranih živali od okuženih.

Genom herpesvirusov

Genom predstavlja ena linearna dvojnivijačna molekula DNA, velikosti od 125 do 235 kbp. Genom kodira nad 80 različnih proteinov, tako strukturne kot nestrukturne proteine. Razlike med posameznimi vrstami nastopajo v organizaciji, velikosti in sestavi genoma. Zgrajen je iz dveh enot; segmenta L (angl. *large*) in S (angl. *small*). Na zunanji strani obeh kocev segmentov se nahaja nukleotidno nukleotidnega zaporedja z oznako TR (angl. *terminal repeats*). Stišišča obeh segmentov genoma pa se zaključujeta z regijama IR (angl. *internal repeats*). TR in IR regiji genoma ne kodirata beljakovin in sta vključeni v pomnoževalni cikel virusa. Herpesvirusni genom glede na funkcijo delimo v tri kategorije: regija, ki kodira nestrukturne proteine, regija, ki kodira strukturne proteine, in skupna herpesvirusna regija. Vsak gen začenja s promotorjem (regulatorna regija na začetku gena).



Pomnoževanje herpesvirusov:

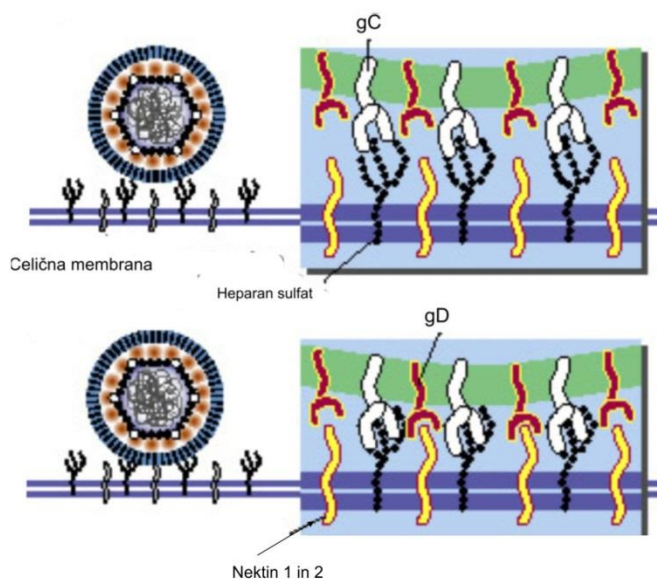
Približno 13 % vseh genov herpesvirusa ima svojega dvojnika v kromosomih gostitelja. V replikacijo herpesvirusov so vključene tri vrste genov:

- takojšnji geni sodelujejo pri ekspresiji proteinov, ki aktivirajo polimerazo RNA in s tem začetek transkripcije zgodnjih in poznih genov.
- Zgodnji geni: odgovorni so za ekspresijo proteinov, ki stimulirajo virusno replikacijo.
- Pozni geni: kodirajo strukturne proteine. Pomnoževanje virusne DNA poteka v jedru celice.

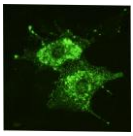
Pri prepisovanju virusne DNA sodelujejo encimi celice. Program prepisovanja poteka v treh ciklih.

Pritrjevanje:

Adsorbcija virusnih partiklov je odvisna od receptorjev na površini celice. Vezava viriona poteka preko ovojničnih glikoproteinov na specifične receptorje gostitelja (večinoma glikozaminoglikani) in koreceptorje, kot so nektini. Virusna proteina gB in gC imata receptorje na celici gostiteljici, to je protein heparan sulfat proteoglikan, ki je vrinjen med dvoslojni fosfolipid celične stene. Pri alfa herpesvirinah kot protireceptorja acetilholinskih molekul nastopata glikoproteina gB in gC. Virusni protein gD je protireceptor celični beljakovini HveA (angl. *heparin entry mediator*) in protein Prr1 (angl. *Pvr-related protein*). Odsotnost heparan sulfata na površini celice ali njegova predhodna zasedba prepreči pomnoževanje virusa v celici. Potek adsorbcije pa je poleg specifičnih receptorjev odvisen tudi od okolja pH in prisotnosti določenih ionov, kot so Ca^{2+} , H^+ , K^+ in Na^+ , kakor zbližanje virusa z dovzeto celico, kar pa je odvisno od koncentracije virusnih partiklov. V replikaciji virusa je do zdaj poznano, da je vpleteno najmanj 9 strukturnih proteinov. Glikoprotein gC se veže na heparan sulfat celice, ta povezava je labilna, dokler ne pride do podporne vezave s proteinoma gB in gD.

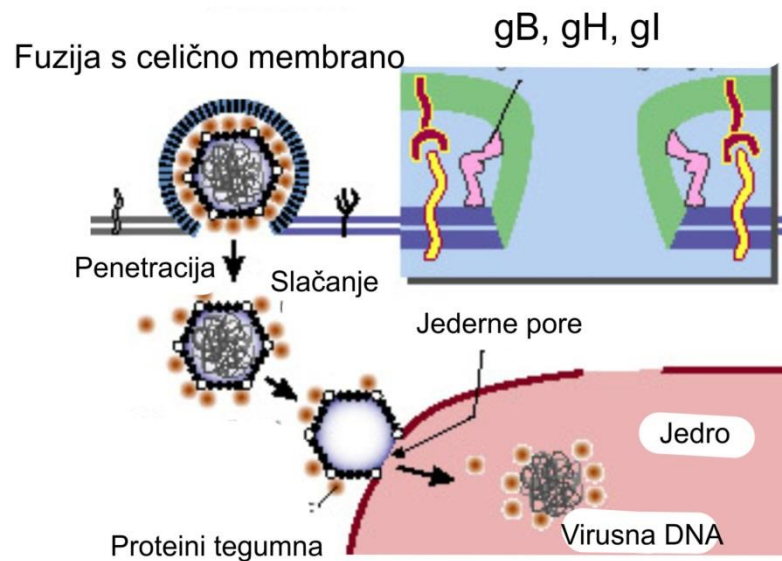


Slika 14: Shema pritrdjevanja herpesvirusov na površino celice.



Vstopanje:

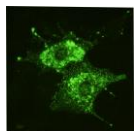
Celična membrana ni prepustna za tako velike partikle, kot so virusi, zato je potreben specifičen transportni mehanizem. Pri vstopanju pride do združenja (fuzije) celične in virusne membrane. Virusni protein gB, gD, gG, gH, ki se nahajajo v plašču virusa, sprožijo zlitje (fuzijo) virusnega plašča s celično citoplazemsko membrano in virusna nukleokapsida vstopi v citoplazmo. Nukleokapsida potuje do jedrnih por preko dineinskih molekul vzdolž celičnih mikrotubulov, kjer poteka slačenje virusa in sprostitve DNA v jedro, kjer preide v krožno obliko. V jedro celice vstopijo tudi proteini tegumna. Herpesvirusi se razmnožujejo v jedru celice, zato je potreben transport virusa do jedrne membrane. Nukleokapsida se osvobodi DNA, le-ta vstopi v jedro skozi jedrne pore celice in se vključi v sintezo proteinov.



Slika 15: Shematski prikaz vstopanja herpesvirusov v celico.

Prepisovanje in sinteza proteinov

Pomnoževanje in prepisovanje genoma pri herpesvirusih poteka v jedru celice, virusni proteini pa se sintetizirajo v citoplazmi celice. Herpesvirusi imajo velik genom, za katerega je značilna posmitotična infekcija celice. Prepisovanje virusne DNA omogoči celična polimeraza DNA. Najprej poteka prepis takojšnjih genov, mRNA potuje v citoplazmo, kjer nastanejo alfa proteini, le-ti se nato vrnejo v jedro, kjer regulirajo prepis zgodnjih genov, nato se sintetizirajo – beta proteini, ki preidejo v jedro celice, kjer regulirajo prepis poznih genov – gama proteini. Novonastali alfa- in beta proteini so encimi ali pa so vezani na DNA, medtem ko gama proteini predstavljajo strukturne komponente virusa. Ekspresija virusnega genoma poteka postopno. Nastanejo tri skupine mRNA, in sicer alfa, beta in gama. Protein VP16, ki se nahaja v tegumnu virusa, nastopa kot aktivator prepisovanja. Virusni protein VHS (angl. *virion-host shutoff protein*), ki se prav tako nahaja v tegumnu, pa zavre sintezo celičnih beljakovin. Alfa mRNA se pretvori v alfa proteine ali takojšnje proteine, nastane 6 različnih proteinov, imenovanih IPC (angl. *infected cell proteins*). Alfa beljakovine nastanejo že od 2 do 4 ure po infekciji. To so regulacijski proteini, ki sprožijo in regulirajo nastajanje beta mRNA. Sledi sinteza beta proteinov. Protein ICP4, ki nastane v prvi fazi pomnoževanja, nastopa kot aktivator prepisovanja betagenov.



Regulacijski proteini preprečijo podvojevanje celične DNA in sintezo celičnih beljakovin, drugi encimi pa sprožijo pomnoževanje virusne nukleinske kisline. Ena tretjina virusnega genoma se prepíše s celičnimi polimerazami. V jedru celice poteka prepisovanje celotnega genoma postopno, tako da nastane do 50 molekul mRNA prepisanih s celično polimerazo RNA II. Celoten herpesvirusni genom tako kodira več kot 100 različnih proteinskih molekul. Te proteine delimo na strukturne proteine, ki so sestavni del virusa, proteine, ki sodelujejo pri vstopanju virusa v celico, proteini, ki prevedejo nukleokapsido do jedra celice, proteini, ki regulirajo ekspresijo genov in proteini, potrebni za pomnoževanje virusne DNA in vstopanje v kapsido.

Nastanejo trije razredi mRNA:

alfa (α) – takojšnje sporočilne RNA	regulacija prepisovanja virusnega genoma
beta (β) – zgodnje mRNA	nestrukturni proteini – regulatorni encimi
gama (γ) – pozne mRNA	strukturni proteini

Izražanje genov se usklajuje na različne načine:

- akumulacija alfa mRNA v jedru celice zaustavi nadaljnje prepisovanje,
- sinteza betaproteinov zaustavi sintezo alfa proteinov in sproži replikacijo genoma,
- nekateri gamaproteini se sintetizirajo šele, ko je pomnoževanje genoma zaustavljeno.

Med beta proteine spadata tudi virusna timidin kinaza in polimeraza DNA, ki se vključita v sintezo virusne DNA. Prepisovanje pozne mRNA poteka po končani replikaciji virusne DNA. Betaproteini sprožijo nadaljnje prepisovanje in nastanek gama mRNA. Gama mRNA se prevede v citoplazmo in se v poliribosomih sintetizirajo pozne ali strukturne beljakovine. Na ta način nastane do 80 različnih proteinov. Gamaproteini pred vstopom v jedro potujejo še skozi Golgijev aparat, kjer prihaja do glikolize, na proteinske molekule se vežejo različni mono- in polisaharidi.

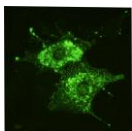
Pomnoževanje virusne DNA

Po vstopu DNA v jedro celice le-ta iz linearne oblike preide v cirkularno obliko, kar sovпада z ekspresijo alfa genov. Do replikacije virusne DNA pride, ko sinteza zgodnjih proteinov že poteka. Replikacijo virusne DNA sprožijo betaproteini. Sinteza novih molekul DNA je katalizirana iz strani celične od DNA polimeraze. Virusni alfa proteini ter proteini ICP 4, ICP 22 in ICP 47 sprožijo odpiranje dvovijačne verige DNA. V naslednji fazi pride do vezave polimeraze in helikaze ter drugih encimov na odprto mesto virusne verige DNA. Polimerazni DNA kompleks celičnega izvora izvede sintezo novih molekul DNA.

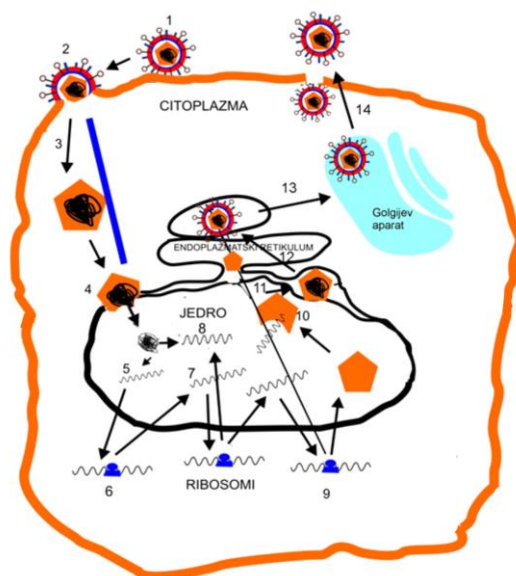
V fazi latence se v okuženem nevronu nahaja 10 in več virusnih genomov, ki so lahko vgrajeni v celično DNA ali se v cirkularni obliki nahajajo izven celičnih kromosomov.

Izgrajevanje

Brstenje nukleokapside poteka skozi spremenjeno notranjo jedrno membrano. Gamaproteini (strukturni proteini), nekateri od teh se nahajajo v kapsidi virusa, se iz endoplazmatskega retikuluma prevedejo v Golgijev aparat in se glikolizirajo ter prevedejo na membrane Golgijevega aparata. Novonastala nukleokapsida zapusti jedro, proteini tegumna in plašč virusa pa se tvori pri izstopanju skozi jedrno membrano celice in membrane Golgijevega aparata. Virusni protein gK sodeluje pri



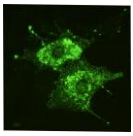
uvajanju nukleinske kisline v kapsido in transportu viriona skozi jedrni ovoj do celične stene. Virus dobi ovojnico ob brstenju skozi membrane endoplazmatskega retikuluma in Golgijevega aparata. Na površino celice potuje v mešičkih. Zgrajeni virioni se akumulirajo znotraj vakuole v citoplazmi in zapustijo celico po principu eksocitoze, ko se stena mešička zlije s celično membrano. Herpesvirusi se lahko širijo iz celice v celico, ne da bi prišlo do izstopanja virusnih partiklov iz celice, prihaja do tvorbe sincicijev – večjedrnih celic. V ta proces so vključeni proteini gE, gI ter gM. V citoplazmi okužene celice tako najdemo kompletne infektivne herpesvire. Virioni se akumulirajo v endoplazmatskem retikulumu in se transportirajo do površine celice, kjer izstopajo z eksocitozo in tudi s citolizo.



Slika 16: Skica prikazuje replikacijski cikel herpesvirusov:

(1) vezava virusa na površino celice, (2) zlitje virusne ovojnice s citoplazmatsko membrano, (3) slačenje, potovanje nukleokapside ob mikrotubulih do jedra, (4) vstop v jedro in sproščanje virusne DNA, (5) prepis takojšnjih genov v mRNA in potovanje mRNA izven jedra, (6) translacija na ribosomih, potovanje alfa proteinov v jedro, (7) sinteza beta mRNA, translacija betaproteinov ter regulacija sinteze virusne DNA ob vključitvi betaproteinov. Betaproteini regulirajo tudi sintezo gama mRNA, sledi sinteza (strukturnih) proteinov gama (9). Kapsidni proteini potujejo v jedro, se kondenzirajo, pred vstopom v endoplazmatski retikulum se v kapsido uvede še virusna DNA. Proteini virusnega plašča se vežejo na Golgijev aparat, kjer se glikolizirajo. V mešičke Golgijevega aparata, bogate z virusnimi proteini, se uvede kapsida (12), ki kot taka z eksocitozo zapusti celico.

Mnogi alfa herpesvirusi povzročajo poškodbe kože in sluznic respiratornega in genitalnega trakta. Značilne so točkovne nekroze v organih in tkivih. Pri gravidnih živalih v fazi viremije pride do transplacentarnega prenosa infekta in posledičnih abortusov. Virusi iz poddružine beta herpesvirusov in gama herpesvirusov pa povzročajo tipične kronične infekcije, nekateri povzročajo tudi tumorje. Skupna značilnost je **latentna** infekcija. Virusna DNA se vgradi v kromosom nevrona, kar predstavlja možnost reaktivacije virusa. V ganglijskih celicah imajo virusi latentni krog razvoja, ki vodi do latentne transkripcije mRNA. V tem primeru prihaja do blokade tvorbe proteina ICP4, ki nastopa kot aktivator prepisovanja ostalih genov. Reaktivacija je povezana s stresom, z vročino, načinom zdravljenja z zdravili, vendar sam potek reaktivacije ni povsem poznan. Virus se širi z



izločanjem: s slino, kašljem, sekreti, spermo, epitelnimi celicami. Skupna značilnost herpesvirusnih okužb je perzistentna okužba, kar pomeni, da je žival lahko nosilka virusa, ne kaže kliničnih znakov bolezni, vendar prihaja do občasne reaktivacije in izločanja virusa. Pogoj za latentno okužbo je zmožnost virusa, da se izogne obrambnim mehanizmom gostitelja, kar nevrotropni alfaherpesvirusi dosežejo z vstopom v nevronske celice oziroma se limfotropni virusi iz poddružine betaherpesvirinae vgradijo v genom limfocitov B. Skupna značilnost herpesvirusnih infekcij so tudi intranuklearne inkluzije, ki jih lahko vidimo v histoloških preparatih tkiva obolenih živali.

Vrsta: Goveji herpesvirus 1 ali virus IBR/IPV (angl. Bovine herpesvirus 1, BoHV-1)

Kratika herpesvirusne infekcije pri govedu IBR/IPV izhaja iz imena bolezni: infekciozni bovini rinotraheitis (IBR) ali infekciozni pustularni vulvovaginitis (IPV). Virus spada v poddružino *Alfaherpesvirinae*, rod *Varicellavirus*. Genom predstavlja dvojnovijačna molekula DNA, zgrajena iz od 135.000 do 140.000 baznih parov, ki kodira 20 strukturnih proteinov. DNA sestavljata dva segmenta genov, dolg (L) segment (104 kbp) in kratek (S) segment (10 kbp). Na daljšem segmentu se nahajajo geni za strukturne proteine, geni za različne encime, kot so timidin kinaza, reduktaze, protein kinaze, DNaze. Na podlagi restrikcijskih analiz virusnega genoma so izolati IBR/IPV razdelili v 5 tipov, na podlagi kliničnih znakov bolezni so BoHV-1 razvrstili v respiratorne, genitalne in encefalične tipe (BoHV-1.1, BoHV 1.2a in BoHV 1.2b). Serološko so si posamezni tipi med seboj tako sorodni, da govorimo le o enem serotipu virusa. Med različnimi izolati je prisotna do 85-odstotna homologija virusnega genoma. Kakšna oblika bolezni se bo razvila, je odvisno tudi od mesta infekcije.

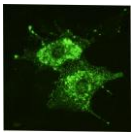
Virus preživi nekaj dni na sobni temperaturi, več tednov pri temperaturi pod +10 °C, zamrznjen pa več let, občutljiv je na visoke temperature, temperatura nad 56 °C ga inaktivira v 20 minutah. Občutljiv je na detergente, formalin in svetlobo UV. Virus IBR/IPV je primarno patogen za govedo. Mmogoča je infekcija tudi drugih vrst živali, kot so kunci, ovce, koze, divji prežvekovalci, neobčutljive na infekcijo pa so miši, podgane in budre. V laboratoriju lahko virus razmnožujemo na različnih celičnih kulturah govejega izvora.

Patogeneza:

Prvi cikel replikacije virusa IBR/IPV poteka v celicah, ki se najprej inficirajo; običajno so to epitelne celice nosne votline, orofaringsa ali genitalnega trakta. Infekt se lahko širi: lokalno, sistemsko v obliki viremije ali po živčevju. Lokalno gre za primer primarne okužbe respiratornega ali genitalnega trakta. Virus se ne raznese po organizmu. Bolezen se sanira običajno znotraj enega do dveh tednov, odvisno od sekundarne infekcije. O viremiji govorimo, ko se virus pojavi v krvi. Transport virusa po krvi poteka z vezavo na monocite ali se adsorbira na limfocite, gre za invazijo bezgavk. BHV 1 se lahko celo razmnožuje v monocitih, kar spremlja povišana telesna temperatura in posledična namnožitev virusa v tarčnih celicah. Posledica vstopa v končice lokalnih živčnih celic je intraaksonski transport, ko virus prispe do ganglijev. Samo BHV-5 je zmožen replikacije v celicah glia, posledica tega je encefalitis. Encefalitis, povzročen z BHV-1, nastane izjemoma, in sicer samo v primeru, ko prebije imunoglobulinsko bariero.

Virulenca:

Kot faktor virulence nastopata glikoproteina D in gC, ki se nahajata v plašču viriona. Glikoprotein gC je odgovoren za vezavo viriona na površino celice, receptor je protein proteoglikan. Ti receptorski proteini so prisotni na mnogih celicah prežvekovalcev. Protein gD je odgovoren za aktivacijo fuzije v interakciji s proteini gB, gH in gL. Mutante virusa BHV brez proteina gC imajo signifikantno znižano možnost infekcije. Glikoprotein gE je odgovoren za medcelični prehod –



fuzijo in tvorbo sincicijev. Virus brez gE se v okuženi celici namnoži, se pa ne širi kontaktno s celice na celico.

Latenca:

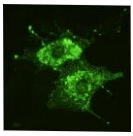
Herpesvirusi lahko pri živalih in ljudeh povzročajo trajno, latentno okužbo. Zato so tekom sobivanja s svojim gostiteljem razvili številne mehanizme, s katerimi se lahko uspešno izogibajo gostiteljevemu imunskemu sistemu. V svojem genomu nosijo zapise za različne beljakovine, imenovane virokini, ki ovirajo delovanje tako prirojenega kot pridobljenega imunskega odziva. Skupna lastnost vseh herpesvirusov je, da povzročajo litično okužbo in da v specifičnih celicah vzpostavijo trajno, prikrito okužbo. Med obdobjem latence se virusna DNA ne pomnožuje. Po delovanju določenih stimulatornih dejavnikov (UV-sevanje, stres, oslabitev imunskega sistema) lahko pride do reaktivacije virusa, nastanka novih virionov in lize okužene celice. Da lahko herpesvirusi trajno okužijo svojega gostitelja, so morali tekom evolucije razviti specifične, učinkovite mehanizme, s katerimi se lahko izognejo njegovemu imunskemu odzivu. Herpesvirusi namreč kodirajo različne imunomodulatorne beljakovine, virokine, s katerimi specifično blokirajo posamezne stopnje gostiteljevega imunskega odziva. Zaporedja nekaterih genov, ki kodirajo virokine, so podobna gostiteljevim zapisom za imunske beljakovine. Obstaja torej možnost, da so zapise za te beljakovine virusi »privzeli« od gostitelja. Vendar glede na to, da se genom herpesvirusov ne vgrajuje v celično DNA tako kot na primer genom retrovirusov, se pojavlja vprašanje, kako so se ti genski zapisi prenesli iz gostiteljeve DNA na virusno DNA. Ena izmed hipotez pravi, da bi do prenosa genov lahko prišlo ob koinfekciji s herpesvirusi in retrovirusi. Po integraciji retrovirusnega genoma v gostiteljevo DNA in po nastanku himernih prepisov celičnih in virusnih genov bi lahko tekom koinfekcije retrovirus vstavil te prepise v genom herpesvirusa.

Obramba organizma

Pri nespecifični celični obrambi sodelujejo polimorfonuklearni nevtrofilni granulociti, makrofagi in naravne celice ubijalke. Te lahko z virusom okuženo celico uničijo direktno s prepoznavanjem pglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (angl. *major histocompatibility complex*, MHC I) ali pa v sodelovanju s protitelesi povzročijo uničenje celice s citotoksičnostjo (angl. *antibody dependent cell cytotoxicity*). Protiimunski mehanizmi herpesvirusov so usmerjeni proti različnim stopnjam prirojenega in pridobljenega imunskega odgovora. Ključno vlogo pri pridobljenem imunskem odzivu igrajo citotoksični limfociti T (celice CD8), medtem ko so pri prirojenem odzivu pomembni interferoni tipa I in naravne celice ubijalke (angl. *natural killer*, NK). Eden ključnih dogodkov v procesu odstranjevanja oziroma uničenja z virusi okuženih celic je prepoznavanje virusnih peptidov v kompleksu z molekulami MHC I s strani celic CD8. Molekule MHC I izraža na svoji površini večina govejih celic. Molekule MHC I zorijo v endoplazmatski retikulum (ER), kjer prihajajo v stik z različnimi celičnimi beljakovinami (tapasin, transporter TAP idr.) ter z virusnimi peptidi. Nastali kompleksi potujejo na površino okužene celice. Prepoznavanju virusnih antigenov sledi aktivacija celic CD8, ki začnejo izločati perforine. Perforini oblikujejo poro v celični membrani in okužena celica počí. Celice CD8 lahko uničijo okužene celice tudi tako, da izzovejo apoptozo. Ker herpesvirusi preprečijo predstavljanje virusnih antigenov celicam CD8, le-te ne morejo prepoznati okuženih celic. V teh primerih se aktivirajo celice NK, ki prepoznajo in uničijo celice, ki na svoji površini ne predstavljajo molekul MHC I.

Pri nespecifični humoralni obrambi ima pomembno vlogo predvsem goveji interferon alfa, ki ga proizvajajo levkociti in naravne celice ubijalke. Pri intranazalni okužbi z BHV-1 se interferon začne pojavljati v nosnem izcedku od 5 do 40 ur po okužbi in se ohrani okoli 8 dni. Zato imajo levkociti na mestu vnetja kot izvor interferona odločujočo vlogo pri hitrem okrevanju.

Za imunski odziv na BHV-1 so odgovorni limfociti B in T ob sodelovanju nespecifične obrambe s polimorfonuklearnimi nevtrofili, makrofagi, naravnimi ubijalkami, interferonom in encimi



komplementa. Pri primarni okužbi, ko organizem pride prvič v stik s povzročiteljem, sprožijo najprej imunski odziv glikoproteini ovojnice virusa, kasneje pa tudi produkti sinteze virusnih proteinov.

Za celični imunski odziv so odgovorni limfociti T. Ko pridejo v stik z antigenom, se aktivirajo in preoblikujejo v limfoblaste, ki se začnejo deliti. Specifični limfociti T se pojavijo okoli 5. dne po okužbi z BHV-1. Njihova vloga je prepoznavanje in uničevanje antigena. To je lahko neposredno s citotoksičnim delovanjem ali posredno z aktivacijo makrofagov in izločanjem imunskega interferona gama in drugih imunomodulatorjev.

Specifična humoralna obramba temelji na tvorbi protiteles. Limfociti B prepoznajo antigen in se začno deliti in pretvarjati v celice plazmatke, ki proizvajajo protitelesa. Del limfocitov B ostane v organizmu tudi po prenehanju izpostavljenosti antigenu kot spominske celice za določen antigen. Nevtralizacijska protitelesa se pojavijo med 7. in 10. dnem po okužbi, najprej IgM, sledijo jim IgG. Povzročijo nevtralizacijo virusa, preprečijo mu pritrjevanje na celico in prehod vanjo. Sodelujejo tudi pri razpadu okuženih celic. Na sluznici spolnih in dihalnih organov se pojavijo tudi IgA.

Protitelesa IgM dosežejo najvišji titer 14 dni po okužbi, nato titer v naslednjih treh mesecih strmo pada. IgG dosežejo vrh 35 dni po okužbi, zmanjševanje titra v posameznih mesecih pa je neznatno. Nivo protiteles ni povezan s stopnjo izraženosti kliničnih znakov in izločanjem virusa. Vpliv pa ima mesto vstopa virusa. Pri okužbi dihal je titer protiteles višji kot pri okužbi spolovil.

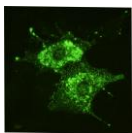
Vloga humoralnih protiteles glede širjenja virusa je omejena, ker se pojavijo pozno po primarni okužbi in ker se BHV-1 lahko izogne njihovi aktivnosti s širjenjem preko intercelularnih mostov in s širjenjem po živcih. Specifična protitelesa so prav tako zaradi specifičnega transportnega mehanizma za prenos IgG in posebno še IgG1 iz krvnega obtoka preko mamarnih barier prisotna v kolostrumu in mleku. Med laktacijo se količina protiteles spreminja, kolostrum jih vsebuje največ, koncentracija se hitro znižuje in 30 dni po porodu mleko vsebuje 25–30 odstotkov manj protiteles kot serum. Kasneje se nivo ne spreminja bistveno do konca laktacije, ko koncentracija ponovno naraste zaradi manjše količine mleka in konstantnega prenosa protiteles iz seruma. Kljub nižji koncentraciji protiteles glede na serum in individualnim razlikam v količini pa je mleko v presejalnih testih še vedno ustrezen nadomestek serumu pri imunoloških preiskavah.

Novorojena teleta dobijo maternalna protitelesa s kolostrumom večinoma v prvih 12 urah, njihova resorpcija preneha v 36 urah. Taka pasivno pridobljena imunost traja od enega do šest mesecev, odvisno od količine kolostruma, učinkovitosti črevesne absorpcije in od titra maternalnih protiteles. Teleta, ki dobijo manj kolostralnih protiteles, lahko začnejo proizvajati lastna protitelesa hitreje, že po šestih tednih.

Diagnostika IBR/IPV – metode za dokazovanje virusa

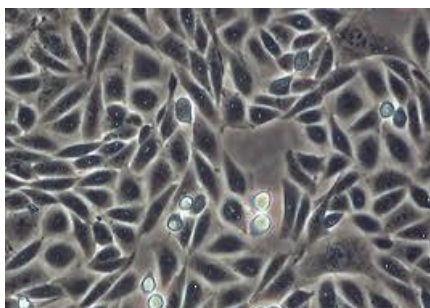
Zaradi naglega nastopa protiteles proti virusu IBR/IPV, običajno jih v krvi lahko ugotovimo že 7. do 10. dan po infekciji, je treba vzorce za laboratorijsko preiskavo odvzeti takoj ob pojavu kliničnih znakov bolezni. Protitelesa, prisotna v telesnih tekočinah, lahko nevtralizirajo virus, zaradi česar lahko dobimo v metodi izolacije virusa na celični kulturi lažno negativen rezultat. Hitrost postavitve dokončne diagnoze je vsekakor odvisna od kvalitete vzorca. Če odvzamemo tekočino pustule z epitelom vred, je mogoče prisotnost virusa dokazati z elektronskim mikroskopom ali imunofluorescenčnim testom. Pri respiratorni obliki je kot vzorec zelo primeren nosni ali laringotrahealni bris. Epitelne celice, pridobljene z brisom, lahko fiksiramo na predmetnico in opravimo direktni imunofluorescenčni test.

Izolacija virusa na celični kulturi

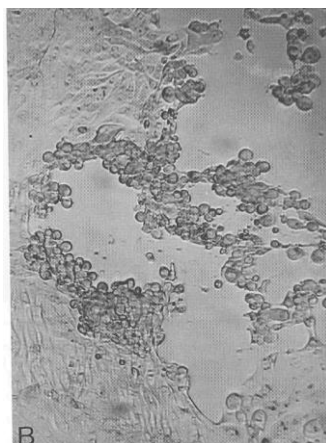


V primeru respiratornih kliničnih znakov odvezamo nosni ali laringotrahealni bris respiratornih poti ali vsebino pustule. Vzorec, ki ga dobimo v laboratoriju, najprej ustrezno obdelamo. Pri akutni infekciji za preiskavo na antigen virusa IBR/IPV odvezamo pri respiratorni obliki vzorec nosnega in laringotrahealnega brisa, če pride do genitalnih sprememb pa bris vagine ali prepucija. V primeru abortusa odvezamo ob sekciji koščke organov, kot so pljuča, bezgavke in koščke posteljice. V laboratorij moramo vzorce transportirati čim hitreje pri temperaturi ca. +4 °C.

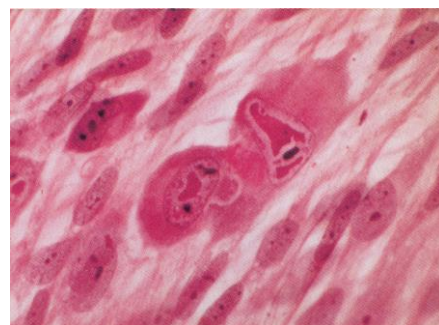
Če imamo vzorec organov abortiranega teleta ali mrtve živali, v laboratoriju pripravimo suspenzijo organov. Suspenzijo centrifugiramo in supernatant filtriramo skozi filtre, ki prepuščajo viruse, zadržijo pa bakterije. Filtrat nato inokuliramo na celično kulturo govejega izvora. Običajno uporabimo goveje turbinalne celice, celice govejih ledvic ali testisov. Če je v vzorcu prisoten herpesvirus, bo v roku od 24 do 48 ur povzročil propadanja celične kulture, kar imenujemo citopatski efekt. Izoliran virus običajno determiniramo z imunofluorescenčnim ali imunoperoksidaznim testom. Če se na celični kulturi ne pojavi citopatski efekt, opravimo po 7-dnevni inkubaciji slepo pasažo vzorca – inokulirano celično kulturo zamrzemo pri –70 °C, otopimo ter supernatant ponovno nasadimo na celični sloj. Temu pravimo, da opravimo slepo pasažo. Standard zahteva, da je treba opraviti dve pasaži, tako v negativnem primeru potrebujemo 3 tedne za postavitev dokončne diagnoze.



Slika 17: Celična kultura linije govejih ledvic AUBEK.



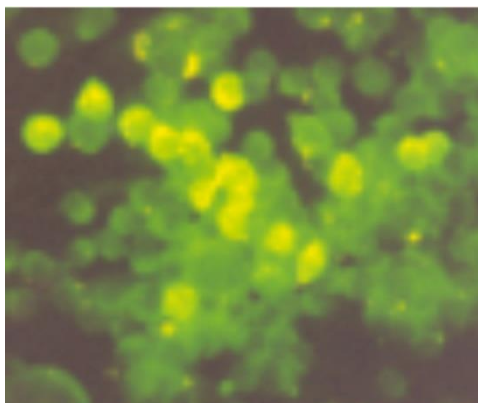
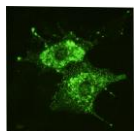
Slika 18: Citopatski efekt (CPE) kot posledica razmnoževanja govejega herpesvirusa na celični kulturi.



Slika 19: Herpesvirus: večjedrne celice z intranuklearnimi inkluzijami (barvano hematoksilin-eozin).

Direktni imunofluorescenčni test (test IF)

Vzorec, ki vsebuje celice (histološka rezina, epitelne celice, pridobljene z brisom, ali celice inficirane celične kulture), najprej z acetonom fiksiramo na predmetno stekelce. Po fiksaciji na vzorec nanese konjugat, to so označena protitelesa proti virusu IBR/IPV. Konjugat je lahko poliklonalen ali monoklonski. Po končani inkubaciji in spiranju nevezanega konjugata, ko v primeru prisotnosti virusa pride do vezave protiteles na antigen, preparat preiščemo pod fluorescentnim mikroskopom. Mesta v celici, kjer se nahajajo virusni partikli, se zaradi specifične vezave konjugata obarvajo zeleno. Specifičnost testa je zelo odvisna od kvalitete konjugata. Poliklonalni konjugati poleg protiteles proti virusu IBR/IPV vsebujejo tudi druga protitelesa, kar lahko daje lažno pozitivne rezultate. Monoklonalni konjugati pa so zelo specifični, vendar se zaradi razlik v antigenski zgradbi med posameznimi izolati lahko dogodi, da preiskovani izolat ne vsebuje specifičnega antigena, na katerega se veže monoklonalno protitelo, zato lahko dobimo lažno negativen rezultat.



Slika 20: Epitelne celice, pridobljene z nosnim brisom – pozitiven rezultat na prisotnost virusa IBR/IPV v testu IF.

V diagnostiki lahko uporabljamo tudi druge metode, kot je elektronsko mikroskopska preiskava vzorca in uporaba različnih molekularnih metod, med temi je še posebej uporabna metoda PCR.

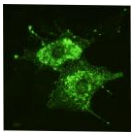
Metoda PCR

Zaradi svoje občutljivosti in hitre izvedbe so zelo uporabne različne molekularne metode, zlasti test PCR. Gen, ki kodira encim timidin kinazo je zelo ohranjen del virusnega genoma in ga zato uporabljamo v diagnostiki tako, da pomnožimo določen odsek tega gena. Gen za protein B pa se običajno uporablja za določanje nukleotidnega zaporedja in s tem za determinacijo izoliranega virusa. Najbolj ohranjen je gen za polimerazo, tako da odseke na tem genu uporabljamo za detekcijo vseh herpesvirusov. Genom herpes virusa obolele živali z metodo PCR lahko dokazujemo daljše obdobje, zlasti v levkocitih, kjer se virus ohranja dalj časa. Zaradi prisotnosti protiteles lahko s klasično tehniko izolacije virusa na celični kulturi dobimo negativen rezultat. Prednost te metode je tudi v tem, ker lahko virusno DNA dokazujemo tudi v vzorcih, v katerih je virus zaradi zunanjih vplivov (temperatura, neprimeren transport, bakterijska kontaminacija) že inaktiviran, ali v vzorcih, v katerih so prisotna tudi specifična protitelesa.

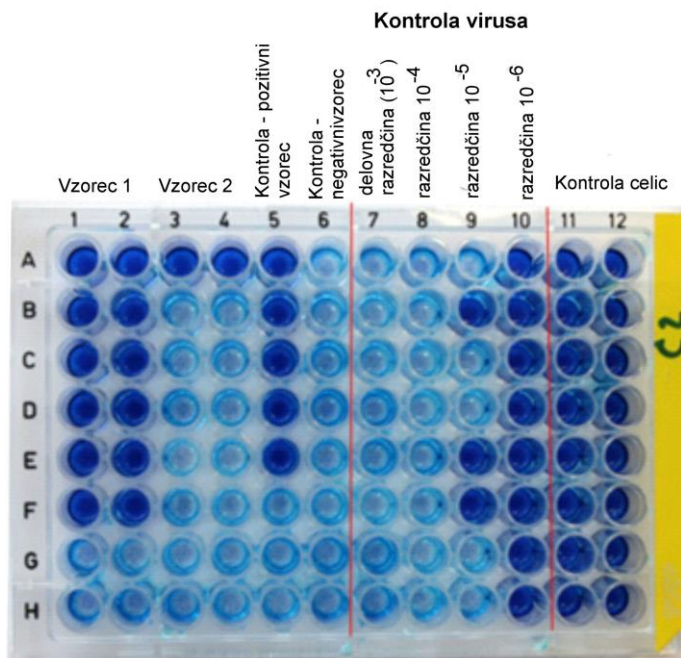
Metode za dokazovanje specifičnih protiteles

V diagnostiki se ob pojavu kliničnih znakov poslužujemo metod dokazovanja virusnega antigena, virusne DNA in porasta titra specifičnih protiteles, zato je treba v laboratorij poleg vzorca za dokaz antigena dostaviti tudi vzorec krvi bolne živali. Akutno okužbo lahko dokažemo tudi posredno, in sicer v primeru, ko v dveh zaporedno odvzetih vzorcih krvi dokažemo rast titra specifičnih protiteles.

Seronevtralizacijski test



Glede na to, da ima herpesvirus citopatogene lastnosti, je za dokaz specifičnih protiteles proti herpesvirusom zelo primeren seroneutralizacijski test. Test izvajamo v mikroploščah. Serumske vzorce pred izvedbo testa inaktiviramo, kar pomeni, da jih 30 minut inkubiramo pri temperaturi 56 °C. Pri tej temperaturi beljakovine ne precipitirajo, inaktivira pa se interlevkin, komplement in drugi encimi, ki lahko vplivajo na rezultat testa. Princip testa: pripravimo dvakratne razredčine preiskovanega seruma in dodamo enako količino poznane virusa (virus IBR/IPV). Mešanico inkubiramo najmanj eno uro pri 37 °C, da pride do vezave protiteles na virus. Po končani inkubaciji pa dodamo še suspenzijo celic. Če so v preiskovanem vzorcu prisotna nevtralizacijska protitelesa proti virusu IBR/IPV, virus na celični kulturi ne povzroči citopatskega efekta, ker ga protitelesa inaktivirajo. V negativnem primeru, ko pa specifičnih protiteles ni, se virus v celicah razmnoži in povzroči citopatski efekt. V test je treba vključiti referenčni pozitivni in negativni serum ter kontrolo virusa in kontrolo celic. Če v testu količina virusa ni v skladu s predpisanim standardom, je treba test ponoviti. Rezultate testa odčitamo pod mikroskopom ali pa mikroploščo obarvamo z metilenskim modrilom. Sloj celic brez CPE se obarva modro, kar pomeni pozitiven rezultat.

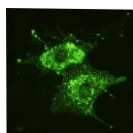


4

Slika 21: Rezultat SN testa. V jamicah, kjer zaradi prisotnosti specifičnih protiteles ni prišlo do CPE, je dno jamic obarvano modro. Vzorec 1: močno pozitiven, vzorec 2: nizko pozitiven

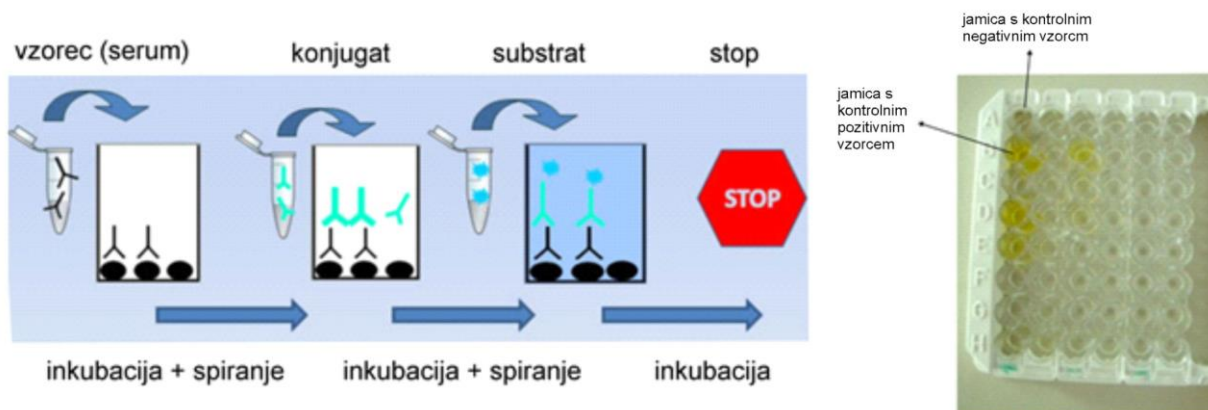
Indirektni encimski imunski testi (test ELISA)

Test zagotavlja hitro, enostavno, občutljivo in specifično dokazovanje protiteles proti virusu IBR/IPV v serumskih vzorcih, vzorcih plazme in mleka krav. Princip testa ELISA za dokazovanje specifičnih protiteles proti IBR/IPV temelji na vezavi poznane antigena, v našem primeru virusa IBR/IPV na površino jamic mikroplošč. Mikroplošče z že vezanim antigenom so tudi komercialno dosegljive. Na mikrotiterske plošče nanesemo razredčen vzorec in kontrole. Če so v vzorcu prisotna protitelesa proti virusu IBR/IPV, se le-ta vežejo z antigenom v jami. Nevezan material speremo in dodamo konjugat z monoklonskimi protitelesi proti imunoglobulinom skupine IgG, ki so označena s peroksidazo. Po končani inkubaciji in spiranju dodamo še substrat, ki se v pozitivnem primeru obarva modro. Po predvidenem reakcijskem času ustavimo reakcijo s stop raztopino, ki spremeni barvo substrata v rumeno. Stopnjo obarvanja odčitamo fotometrično pri valovni dolžini 450 nm.



Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine

Rezultate ovrednotimo glede na odčitano vrednost OD (angl. optical density, OD) vzorca in OD pozitivne ter negativne kontrole. Test izvajamo po navodilih proizvajalca. V test moramo vedno vključiti še poznan pozitivni in poznan negativni serum. Test je mogoče tudi avtomatizirati, kar omogoča večliko število preiskav v relativno kratkem času.



Slika 22: Prikaz principa indirektnega testa ELISA. V jamicah, v katerih je prisoten kompleks: antigen + protitelesa proti virusu IBR + konjugat, se je substrat obarval rumeno, ob odsotnosti protiteles in s tem tudi okužbe se jamica s preiskovanim vzorcem ne obarva.

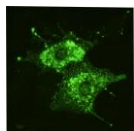
Cepiva in cepljenje proti IBR/IPV

Cepljenje je eden od učinkovitih ukrepov za preprečitev bolezni in omejitev širjenja okužbe. Živa cepiva so običajno pridobljena z večkratnimi pasažami na celičnih kulturah, pripravljena pa so za intramuskularno in intranazalno uporabo in vzpodbudijo močno in dolgotrajno imunost. Slabost živega cepiva je, da se ne razlikuje dosti od naravnega virusa, zato lahko pride do rekombinacije z njim in do ponovnega nastanka virulentne oblike vakcinalnega seva. Pri proizvodnji mrtvega cepiva se virusni sevi razmnožijo na celični kulturi in inaktivirajo s kemičnimi ali fizikalnimi postopki. Za okrepitev imunskega odziva dodajajo cepivu različne adjuvanse. Količina antigena, vrsta kemikalije za inaktivacijo virusa in izbira adjuvansa odločilno vplivajo na kvaliteto vakcine. Živa cepiva so učinkovitejša od mrtvih, ker bolje simulirajo naravno okužbo. Mrtva cepiva pa so varnejša za uporabo, ker se virusi v organizmu ne razmnožujejo. Cepiva preprečijo težke klinične znake, po BHV-1 okužbi zmanjšajo količino virusa, ki se širi po okužbi v čredi. Slabost takih vakcin je, da se protitelesa, ki nastanejo po njeni uporabi, ne morejo ločiti od protiteles, ki nastanejo pri naravni okužbi, kar otežuje ugotavljanje in izkoreninjenje bolezni.

Markirana cepiva

Markirana cepiva (DIVA cepiva – angl. differentiation between infected and vaccinated animals) temeljijo na sevih virusa, ki imajo neko spremembo v prisotnosti ali odsotnosti določenega glikoproteina. Te sprožijo tudi tak imunski odziv, ki se razlikuje od tistega pri naravni okužbi. Negativna markirana cepiva (deletirana cepiva) temeljijo na spoznanju, da nekateri virusni sevi nimajo določenega gena za določen strukturni protein. Določen izostanek pa lahko povzroči tudi znatne spremembe pri virusni virulenci.

Pri izdelavi markiranih, tako imenovanih deletiranih vakcin, uporabljajo seve brez enega ali več strukturnih proteinov, ki niso nujni za pomnoževanje virusa, so pa imunogeni. Ker pri njihovi uporabi ne pride do tvorbe protiteles, proti tistim strukturnim proteinom, ki jih vakcinalni sev virusa



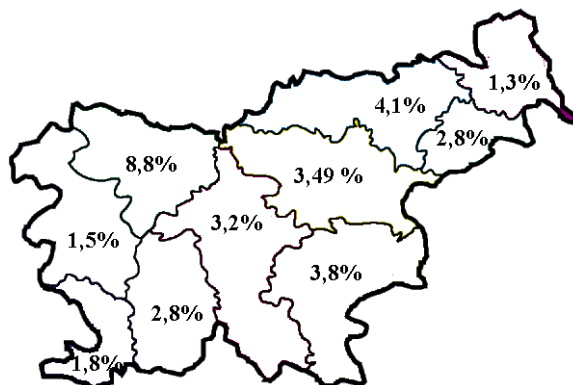
nima, je tako dana osnova za razlikovanje vakcinalnih in naravnih sevov. Odkrivanje naravno okuženih živali za razliko od živali po vakcinaciji z markirano vakcino se izvaja s testom ELISA, pri katerem uporabimo monoklonalna protitelesa proti manjkajočemu proteinu. Pri deletiranih vakcinah IBR/IPV ni proteina gE, zato pri takih živalih v testu ELISA, v katerem so uporabljena monoklonalna protitelesa proti proteinu gE, dobimo negativen rezultat, v primeru okužbe pa je rezultat pozitiven, ker divji virus vsebuje tudi protein gE.

Markirane vakcine v povezavi z ustreznimi serološkimi testi predstavljajo orodje za izvajanje programov za izkoreninjenje bolezni. Poleg tega se v vakciniranih čredah lahko nadzoruje seroepidemiologija naravnih infekcij in učinkovitost vakcin.

Razvili so deletirane vakcine brez proteina gD ali timidin kinaze ali proteina gE. V praktični uporabi so najpogostejše deletirane vakcine, pri katerih se ne izraža gen za proizvodnjo glikoproteina gE. Kot pri klasičnih so na voljo inaktivirane in mrtve deletirane vakcine.

Okužba z virusom IBR/IPV v Sloveniji

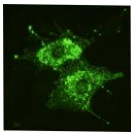
V Sloveniji so mehurčasti izpuščaj (IBR/IPV) laboratorijsko prvič diagnosticirali leta 1967. Leta 1977 so virus izolirali iz uvoženega semena. Od leta 1975 so vsi biki v osemenjevalnih središčih pod vsakoletno serološko kontrolo in so prosti okužbe z virusom IBR/IPV. Leta 2006 so opravili obsežen monitoring v okviru katerega so testirali vzorce goveda starejšega od 12 mesecev. Najnižji odstotek prekuženosti so ugotovili v Prekmurju, najvišjega pa na Gorenjskem, kar je zagotovo povezano s pašno-košnim načinom reje živali in s tem večjo migracijo. Države, ki nimajo statusa proste IBR/IPV, ne morejo prosto trgovati z državami, ki ta status imajo, zato se načrtuje program izkoreninjenja te bolezni. V mnogih državah Evropske unije so bolezen že izkoreninili. V večini primerov uporabljajo kombinacijo cepljenja in postopnega izločanja okuženih živali.



Slika 23: Prikaz odstotka rej, okuženih z virusom IBR/IPV v Sloveniji v letu 2006. V preiskavo je bila vključena vsa goveja živina, starejša od 12 mesecev.

Vrsta: Goveji herpesvirus 5 (angl. Bovine herpesvirus-5, BoHV-5)

BHV-5 je prav tako uvrščen v rod *Varicellavirus*. Njegova razširjenost je omejena na Južno Ameriko, predvsem Argentino in Brazilijo. Povzroča encefalitise, zlasti pri teletih. Infekcija je običajno nazalna. Virus se širi po maksilarnem, mandibularnem in trigeminalnem živčevju do centralnega živčnega sistema. Odrasle živali so le nosilke virusa in ne zbole vajo, občutljiva so teleta. Virus je antigensko zelo podoben virusu IBR/IPV. Genom BoHV-5 je daljši za 2 kbp od virusa IBR/IPV. V aminokislinskem zaporedju genoma izražata 82-odstotno sorodnost. Virus se najprej namnoži v celicah respiratornega trakta, nato po živčevju



Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine

potuje do centralnega živčnega sistema in povzroča okvare na različnih mestih, tudi v možganih. Zaradi sorodnosti BoHV-1 in BoHV-5 tudi cepiva proti BoHV-1 zaščitijo živali pred okužbo z BoHV-5.

Vrsta: Goveji herpesvirus 2 (angl. *Bovine herpesvirus 2*, BoHV-2)

Goveji herpesvirus 2 je uvrščen v rod *Simplexvirus*. Goveji mamilitis povzroča herpesvirus 2. Ta je bil najprej izoliran pri govedu v Južni Afriki. Bolezen se kaže v spremembah na koži, zlasti na seskih, podobnimi poxvirusnimi infekcijami (izpuščaji in kraste), opazni so mehurčasti izpuščaji. Goveji herpes virus 2 je antigensko zelo soroden humanemu herpes simplex virusu. Zaradi klinične podobnosti bolezni s slinavko in parkljevko je pomemben v okviru diferencialne diagnostike. Virus dokažemo z elektronsko mikroskopijo ali izolacijo virusa na celični kulturi. Za vzorec uporabimo vezikule. Bolezen se pojavlja zlasti v Afriki, prenašalci virusa so insekti, rezervoar so bufalo govedo in žirafe.

Virus se antigensko razlikuje od ostalih herpesvirusov in ne daje navzkrižne nevtralizacije na primer s govejim herpesvirusom 1. Genom herpesvirusa 2 se od ostalih razlikuje v zaporedju aminokislin kakor tudi v dolžini segmentov L in S. Diagnostika temelji na izolaciji virusa na celični kulturi in nevtralizaciji izolata z anti-BoHV2 serumom.

Vrsta: Goveji herpesvirus 4 (angl. *Bovine herpesvirus 4*)

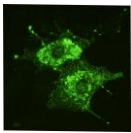
Za goveji herpesvirus 4 je značilno, da se razmnožuje v levkocitih. Najdemo ga lahko v makrofagih vranice tako v akutni kot latentni fazi bolezni. Uvrščen je v poddružino *Betaherpesvirinae*. Soroden je humanemu cytomegalovirusu. Povzroča pa respiratorna, reproduktivna obolenja v milejši obliki kot BoHV-1. Patogen je tudi za kunce. Antigensko je zelo soroden z virusom IBR/IPV. Virus je mogoče množiti na različnih celicah govejega izvora. Profil DNA, dobljen z restrikcijskimi analizami, se povsem razlikuje od ostalih herpesvirusov.

Vrste: Virus korice gangrenoze (angl. *Alcelaphine herpesvirus 1*, *Ovine herpesvirus-2* in *Caprine herpes virus-2*)

Alcelaphine herpesvirus, ovine herpesvirus 2 in caprine herpes virus 2 povzročajo obolenje **korico gangrenozo** (angl. *malignant chatarrhal fever*). Gre za kužno obolenje, za katero je značilna visoka telesna temperatura, pride do slepote zaradi poškodbe roženice, pojavijo se erozije po sluznicah ust in smrčka. Dovzetno je govedo, za bizone je bolezen smrtna, rezervoar virusa pa predstavljajo ovce in koze. *Alcelaphine herpesvirus* spada v rod *Macavirus*, poddružina *Gammaherpesvirinae*, za katere je značilen limfatropizem. Herpesvirus ovc je pogost spremljevalec ovac, okužba običajno poteka subklinično. Ista vrsta virusa je patogena za govedo, predvsem za bizone, saj velik odstotek obolelih bizonov po okužbi umre. Korica gangrenoza se občasno pojavlja tudi v Sloveniji, zlasti v primerih, ko je goveja živina v kohabitaciji z ovci ali kozami.

Kozji herpesvirus je antigensko soroden govejemu herpesvirusu 1. Povzroča konjunktivitise, respiratorna obolenja, obolenja genitalnega trakta in abortuse. Virus pri govedu in ovcih ne povzroča bolezni.

Ovčji in kozji herpesvirus (*ovine herpesvirus 2*, OHV-2 in *caprine herpesvirus 2*, CHV-2), ki sta razširjeni znotraj populacije drobnice, vendar pri drobnici ne povzročata hujših oblik obolenja, sta pa



Slika 24: Značilne spremembe pri korici gangrenozni: Kornealne spremembe pri bolnem govedu (A) in erozije po sluznicah in smrčku, ki spominjajo na Slinavko in parkljevko (B) (povzeto s strani FAO: <http://www.smallstock.info/reference/FAO/003/>. Datum 25. 4. 2012)

patogena za govedo. Okužba bizonov s tem virusom je smrtna, saj povzroča *korico gangrenozo*. Obe vrsti spadata v poddružino *Gammaherpesvirinae*, rod: *Macavirus*.

Herpesvirusi prašičev

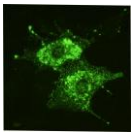
Vrsta: Virus bolezni Aujeszkaga (angl. *Suid herpesvirus 1*, *Pseudorabies*)

Prašičji herpesvirus 1 povzroča tako imenovano Aujeszkijevo bolezen (ime je dobila po priimku madžarskega virologa). Spada v rod *Varicellovirus*. Prašičji herpesvirus 1 (PHV-1) je antigensko soroden z drugimi herpesvirusi, tako da goveja protitelesa proti IBR/IPV nevtralizirajo virus Aujeszkijeve bolezni. Virus je termolabilen. Pri temperaturi 80 °C se virus inaktivira v 3 minutah, zelo je stabilen pri temperaturah pod 10 °C.

Primarni gostitelj virusa so prašiči, občasno pa se virus pojavlja tudi pri konjih, govedu, psih, mačkah, ovcah, kozah in glodavcih. Okužbo najpogosteje beležimo pri psih, ki se običajno okužijo z uživanjem surovega mesa okuženih prašičev. Aujeszkijeva bolezen je razširjena v mnogih državah sveta in povzroča milijonske ekonomske škode. Če gre za infekcijo prašičev, ki se še niso srečali z virusom, povzroči v reji do 50 % abortusov. V primeru okužbe pujskov od mater brez specifičnih zaščitnih protiteles zasledimo do 100-odstotni pogin. Pozneje, ko se reja prekuži, pa maternalna protitelesa zaščitijo mladiče pred boleznijo. Inkubacijska doba je od 2 do 4 dni. Pri pujskih se virus preko okužbe nevronov širi do možganov in povzroči encefalitise.

Virus se primarno razmnožuje v epitelnih celicah respiratornih poti in v pljučih, od koder se širi po limfatičnih poteh v ostale organe, po živčevju pa do centralnega živčnega sistema. Primarno se bolezen kaže v respiratorni, reproduktivni in živčni obliki. Znaki bolezni so: visoka telesna temperatura, kašelj in pogin. Obolela žival izloča virus s slino, aerosolom, nosnimi izcedki, ne pa tudi z urinom in fecesom. Prenašalci so lahko tudi podgane, psi, mačke. Pujski izgubijo maternalno zaščito znotraj 3 mesecev. Ekonomske izgube zaradi infekcije lahko zmanjšamo s preventivno vakcinacijo. Bolezen se klinično kaže tudi pri psih s podobnimi kliničnimi znaki kot pri steklini, s paralizo spodnje čeljusti, srbečico in slinjenjem, od tod tudi ime psevdorabies. Pri govedu pa se bolezen kaže v obliki srbečice.

Infekcija poteka običajno intranazalno. Po primarni okužbi se virus navadno razmnoži na sluznici faringisa in faringealnih bezgavk. Virus se širi do perifernih živčnih ganglijev v centralni živčni sistem in povzroči ganglionevritis.



Laboratorijska diagnostika:

S serološkimi metodami, kot so seroneutralizacijski test ali test ELISA, dokazujemo v serumskih vzorcih prisotnost specifičnih protiteles proti virusu Aujeszzkijeve bolezni. Te metode pridejo v poštev pri kontroli bolezni, ugotavljanju razširjenosti bolezni in v fazi izkoreninjanja bolezni. Serološko pozitivna žival v primeru herpesvirusnih infekcij pomeni hkrati tudi, da gre za okuženo žival in potencialno izločevalko virusa. Prisotnost virusa ali virusne nukleinske kisline je mogoče uspešno dokazati le v fazi viremije in še nekaj tednov po okužbi, sicer pa se v latentni fazi virus nahaja le v ganglijih. Zaradi majhne količine virusa v tej fazi bolezni je uporaba neposrednih metod, kot je izolacija virusa na celični kulturi omejena. Primeren vzorec so tonzile, mandibularne bezgavke in levkociti. Zelo primerna diagnostična metoda je metoda PCR. Za dokaz virusne nukleinske kisline se pomnožuje ohranjena regija na genu za protein gD.

V mnogih državah EU bolezen izkoreninajo. Okužba pa je prisotna v populaciji divjih prašičev, kar so ugotovili z dokazom protiteles proti virusu te bolezni. Populacija domačih prašičev v Sloveniji je prosta Aujeszzkijeve bolezni, zato imamo od leta 2008 dalje status države proste te bolezni. V mnogih državah so se odločili za izkoreninjenje bolezni. Uporabili so sistem cepljenja živali v okuženih rejah. Na voljo so deletirana cepiva, pri katerih manjka protein gE, kar omogoča razlikovanje med protitelesi, ki so posledica cepljenja in posledica okužbe.

Herpesvirusi kopitarjev

Vrsta: Virus konjskega rinopnevmonitisa (angl. *Equid herpesvirus 1 in 4, EHV-1 in EHV-4*)

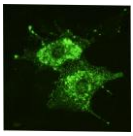
Uvrščena sta v poddružino *Alfaherpesvirinae*, rod *Varicellavirus*. Konjski herpesvirus 1 in 4 kažeta visoko stopnjo navzkrižne sorodnosti. Herpesvirus kopitarjev 4 povzroča respiratorna obolenja. Bolj patogeni sevi se razmnožujejo tudi v krvnih žilah pljuč in povzročajo tromboze ter posledične pljučnice.

Konjski herpesvirus 1 prvenstveno povzroča abortuse, kaže se tudi v respiratorni obliki. Do viremije prihaja, ko se virus naseli v limfocite T in monocite ter se raznese po vsem telesu. Posledica namnožitve virusa v endotelu placente je tromboza in zato tudi abortusi. Ti običajno nastopijo po 6. mesecu brejosti. Pogosto je posledica infekcije tudi mrtvorojeno žrebe. Spremembe v obliki nekroz najdemo na respiratornih organih in jetrih fetusa. Pri infekciji neimunih čred zasledimo do 70-odstotno abortivnost, v prekuženi čredi so abortusi sporadični. Posamezne vrste virusa lahko med seboj razlikujemo z restrikcijskimi analizami virusnega genoma. Serološko dajejo navzkrižno zaščito. Opisanih je veliko različnih variant virusa, ki se razlikujejo zlasti v glikoproteinu G. Virus lahko gojimo v celicah konjskega izvora, citopatski efekt pa povzroča tudi na celicah kunčjih ledvic. Izgube lahko zmanjšamo s preventivno vakcinacijo. V praksi lahko konje preventivno cepimo proti okužbi, vendar cepiva ne dajejo popolne zaščite, zmanjšujejo pa klinično obolevnost živali.

Laboratorijska diagnostika: Virus je mogoče množiti na celičnih kulturah konjskega izvora. Primerni vzorci za dokaz virusa so nosni brisi, levkociti ali organi abortiranega plodu (pljuča, timus, vranica). Mogoča je imunohistološka diagnostika. Občutljivejša je metoda PCR. Pomnožujejo gene za glikoproteine virusnega plašča. Z dokazom protiteles proti virusu EHV-1 v testu SN ravno tako posredno dokažemo okužbo. Test SN se uporablja tudi v kontroli uspešnosti cepljenja.

Vrsti: Konjski herpesvirus 2 in 5 (angl. *Equid herpesvirus 2 and 5*)

Virus spada v poddružino *Gammaherpesvirinae*, rod *Percavirus*. Bolezen se kaže v akutni obliki respiratornega sindroma. Najbolj dovzetna so žrebeta do dveh let starosti. Obolenje se kaže v kašlju,



plevropnevmoniji, anoreksiji in bronhopnevmoniji. Virus ima afiniteto do limfocitov B. Nosilci virusa so starejše živali, pri teh prihaja občasno do reaktivacije.

Vrsta: Virus koitalnega izpuščaja kobil/EHV-3 (angl. *Exantema vesiculosum coitale equi*)

Virus povzroča mehurčaste izpuščaje na zunanjih spolovilih žrebcev in kobil. Če je sluznica vulve ali prepucija pigmentirana, prihaja do depigmentacije na mestih, kjer se je nahajala vezikula. Razmnožuje se v epitelnih celicah sluznice spolovil. Kot pri ostalih herpesvirusnih infekcijah se tudi tu pojavlja latentna faza bolezni, ter posledičen občasen pojav reinfekcije. Virus se prenaša s spolnim kontaktom in pasivno preko mrčesa. Živali so pred ponovno okužbo imune le nekaj mesecev. Ustreznega cepiva ni na voljo.

Vrsta: Herpesvirus psov (angl. *Canine herpesvirus 1*)

Pasji herpesvirus (vrsta: *Canid herpesvirus 1*) spada v rod *Varicellavirus*. Razširjen je po vsem svetu, vendar se zdravstveni problemi zaradi te okužbe pojavljajo le v večjih vzrejah psov. Poznan je samo en serotip. Virus lahko izoliramo iz respiratornega trakta obolelih živali. Najbolj so dovzetni mladi psički nekaj dni po rojstvu, virus povzroča generilizirane nekroze in hemoragije. Inkubacija pri mladih psičkih traja le od 2 do 5 dni, zbolijo in v visokem odstotku poginejo v roku 1–2 dni. Psički so zelo občutljivi na dotik in pritisk na trebuh, pojavi se anoreksija in dispnea. Pogosta je tudi genitalna oblika okužbe, ki ima za posledico abortuse in slabo koncepcijo. Pri odraslih psih je herpesvirus povzročitelj respiratornih obolenj in je prisoten pri respiratornem sindromu psov.

Virus se razmnožuje v celicah stene krvnih žil, v fazi viremije se nahaja v levkocitih. Razmnožujemo ga v celicah pasjega izvora. Izolacija na celični kulturi je mogoča znotraj 3 tednov po okužbi, pozneje prihaja do blokade virusa zaradi prisotnosti protiteles.

Herpesvirusi mačk

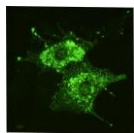
Vrsta: Herpesvirus mačk (angl. *Felid herpesvirus 1*)

Bolezen se kaže v obliki rinotraheitisa in bronhopnevmonije. Prizadete so zlasti gornje dihalne poti in sluznice očes.

Herpesvirusi perutnine

Vrsta: Virus aviarnega infekcijskega laringotraheitisa (angl. *Gallid herpesvirus 1*)

Bolezen povzroča vrsta *Gallid herpesvirus 1*, rod *Iltovirus* znotraj poddružine *Alphaherpesvirinae* in poteka v obliki laringotraheitisa, oteženega dihanja, neješčnosti, prisoten je očesni izcedek in depresija. Obolevnost je do 100-odstotna, smrtnost pa od 50 do 70-odstotna. Posledično prihaja do nekroz in ulceracij sluznic. Virus lahko razmnožujemo v celičnih kulturah perutnine ali embrioniranih kokošjih jajcih z inokulacijo vzorca na horioalantoisno membrano. S testom ELISA pa lahko dokazujemo specifična protitelesa.

**Vrsta: Virus Marekove bolezni (angl. *Gallid herpesvirus 2*),**

Uvrščen je v rod *Mardivirus*: Bolezen je poimenovana po Jozefu Mareku, ki jo je leta 1907 prvi opisal. Poznamo onkogene in neonkogene seve virusa marekove bolezni (MB). Živali se okužujejo z inhalacijo, se pomnoži v epitelnih celicah respiratornega trakta, ter se preko makrofagov prenese v limfoidne organe, kot so timus, kloakalna burza, kostni mozeg in vranico. Virus se razmnožuje v limfocitih T in povzroča njihovo transformacijo in proliferacijo ter tvorbo velikih limfoidnih tumorjev. Mnoge kokoši so nosilke virusa, ne da bi kazale kliničnih znamenj bolezni. Virusni genom se v celoti vgradi v piščanji kromosom. Bolezen se kaže v neolinfomatozi s paralizo obeh nog in kril. Neusklajena hoja in ataksija so prvi klinični znaki bolezni. V diagnostiki uporabljamo tehniko izolacije virusa na embrioniranih jajcih. Virus dokažemo s testom IF, elektronskim mikroskopom, ali uporabljamo test ELISA za dokaz specifičnih protiteles. Z metodo PCR in določanjem nukleotidnega zaporedja pomnoženega odseka genoma lahko tudi razlikujemo cepni virus od divjega seva. Kontrola bolezni: parenteralna vakcinacija dan starih piščancev ter reja po principu all-in-all-out. Bolezen poteka v več oblikah: akutna, limfomatozna, okularna in kožna oblika.

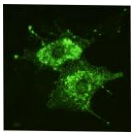
Akutna oblika se kaže v masovnem pojavu bolnih živali, z ataksijami, paralizo in depresijo z visokim odstotkom poginov. Limfomatozna oblika: paraliza nog in perutnic. Okularna: slepota. Kožna: noduli ob korenu perja do premera 1 cm. Bolezen lahko preprečimo s cepljenjem enodnevnih piščancev, s tem preprečimo nastanek paralize, limfomatoze in pojava ostalih kliničnih znakov bolezni, ne pa tudi izločanja virusa. Bolezen je prisotna tudi v Sloveniji, zato se v intenzivni proizvodnji perutnine izvaja preventivno cepljenje.

Herpesvirusi rib**Vrste: Salmonid herpesvirus 1 in Cyprinid herpesvirus.**

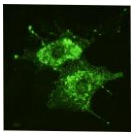
Za herpesvirusne okužbe so pri salmonoidnih vrstah rib dovzetne zlasti mladice. V Sloveniji še ni bila ugotovljena, prisotne pa so herpesvirusne okužbe pri krapovskih vrstah. Cyprinid herpesvirus 3 povzroča koi-herpesvirusne infekcije pri krapih. V Evropo so ga zanesli z uvozom eksotičnih vrst rib. Uvrščen je v novo družino *Alloherpesviridae*. Pri krapih so poznane tri vrste: *Cyprinid herpesvirus 1*, *2* in *3*. Obolenje se klinično kaže zlasti v poletnih mesecih, ko temperatura vode preseže 20 °C. Tudi za to obolenje so značilne latentne infekcije. Virus dokazujemo v vzorcu škrge, ledvic, jeter in v možganih. Najzanesljivejša je metoda PCR, ki temelji na pomnoževanju gena za timidin kinazo. Z določanjem nukleotidnega zaporedja pa lahko CyHV3 ločimo od CyHV1 in CyHV2. Bolezen je od leta 2008 dalje razširjena tudi v Sloveniji. Vnesla pa se je z uvozom akvarijskih vrst rib.

Dodatni študijski viri:

- Ackermann M, Engels M. Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol* 2006; 113: 293–302.
- Grom J, Hostnik P, Toplak I, Barlič-Maganja D. Molecular detection of BHV-1 in the artificially inoculated semen and in the semen of latently infected bull treated with dexamethasone. *Vet J* 2006; 171(3): 539–44.
- Hostnik, P., Toplak, I., Zemljčič, B., Grom, J. *Izkoreninjenje IBR*. Slovenian veterinary research = Slovenski veterinarski zbornik (2011), Vol. 48, suppl. 13



- Thiry J, Keuser V, Muylkens B, et al. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. Vet Res 2006; 37: 169–90..
- Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. Vet Res 2007; 38(2):181–209.
- Cann JA. Principles of molecular virology. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2012.
- Thiry, J., Keuser, V., Muylkens, B., Meurens, F., Gogev, S., Vanderplasschen, A., Thiry, E. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1, Vet. Res. 37 (2006) 169–190.



5

ASFAVIRIDAE

V družino *Asfaviridae* je uvrščen le en rod, *Asfavirus*, v katerega spada virus afriške prašičje kuge (angl. *African swine fever*). V preteklosti je bil ta virus zaradi morfološke podobnosti uvrščen v družino *Iridoviridae*. Asfaviruse so na podlagi genotipizacije razdelili v 5 skupin. Ameriški in evropski izolati spadajo v enako skupino, medtem ko so afriški sevi bolj variabilni. V Evropi se je do zdaj pojavljal le genotip I (v Italiji in Španiji) in genotip II (v Gruziji, leta 2007). Kot vektor in rezervoar virusa nastopajo klopi iz rodu *Ornithodoros spp.*

Razvrščanje različnih sevov temelji tudi na raznolikosti virulence. Asfavirusi so edini virusi DNA, ki jih prenašajo artropodi. Poznanih je 22 različnih genotipov virusa ASF.

Afriška prašičja kuga je ena od ekonomsko najpomembnejših bolezní in se občasno pojavlja tudi v Evropi. Rezervoar virusa so avtohtone pasme prašičev v Afriki in klopi, evropske vrste pa so na okužbo izredno občutljive. Virus povzroči do 100-odstotni pogin prašičev. V Evropi se je bolezen najprej pojavila leta 1957 na Portugalskem, v letu 2007 pa so jo s transportom zanesli v Gruzijo, od koder se je razširila po mnogih državah vzhodno od meja EU.

Vrsta: Virus afriške prašičje kuge, APK (angl. *African swine fever virus*)

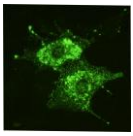
Bolezen poimenovana Afriška prašičja kuga so v 20. letih 20. stoletja najprej ugotovili v Keniji, ko so evropske vrste prašičev poginjale v 100-odstotnem deležu. V Evropi se je leta 1957 najprej pojavila na Portugalskem. Pozneje je do izbruhov bolezní prišlo tudi v nekaterih drugih evropskih državah, kot so Italija (1967), Malta (1978), Francija, Belgija, Nizozemska, vendar so jo razen v Sardiniji povsod izkoreninili. Leta 2007 je bil virus vnesen v Gruzijo, od koder se je razširil v države vzhodne Evrope vse do meja EU. Ker se je bolezen razširila tudi med populacijo divjih prašičev, je izkoreninjanje izredno težavno. Cepivo proti temu virusu ne obstaja, je bolezen mogoče zatirati le z uničevanjem bolnih in ogroženih živali. Za avtohtone divje prašiče (*Potamochoerus larvatus*) v Afriki je značilno, da obolevajo le z blagimi kliničnimi znaki ali pa poteka obolenje subklinično.

Obstojnost

Virus je obstojen pri nizkih temperaturah; temperatura 60 °C ga inaktivira v 20 minutah. Občutljiv je na pH < 3,9 ali > 11,5, prisotnost seruma pa mu preživetje podaljša. Razkužila, kot so 0,8-odstotna NaOH, ga inaktivirajo v 30 minutah, 0,3-odstotni formalin kot tudi 2,3-odstotni hipoklorid pa v 30 minutah. Na sobni temperaturi v serumu je obstojen do 18 mesecev, en mesec pri 37 °C, pa do 6 let pri +5 °C. V suhomesnatih izdelkih je obstojen do 1 leta, v fecesu najmanj 3 mesece. Pri nizkih temperaturah pod zmrziščem ne propade.

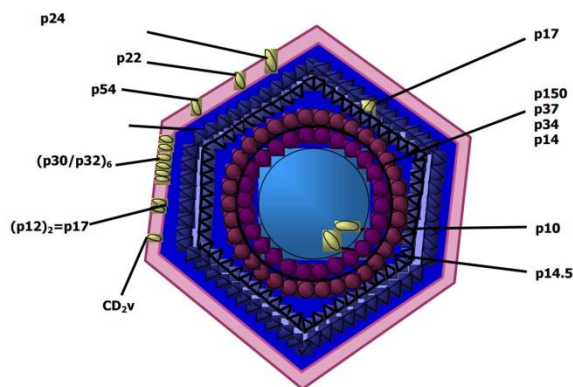
Zgradba virusa APK

Virusni partikli imajo več slojno ovojnico. V sredici se nahaja nukleokapsida z genomom premera 80 nm, ki je zgrajena iz 13 heksagonalnih kapsomer. Sledi lipidni sloj, nato pa sloj proteinov, ki formirajo ikozaedralno kapsido, premera od 150 do 180 nm. Zunanji lipoproteinski ovoj virus pridobi pri izstopanju iz celice. Virus vsebuje poleg genoma tudi encime in proteine, potrebne za vstop v celico in zgodnjo ekspresijo genov. Virus je zgrajen iz najmanj 54 strukturnih proteinov. V virusni plašč so vgrajeni proteini p22, p54, p24 in še nekateri drugi proteini, ki jih virus pridobi ob izstopanju iz celice. Pomemben je zlasti protein z oznako CDV2, ki ima hemaglutinacijske lastnosti. Notranja lupina kapside je zgrajena iz proteinov p150, p37, p34, p14 in p10, preostali del kapside pa

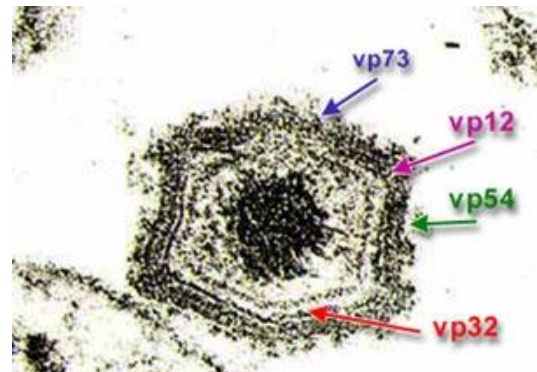


Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine

iz p72 in p17. Virion vsebuje tudi številne encime, potrebne za replikacijo, kot so od DNA odvisna polimeraza RNA, kinaze, nukleotid fosfohidrolaze, fosfataze in deoksiribonukleaze. Okužba z virusom ASF ne sproži tvorbe nevtralizacijskih protiteles, zato tudi izolatov ne moremo razvrščati v različne serotipe. Na podlagi razlik v nukleotidnem zaporedju gena za protein p72 so izolate razvrstili v 22 različnih genotipov. Pomembni so proteini p72, p54 in p12, ki so vključeni v vezavo virusa na celico, so imunogeni in zato zelo uporabni v diagnostične namene.



Slika 25: Shematski prikaz virusa afriške prašičje kuge.



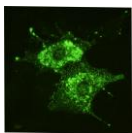
Slika 26: Elektronski mikroskopski posnetek virusa afriške prašičje kuge. Lega posameznih imunogenih proteinov je označena s puščico. (Poveto po http://www.pig333.com/what_the_expert_s_say/asf-a-brief-overview-of-the-past-present-and-future_5315/)

Genom asfavirusov

Genom predstavlja linearna dvojnovijačna molekula DNA, bogata z bazama T in A. Genom razdelimo na tri regije. Najbolj ohranjena je centralna regija, terminalni pa sta zelo variabilni. Genom kodira nad 150 proteinov, od tega jih je 54 strukturnih. Veriga DNA začenja z zanko 37 nukleotidov, temu sledi regija IRES. Velikost genoma je med 170 in 190 kbp in ga gradi 175 bralnih okvirjev (ORF). Genotipizacija je bila opravljena na variabilnih genih za kapsidni protein in genu za protein p72. Za virus afriške prašičje kuge je značilna velika divergenca. Na osnovi razlik v nukleotidnem zaporedju so izolate razdelili v 6 genetskih skupin. Izolat iz Gruzije je soroden izolatom iz Mozambika in Zambije.

Pomnoževanje virusa APK

Pomnoževanje virusa afriške prašičje kuge (APK) poteka v monocitih in makrofagih, pa tudi v endotelnih celicah, hepatocitih, tubularnih celicah ledvic, ni pa bil ugotovljen v limfocitih T ali B. Lahko pa se replicira tudi v organih klopotov, kot so *Ornithodoros moubata* in *Ornithodoros erraticus*. Virus je mogoče adaptirati na rast na celicah prašičjega izvora. Virus se s proteinom p72 in p54 veže na ustrezne površinske receptorje celice. V celico vstopi po principu endocitoze. Po vstopu pride do slačenja virusa, sledi prepis virusne DNA z DNA odvisno polimerazo RNA (transkriptaza), nato se zgodnji geni prepišejo v mRNA z od DNA odvisno polimerazo RNA, ki se nahaja v virusu, nato poteka pomnoževanje DNA, temu sledi prepis poznih genov. Občutljivost živali je odvisna od



prisotnosti receptorjev na površini celic, kot je marker CD163. Večina zgodnjih genov ima na 3' prepoznaven start kodon, dolg 50 bp. Pomnoževanje virusa poteka v citoplazmi celice. Sinteza DNA poteka po nastanku zgodnjih proteinov, kot so encimi timidin kinaza, ligaza DNA in ribonukleotid reduktaza. Nekateri strukturni proteini virusa se fosforilirajo in glikolizirajo. Prepis virusnih genov je odvisna tudi od celične polimeraze RNA. Nukleokapsida virusa se gradi ob celičnem jedru, nato potuje do celične membrane vzdolž celičnih mikrotubulov, kjer poteka dokončno izgrajevanje. Prost virus se lahko s hemaglutinacijskim proteinom pripne na lektinske molekule eritrocitov in se tako raznese po telesu.

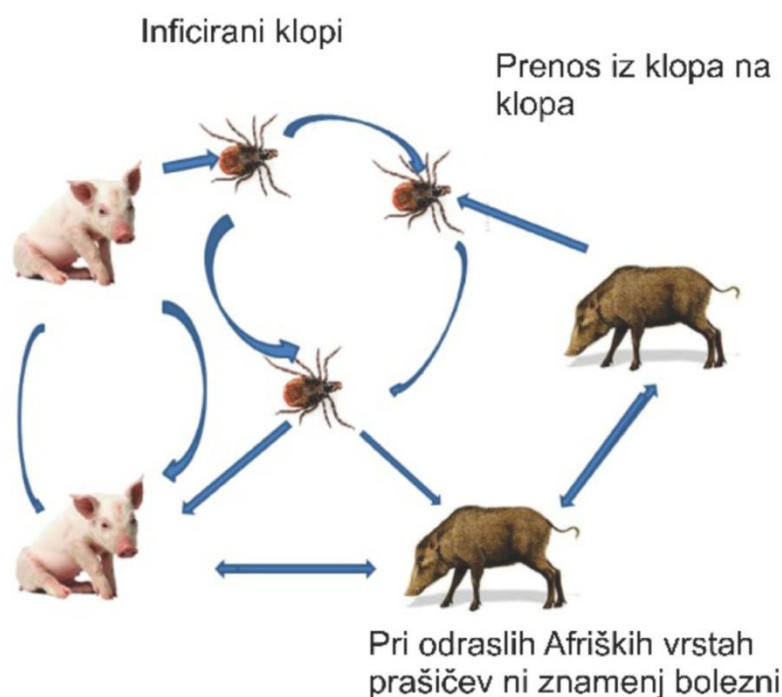
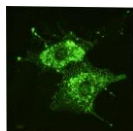
Patogeneza virusa APK

Klinični znaki Afriške prašičje kuge so zelo podobni kliničnim znakom Klasične prašičje kuge. V primeru okužbe po oronazalni poti so tonzile primarno mesto razmnoževanja virusa, sledi pomnoževanje v limfatičnih organih čemur posledično sledi levkopenija. V okuženem makrofagu pride do blokade sekrecije in sinteze citokonov in interferona. Do poginov prihaja zaradi petehialnih krvavitvev, infarktov in generaliziranih hemoragij. Bolezen poteka v perakutni, subakutni in kronični obliki. V perakutni obliki prihaja do poginov v roku od 24 do 48 urah po pojavu bolezni. Znaki so: povišana telesna temperatura, neješčnost, cianoza sluznic in kože, bruhanje, diareja, paraliza in pogin. Podobni znaki se v milejši obliki pojavijo tudi pri subakutnem poteku bolezni, ki traja do 14 dni. Prisotne so neješčnost, povišana telesna temperatura, anoreksija, abortusi gravidnih svinj. Pri kronični obliki obolenje poteka brez značilnih simptomov. Ob sekciji opazimo številne petehijalne krvavitve po visceralnih organih, predvsem po ledvicah in vranici. Bezgavke so močno povečane in hemoragične. V fecesu je prisotna kri. Za to obolenje je značilen pojav infarkta vranice. Zaradi masovnega propada makrofagov prihaja v kapilarah vranice do zamašitve. Posledica tega je blokada izstopanja krvi iz vranice, kar povzroči enormno povečanje vranice. Zaradi poškodb endotelnih celic krvnih žil in kapilar se po vseh visceralnih organih in sluznicah pojavijo hemoragije. Apoptoza limfocitov povzroči drastičen upad števila limfocitov, kar imenujemo limfopenija. V zadnji fazi bolezni je prisotna tudi močna trombocitopenija.

Epidemiologija

Virus se lahko prenaša neposredno, s kontaktom iz bolne živali na zdravo. Kot vektor in prenašalec nastopajo tudi klopi. Virus se prenaša tudi znotraj populacije klopov, tako da so le-ti najpomembnejši rezervoar bolezni. Virus APK so ugotovili pri klopih vrste *Ornithodoros moubata* (v Afriki) in *Ornithodoros erraticus* (v Evropi). Avtohtone vrste afriških prašičev so na okužbo rezistentni, okužba poteče nezaznavno, vendar pa so nosilci virusa. Ob prvem stiku virusa z neimuno populacijo se pojavi visok pogin s kratkim febrilnim stanjem živali. Okužene živali postanejo depresivne, prenehajo jesti, se stisnejo v gručo, pri perakutni obliki lahko poginejo, preden se sploh pojavijo klinični znaki. Pojav bolezni je navadno povezan z vnosom okužene živali v čredo, s kontaktom z divjimi prašiči, izdelki inficiranih prašičev ali posredno z vozili, ljudmi in steljo. Inkubacija traja od 5 do 15 dni, pojavi se visoka telesna temperatura (41–42 °C), izguba apetita, hitro in plitvo dihanje, petehije po koži, pojavi se bruhanje, krvava diareja, koža postane modro rožnate barve. Gravidne živali abortirajo, sluznice so rdeče, krvave, sledi hiter pogin. Pri tistih, ki preživijo, se v nekaj dneh razvijejo živčna znamenja.

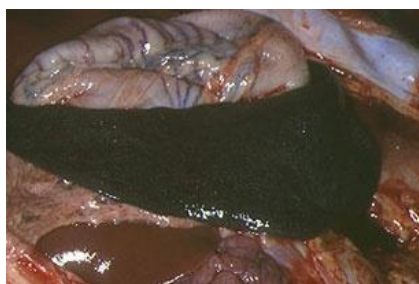
Ob sekciji vidimo kožo modre barve, zlasti po trebuhu, nogah z multiplimi hemoragijami. Prisotne so krvavitve iz nosne in ustne votline, okolica rektuma je zamazana s krvavim fecesom. Vsi notranji organi so praviloma močno hemoragični, enormno povečana vranica, krvave bezgavke, vidne so hemoragije po ledvicah in sluznici želodca, črevesje je lahko napolnjeno s krvjo.



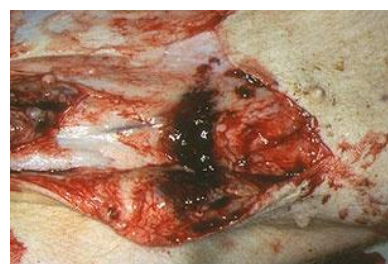
Slika 27: Pot širjenja in ohranjanja virusa APK v naravi.



Slika 28: Ledvice; izliv krvi v pelvis z močnimi hemoragijami.
http://en.wikipedia.org/wiki/File:African_swine_fever_necropsy.jpg (24.04.2012)



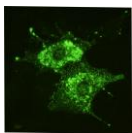
Slika 29: Vranica je značilno črne barve.
http://en.wikipedia.org/wiki/File:African_swine_fever_necropsy.jpg (24.04.2012)



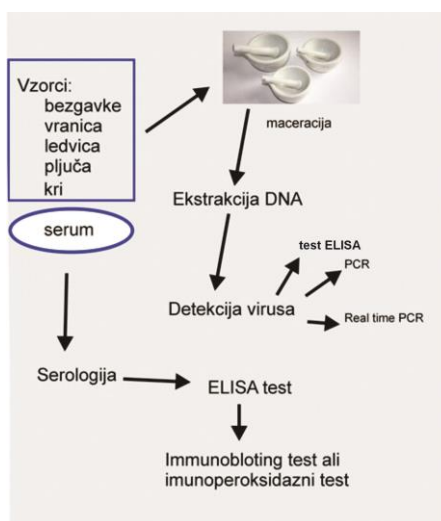
Slika 30: Vranica; močna hipertrofija, črne barve, z infarkti.
http://en.wikipedia.org/wiki/File:African_swine_fever_necropsy.jpg (24.04.2012)

Diagnostika okužb z virusom APK

V diagnostičnem smislu je hemadsorpcijska lastnost virusa velikega pomena, vendar pri nekaterih izolatih gen za ta protein manjka, tako da je pri uporabi diagnostičnih metod treba upoštevati tudi ta pojav. Na bolezen posumimo v primeru febrilnega stanja živali s hemoragijami in visokim odstotkom pogina. Bolezen potrdimo z laboratorijskimi preiskavami. Za preiskavo potrebujemo vzorec krvi z antikoagulantom - EDTA (0,5 %), in serumski vzorec. Ob sekciji odvezamo vzorec vranice in bezgavk (črevesne ali vratne – submandibularne, retrofaringealne), primerni so tudi vzorci ledvic. Do laboratorija vzorce transportiramo v hladilni torbi pri 4 °C. Bolezen lahko dokažemo tudi s prisotnostjo specifičnih protiteles proti virusu APK. Protitelesa dokazujemo v testu ELISA ali indirektnem imunofluorescenčnem ali imunoblot testu.



V diagnostiki uporabljamo izolacijo virusa na prašičjih makrofagih. Večina izolatov ima hemaglutinacijske lastnosti. Virusni antigen dokažemo tudi z imunofluorescenčnim testom ali z dokazom genoma v testu PCR.



Slika 31: Shema prikazuje laboratorijske metode za diagnostiko APK v primeru postavitve suma bolezni.

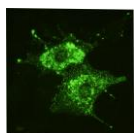
Neposredne metode

Hemadsorpcijski test temelji na dejstvu, da se prašičji eritrociti vežejo na monocite in makrofage inficirane z virusom APK. Vzorec vranice, tonzil, ledvic razrežemo na drobne koščke, jih obdelamo z mastikatorjem, dodamo puferno raztopino, centrifugiramo in supernatant uporabljamo kot vzorec za nadaljnje preiskave. V ta namen najprej izoliramo makrofage zdravega prašiča, kamor nasadimo preiskovan vzorec. Po 24 urah makrofagom dodamo eritrocite zdravega prašiča. V pozitivnem primeru, se bodo eritrociti zdravega prašiča vezali na okužene makrofage. Če se v makrofagih nahaja virus APK, se eritrociti prilepijo na površino makrofaga, kar lahko opazujemo pod mikroskopom. Obstajajo tudi sevi, ki nimajo hemaglutinacijskih lastnosti.

Uporaba **testa ELISA** za dokaz antigena je priporočljiva za vzorce živali s kliničnimi znaki ali patološkimi spremembami. S testom ELISA se lahko prisotnost antigena virusa APK dokaže v materialu (levkociti, serum, nekoagulirana kri, suspenzija organov). Uporabljamo različne komercialno dosegljive teste ELISA. Ta test je manj občutljiv v primerjavi z molekularnimi metodami, zato je njegova uporaba za diagnostične namene v primeru negativnega rezultata omejena.

Virus KPK lahko dokažemo tudi z **imunofluorescenčnim testom** v histoloških rezinah tkiva ledvic, vranice ali tonzil poginjenega prašiča. Histološko rezino tkiva fiksiramo na predmetnico, jo prekrijemo s konjugatom, ki vsebuje specifična protitelesa proti virusu APK, inkubiramo preparat 1 uro pri 37 °C, speremo nevezan konjugat, rezultat pa odčitamo pod fluorescenčnim mikroskopom. Zaradi *in vivo* tvorbe kompleksov antigen-protitelo so lahko reaktivna mesta na antigenu zasedena, konjugat se nima kam vezati, posledica pa je lažen negativen rezultat.

Od leta 1995 dalje je vse bolj uveljavljena **metoda PCR** in **metoda PCR v realnem času**. V diagnostičnem postopku najprej izoliramo virusno DNA iz preiskovanih vzorcev. Najbolj ohranjena je centralna regija virusnega genoma, pomnožimo gen za protein p72. Virusno nukleinsko kislino lahko dokažemo v serumu, krvi ali suspenziji organov bolnih živali. Ker sama metoda PCR določa le virusni genom, lahko dobimo pozitiven rezultat tudi, če v vzorcu ni prisoten infektivni virus (npr. v avtolitičnih organih ali pri prebolelih živalih). S to metodo lahko detektiramo vse do zdaj poznane



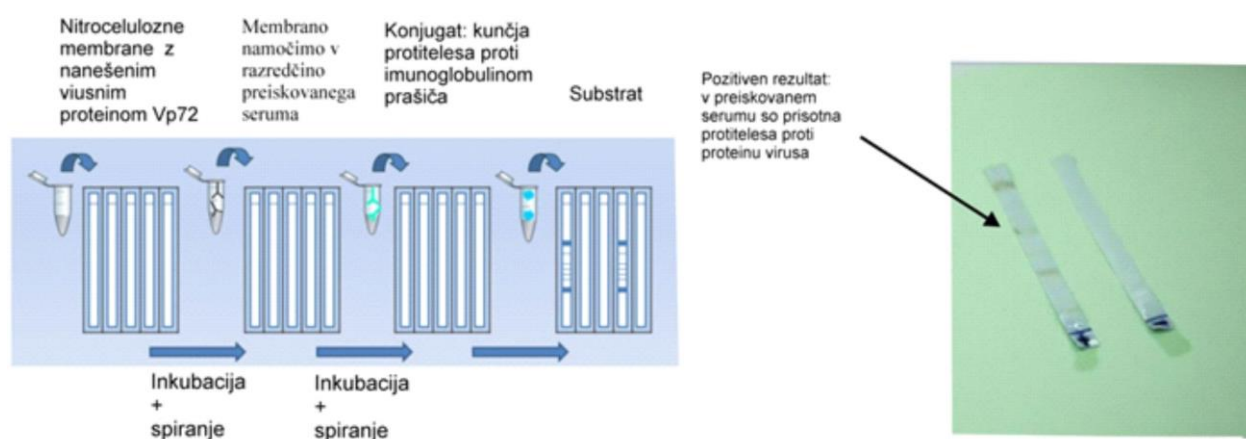
izolate, tako izolate s hemaglutinacijskimi kot nehemaglutinacijskimi lastnostmi, tiste z visoko kot nizko virulenco. Najzanesljivejša metoda za dokaz virusa je metoda PCR. Metoda polimerazne verižne reakcije (PCR) se uporablja za dokaz virusnega genoma (virusne nukleinske kisline) v vzorcih krvi ali suspenziji vzorcev vranice ali bezgavk. Izolat lahko genotipiziramo s tehniko sekvencioniranja – določanja nukleotidnega zaporedja.

V primeru pozitivnega rezultata z metodo PCR je treba opraviti genetsko tipizacijo virusa. Produkt PCR očistimo in mu določimo nukleotidno zaporedje. S primerjavo kratkega odseka v genu p72 lahko določimo genotip virusa APK. Poznamo 22 različnih genotipov virusa. Za primerjavo in interpretacijo rezultatov sekvenciranja je treba imeti specifične računalniške programe in molekularno epidemiološko znanje.

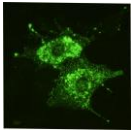
Posredne metode

V populaciji prašičev iz področij, ki veljajo proste te bolezni že dokaz protiteles proti virusu APK pozitiven rezultat kaže na okužbo. Za dokaz protiteles se najpogosteje uporabljata test ELISA in imunoblot test. Pri testu ELISA uporabljamo indirektno metodo. Na mikroplošče vezemo rekombinantni virusni protein ASF, kot sta p54, p62 ali p32. Specifična protitelesa dokazujemo v preiskovanem serumu, ki ga v določeni razredčini vnesemo v jamice mikroplošče z vezanimi virusnimi proteini. Po inkubaciji in spiranju dodamo še konjugat, sledi inkubacija, spiranje, dodamo substrat, ki se v primeru prisotnosti imunskih kompleksov obarva.

Imunoblot test temelji na principu vezave antigen-protitelo. Immunoblot test je potrditveni test, ki ga uporabimo v primeru pozitivnega rezultata v testu ELISA. Virusne proteine z elektroforezo nanesemo na celuloidno membrano, nato membrano pomočimo v preiskovani serumski vzorec. Po inkubaciji in oplakovanju dodamo še konjugat, nato sledi še substrat. Specifična protitelesa se nato vežejo na določene proteinske fragmente virusa APK na nitroceluloidni membrani, ki jih substrat obarva. Test se lahko izvede znotraj 3 ur. V pozitivnem primeru se na membrani pojavi obarvan pas.



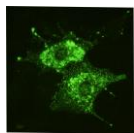
Slika 32: Prikaz izvedbe imunoblot testa za dokaz specifičnih protiteles proti virusu APK.



APK je od leta 2007 prisotne tudi v mnogih državah vzhodne Evrope ter se predvsem z divjimi prašiči širi proti zahodu in se je že povsem približala mejam EU. Slovenija ima status države proste APK. V primeru postavitve suma se vzorce pošlje na Nacionalni veterinarski inštitut Slovenije, pozitiven vzorec pa se pošlje še v Referenčni laboratorij Evropske unije.

Dodatni študijski viri:

- King AMQ., Adams MJ., Carstens EB in Lefkowitz EL: Virus Taxonomy, 9th report of the ICTV. Elsevier, 2012, 153 – 161.
- Costard S, Wieland B, de Glanville W, et al. African swine fever: how can global spread be prevented? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2009; 364(1530): 2683–96.



VIRUSI Z ENOVIAČNIM POZITIVNO ORIENTIRANI RNA GENOMOM

6. *Picornaviridae*

7. *Flaviviridae*

8. *Arteriviridae*

9. *Coronaviridae*

6

PICORNAVIRIDAE

Splošne lastnosti in klasifikacija pikornavirusov

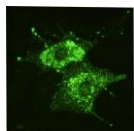
V veterinarski medicini so virusi iz družine *Picornaviridae* pomembni zlasti zato, ker v to družino spada rod *Aphtavirus*, v katero je uvrščen povzročitelj slinavke in parkljevke (SIP). Bolezen slinavka in parkljevka je zaradi svoje kontagioznosti in velikih ekonomskih izgub, ki jih povzroča, najpomembnejša kužna bolezen pri parkljarjih. Njena osnovna značilnost je ta, da za okužbo obolevajo vsi parkljarji. Bolezen je izjemno kontagiozna. Ob njenem pojavu nastanejo velike ekonomske izgube zaradi neposrednih škod, kot so pogini, padec mlečnosti in prireje mesa, ter posredne škode, vezane na zaporo prometa z živalmi ter izgub v predelovalni in mesni industriji. Države, ki so proste te bolezni, veliko vlagajo v vzdrževanje tega statusa v obliki kontrole prometa, države, v katerih je bolezen prisotna, pa vlagajo v njeno izkoreninjanje v obliki uničevanja okuženih živali ali preventivnega cepljenja.

V družino *Picornaviridae* je uvrščenih preko 230 različnih vrst virusov. Pikornavirusi so imeli pomembno vlogo tudi v preteklosti, tako v zgodovini virologije kot tudi v veterinarski medicini. Leta 1897 je Loeffler dokazal, da povzročitelj slinavke in parkljevke prehaja filter, ki sicer zadrži nekatere druge mikrobe – bakterije, in dokazal da te bolezni ne povzročajo bakterije, ampak filtrabilni agensi. Konec 19. stoletja in v začetku 20. stoletja je bilo v Evropi veliko izbruhov slinavke in parkljevke, kar je povzročilo veliko ekonomsko škodo, zato so vlade posameznih držav sprejele ustrezne preventivne ukrepe, da bi preprečili širjenje virusa.

Ena izmed pomembnih lastnosti pikornavirusov je, da v naravi kroži veliko število serotipov. Serotip je definiran kot zmožnost nevtralizacije virusa z monospecifičnim serumom. Na primer: specifični serum, pridobljen z imunizacijo živali z virusom SIP tipa A, zaščiti žival pred reinfekcijo z virusom SIP tipa A, ne pa tudi pred ostalimi serotipi. Posamezni izolati znotraj enega tipa se prav tako antigensko razlikujejo med seboj.

Družina *Picornaviridae* spada v rod *Nidovirales*. Osnovna značilnost genoma je enovijačna pozitivno orientirana molekula RNA. Sestavljajo jo naslednji rodovi: *Aphtavirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Rhinovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Parehovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Tecshovirus* in *Tremovirus*.

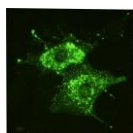
Pomembna razlika med posameznimi rodovi je stabilnost pri nizkem pH, kar je tudi v preteklosti služilo klasifikaciji izolatov, sicer pa klasifikacija sloni na razlikah nukleotidnega zaporedja genomske regije P1. Aphtovirusi so nestabilni pri pH pod 7, rinovirusi izgubijo infektivnost pri pH pod 5, enterovirusi, hepatovirusi, cardiovirusi in parehovirusi pa so stabilni celo pri pH 3. Velike razlike znotraj družine *Picornaviridae* nastopajo v strukturi genoma, geni strukturnih proteinov zavzemajo 50 % genoma pri aphtovirusih, pri enterovirusih pa ta segment predstavlja 70 % genoma. Genom ima en bralni okvir, ki se prepiše v mRNA iz katere nastane en poliprotein. Vsi pikornavirusi imajo enovijačno pozitivno orientirano molekulo RNA. Na 5' konec je kovalentno



vezan protein VPg. Razvrstitev v posamezne rodove temelji na dolžini te regije, ki je dolga od 500 do 1500 nt. Nekodirajoča regija na 5' koncu vsebuje tudi od 400 do 450 bp dolg segment odgovoren za vezavo na ribosome (regija IRES, angl. *internal ribosome entry site*). Regija IRES omogoča začetek translacije bralnega okvirja in sintezo virusnega poliproteina. Molekula RNA ima na 3' koncu poli A rep. Virusi iz rodu *Aphtovirusi* imajo največji genom med pikornavirusi, ta meri do 8500 bp (baznih parov). V rodu *Aphtovirusi* je poznanih 7 serotipov.

ROD / Vrsta	Gostitelj	Simptomi
APHTOVIRUS		
<i>Bovine rhinitis virus</i> (Slo. <i>Virus govejega rinitisa</i>)	govedo	<i>laringotraheitis</i>
<i>Equine rhinitis A virus</i> (Slo. <i>Virus rinitisa konj</i>)	konji	<i>laringotraheitis</i>
<i>Foot and mouth disease virus</i> (Slo. <i>Virus slinavke in parklevke</i>)	vsi parklarji	<i>afte in erozije po sluznicah ust in po svitku</i>
CARDIOVIRUS		
<i>Encephalomyocarditis virus</i> (Slo. <i>Virus encefalomiokarditisa</i>)	glodalci, konji, govedo, prašiči	<i>miokarditis, nekroze srčne mišice</i>
AVIHEPATOVIRUS		
<i>Duck hepatitis A virus</i> (Slo. <i>Virus hepatitisa rac</i>)	race	<i>diareja, apatija</i>
ENTEROVIRUS		
<i>Bovine enterovirus</i> (Slo. <i>Goveji enterovirus</i>)	govedo	<i>diareja</i>
<i>Porcine enterovirus</i> (Slo. <i>Enterovirus prašičev</i>)	prašiči	<i>diareja</i>
ERBOVIRUS	konji	
<i>Equine rhinitis B virus</i> (Slo. <i>Virus rinitisa konj</i>)		<i>laringotraheitis</i>
KOBUVIRUS		
<i>Bovine kobuvirus</i> (Slo. <i>Goveji kubovirus</i>)	govedo	<i>gastroenteritisi</i>
SAPELOVIRUS		
<i>Avian sapelovirus</i> (Slo. <i>Sapelovirus perutnine</i>)	perutnina	
<i>Porcine sapelovirus</i> (Slo. <i>Sapelovirus perutnine</i>)	prašiči	
TESCHOVIRUS		
<i>Porcine teschovirus</i> , (Slo.: <i>Virus Tešinske bolezni</i>)	prašiči	<i>encefalitisi, paraliza, nekoordinirana hoja</i>
TREMOVIRUS		
<i>Avian encephalomyelitis virus</i> (Slo. <i>Virus encefalomielitisa perutnine</i>)	perutnina	<i>nekoordinirana hoja</i>

Preglednica 5: V družino Picornaviridae je uvrščenih 12 rodov, za veterino je zanimivih 8, v katere so uvrščeni virusi, patogeni za domače živali.



Imena so posameznim serotipom dali najprej po začetnicah mest, kjer je bil posamezen serotip ugotovljen, in kontinentih, tipu C pa so dali ime, ker je tretji po vrsti odkrit serotip. Znotraj posameznega serotipa razlikujemo še različne podtippe. Zanimivo je, da vakcinacija proti enemu tipu/podtipu ne daje zadovoljive zaščite proti drugim tipom/podtipom, kar pomeni, da bi morali živali cepiti proti vsem tipom, če bi želeli doseči zadovoljivo zaščito, kar pa zaradi številnih podtipov ni mogoče. Različna zaščita nastopa tudi znotraj posameznega tipa, odvisna je od podtipa, ki je povzročil infekcijo.

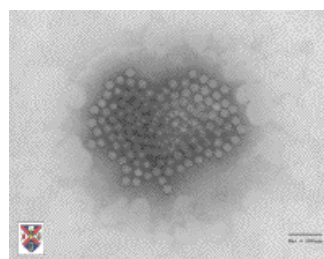
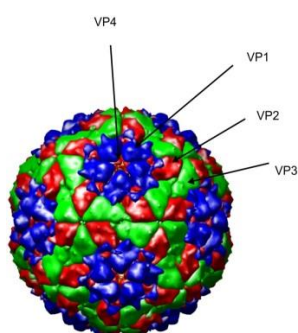
Virus slinavke in parkljevke		
Družina	Rod	Serotip
Picornaviridae	Aphtovirus	O (Oise – 1922)
		A (Ardenne – 1922)
		C (tretji po vrsti, oznaka C, 1926)
		SAT 1 (South Africa Territory)
		SAT 2
		SAT 3
		Asia 1

Preglednica 6: Razvrstitev virusa slinavke in parkljevke v serotipe.

Morfološke značilnosti

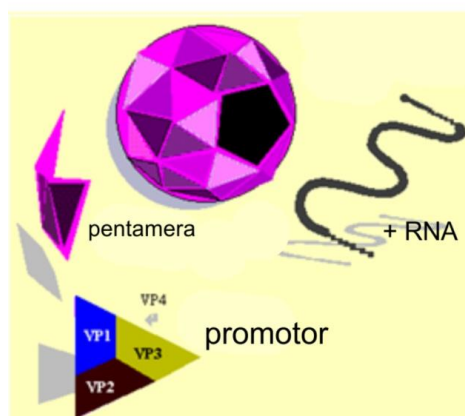
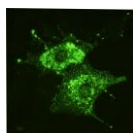
Virusi, uvrščeni v to družino, so brez ovojnice, okroglaste oblike, premera od 22 do 33 nm, in ikozaedralne simetrije. Kapsida je zgrajena iz 60 enakih podenot (protomer). Vsako protomero pa sestavljajo trije zunanji in en notranji strukturni protein. Virus, ki ga opazujemo pod elektronskim mikroskopom, morfološko spominja na obliko žoge. Površina je hrapave oblike. Nukleokapsido predstavljajo strukturni proteini, formirani v protomere, te pa se združujejo v pentamere. Strukturne beljakovine predstavljajo proteini, označeni z VP (angl. *viral protein*) VP1, VP2, VP3 in VP4 ter protein VPg.

Proteini VP1, VP2 in VP3 sestavljajo pentamero, med njimi je receptorsko mesto celice, ki ga pri aftavirusih v obliki zanke predstavlja protein VP4. Del proteina VP4 sega v notranjost in je v stiku z RNA. Pri enterovirusih opazimo, da so proteini VP1, VP2 in VP3 v stiku in skupaj tvorijo ugreznino, kjer se nahaja receptorsko mesto za vezavo nevtralizacijskih protiteles. Molekule protiteles s svojim fragmentom Fc le s težavo sežejo v ugreznino, zato ostanejo nezasedeni. Virus SIP ima podobno strukturo, vendar brez vdolbin. Posebnost je tako imenovana zanka G-H, ki je del, s katerim se virus SIP pritrdi na celico gostiteljico in nekoliko štrli izven površine.

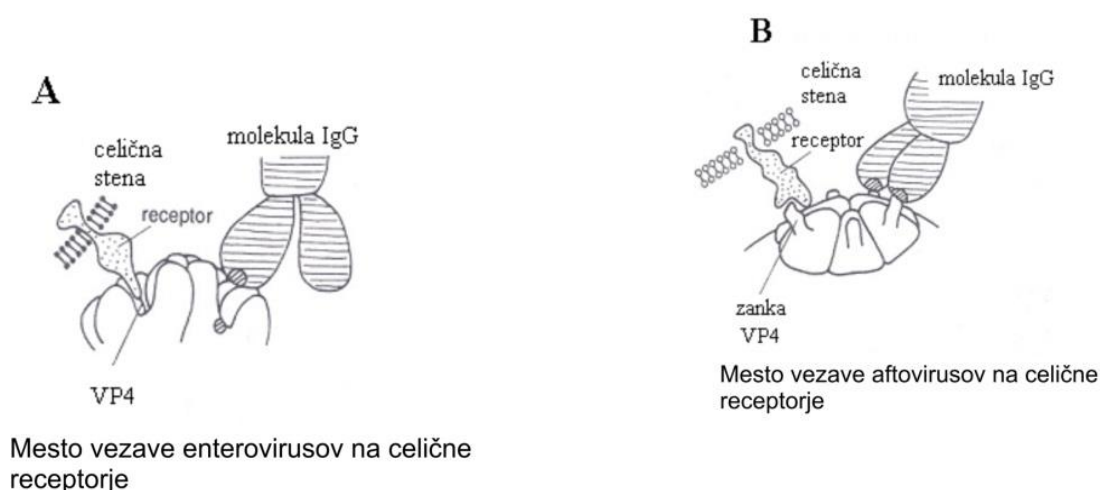


Slika 33: Model virusa slinavke in parkljevke, 3D (Povzeto po: <http://www.virology.wisc.edu/virusworld/viruslist.php?virus=fmd> (24.04.2012))

Slika 34: Morfološki videz virusa slinavke in parkljevke pod elektronskim (povzeto po: <http://www.virology.wisc.edu/virusworld/viruslist.php?virus=fmd>, 24.04.2012)



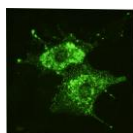
Slika 35: Shematski prikaz zgradbe virusa slinavke in parkljevke. Zunanji sloj je zgrajen iz proteinov VP1, VP2 in VP3, pod njimi leži še VP4.



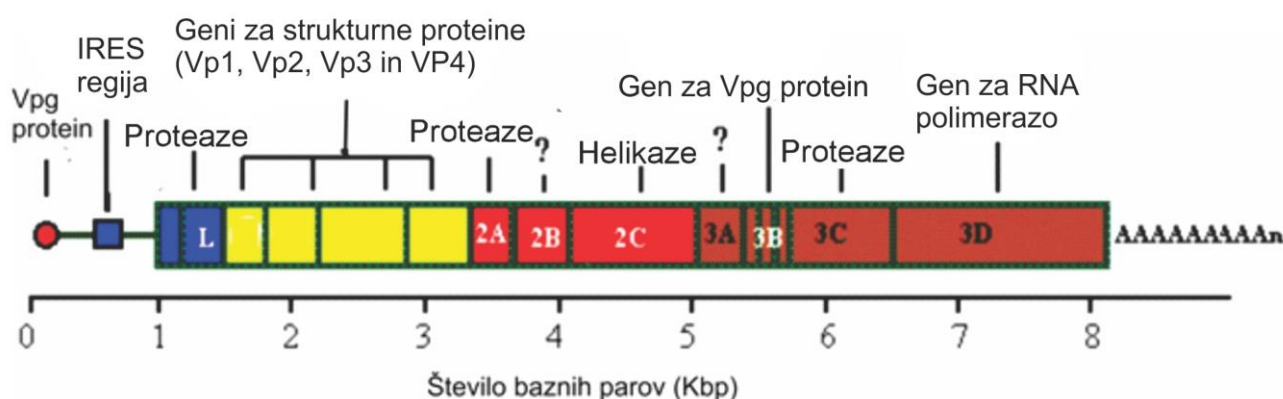
Slika 36: Vezava proteina VP4 enterovirusov (A) ter virusa slinavke in parkljevke (B) na celični receptor.

Virusni genom

Genom virusov, ki so jih uvrstili v družino *Picornaviridae*, predstavlja enovijačna pozitivno orientirana molekula RNA, dolžine od 7,2 do 8,4 kb. RNA je sama po sebi infektivna. Nukleinska kislina virusa SIP je infektivna zaradi tega, ker je pozitivno polarna, kar pomeni, da ne potrebuje prevedbe v sporočilno RNA (mRNA). Genom ima dolg bralni okvir (angl. *reading frame*, ORF). Virusna RNA se na ribosomih prepiše v velik poliprotein. Po končani translaciji poliprotein razcepijo proteolitične proteaze na specifičnih mestih in na ta način nastanejo strukturni in nestrukturni proteini. Genom RNA je na 3' koncu poliadeniran, kar pomeni, da se 3' konec zaključi z zaporedjem 10 baz adenina, kar povečuje infektivnost in stabilnost molekule. Na 5' konec je vezan protein VPg, dolg le 22 aminokislin. Majhen protein VPg je kovalentno vezan na 5' konec virusne RNA in ima vlogo povezovalnega elementa med kapsido in genomom ter nastopa kot aktivator sinteze molekule



RNA. VPg regiji sledi 5' UTR (angl. *untranslated region*), velikosti približno 1300 nukleotidov, in regija IRES (angl. *internal ribosome entry site*), ki nastopa kot mesto vezave virusne RNA na celični ribosom. Ta regija UTR predstavlja prepoznavno mesto za začetek translacije in za vnos genoma v kapsido. Na 3' koncu, pred A repom je tudi krajša nekodirajoča regija (od 50 do 100 nt) in je potrebna za sintezo negativne RNA v procesu replikacije. Virusi iz rodu *Enterovirus*, *Hepatovirus* in *Parechovirus* nimajo gena za protein L. Sledi področje, ki kodira strukturne proteine. Genom se glede na funkcijo posameznih genov razdeli na tri dele, P1, P2 in P3. Regija P1 genom kodira strukturne proteine in je razdeljena v 4 segmente (VP1, VP2, VP3 in VP4) oziroma gene za kodiranje štirih strukturnih proteinov, ki so sestavni del kapside. Regija P3 kodira encime; to so nestrukturni proteini. Sestavljena je iz genov za nestrukturne proteine 3A, 3B, 3C in 3D. Najbližje 3' koncu genoma se nahaja gen za od RNA odvisno polimerazo RNA. Razlike v genomu med posameznimi serotipi virusa SIP nastopajo zlasti v regiji 1C, regiji, ki kodira protein VP3.



Slika 37: Organizacija genoma virusa slinavke in parkljevke. Na 5' koncu je vezan protein Vpg, 3' konec genoma pa se končuje s poli A repom. Genom kodira en sam poliprotein, ki se kasneje razcepi. Imena proteinov so označena znotraj bralnega okvirja.

Pomnoževanje virusa slinavke in parkljevke

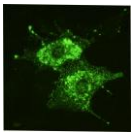
Pomnoževanje pikornavirusov poteka v citoplazmi celice. Celični metabolizem se po vstopu virusa zaustavi, posledično propadejo okužene celice, ki se kažejo z morfološko spremembo in citopatski efekt (CPE). Enovijačna pozitivno polarna RNA pikornavirusov se pomnožuje s pomočjo virusnih replikaz (od RNA odvisnih RNA polimeraz). Pozitivno polarna RNA pikornavirusov je hkrati tudi sporočilna RNA (mRNA), ki se prevede na ribosomih v beljakovine. Ker njihova RNA deluje kot mRNA, ti virusi ne potrebujejo transkriptaze.

Vezava virusa na celico

Adsorbcija virusa SIP na celico gostiteljico poteka preko zanke G-H. Zanka vsebuje aminokislinski triplet Arg, Gly in Asp. Kot receptorska mesta na celici nastopajo heparan sulfat in lipoproteini. Na mestu vezave se celična stena uvihne in obda virusni partikel, nastane vakuola. Vakuola se v citoplazmi združi z lizosomom, tako da lizosomalni encimi razgradijo kapsido, nato se genom skozi pore membrane sprosti v citoplazmo.

Sinteza beljakovin in RNA

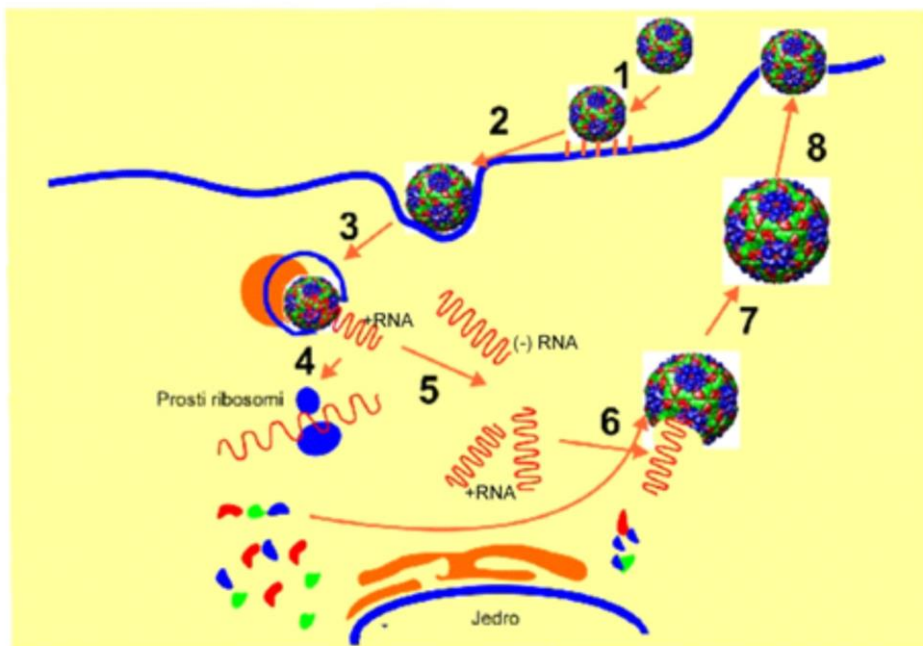
Po adsorbciji in vstopu v celico, sledi slačenje celularni encimi odstranijo protein Vpg. Pomnoževanje poteka v citoplazmi celice. Virusna RNA s svojim 5' nekodirajočim koncem



predstavlja receptor za celične polisome, kjer poteka translacija. Translacija, sinteza virusnih proteinov, poteka na polisomih, nastane velik poliprotein, ki se pozneje razcepi na od 10 do 12 funkcionalnih proteinov, odvisno od vrste virusa. Od tega so štirje proteini strukturni. Celoten genom ima tako samo en bralni okvir. Eden od produktov translacije je encim virusna od RNA odvisna polimeraza RNA (nestrukturni protein 3D), ki prepiše virusno RNA v negativno orientirano RNA. Ta oblika RNA predstavlja matrico za sintezo virusne RNA. Na posamezni negativno polarni RNA se sočasno sintetizira več pozitivno polarnih RNA. Nekaj novonastalih molekul RNA služi za sintezo proteinov, druge pa se uvedejo v kondenzirajoče se strukturne proteine. Zgodnje pozitivno orientirane RNA molekule se prevedejo v polisome, kjer se ponovno tvorijo proteini. Grajenje novih virionov je vezano na predhodno tvorbo kapside. V endoplazmatskem retikulumu se okrog RNA kondenzirajo protomere kapside, nastane provirion. Ko se VP0 razcepi na VP4 in VP2, postane virion infektiven. Celotno pomnoževanje virusa traja 3 ure, na hitrost replikacije vpliva pH, temperatura, gostitelj, število partiklov, ki je inficiralo celico.

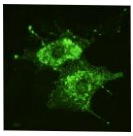
Izstopanje:

Virusi izstopijo, ko se celica razkroji. Nestrukturni protein, ki ga kodira gen 2B, je vključen v sintezo RNA, gen 2B pa je vrstno specifičen in sodeluje pri sestavljanju kapside. Protein 2A prekinja sintezo celičnih beljakovin. Regija P2 kodira nestrukturne proteine, sestavljena iz treh segmentov; 1A, 2B in 2C.



Slika 38: Prikaz pomnoževanja virusa slinavke in parkljevke: (1) vezava virusa na površino celice, (2), vstopanje z endocitozo, (3) spajanje endosoma z lizosomom ter slačenje virusa, (4) translacija na prostih ribosomih, (5) prepis iz +RNA v –RNA, (6) sestavljanje nukleokapside, nastane provirion, (7) zorenje virusa, cepljenje VP0 v VP4 in VP2 (infektiven virion), (8) izstopanje iz celice.

Vrsta: Virus slinavke in parkljevke (SIP), (angl. Foot and mouth disease virus, FMD)



Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine

Slinavko in parkljevko je prvi opisal Fracastorius leta 1546, ko je natančno poročal o sami bolezni in poteku izbruha te bolezni v severnem delu Italije. SIP je endemično razširjena v državah Južne Amerike, Afrike in Azije. Tradicionalno proste te bolezni so države Severne Amerike, Avstralija, Skandinavija in Japonska. Za SIP obolevajo parkljarji, od domačih živali so to govedo, prašiči, ovce in koze. V eksperimentalnih pogojih je mogoče inficirati tudi kunce, budre in miši.

Povzročitelj slinavke in parkljevke spada v družino *Picornaviridae*, rod *Aphthovirus*. Osnovne značilnosti virusa:

- Hrapava površina, kroglaste oblike, velikost premera od 24 do 30 nm, ikozaedralna simetrija.
- Genom vsebuje enovijačno pozitivno orientirano RNA.
- Kapsida je zgrajena iz 60 kopij pentamer, ki jih sestavljajo protomere, te pa so iz štirih strukturnih proteinov, označenih z VP1, VP2, VP3 in VP4 (pogosta oznaka je tudi 1A, 1B, 1C in 1D).
- Na koncu 3' je genom poliadeniniran, na koncu 5' je pripet protein VPg.
- Molekula RNA nastopa kot mRNA in se pretvori v poliprotein, ki se razcepi na 12 proteinov.
- Replicira se v celični citoplazmi.

Virus lahko razmnožujemo na različnih celičnih kulturah sesalcev, kot so BHK, celice tiroide, renalne celice, kjer povzroča citopatski efekt.

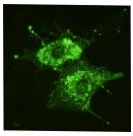
Pri virusu slinavke in parkljevke razlikujemo 7 različnih serotipov z oznakami O, A, C, SAT1, SAT1, SAT 3 in Asia1. Razvrstitev različnih izolatov SIP v različne serotipe temelji na osnovi rezultatov navzkrižne zaščite. Živali, ki prebolijo infekcijo z enim tipom virusa, so pred reinfekcijo zaščitene proti temu tipu, ne pa tudi proti drugim. Izolati znotraj enega tipa kažejo antigenske in genetske razlike, zato se pojavlja več podtipov za posamezni serotip.

Za bolezen je značilno formiranje vezikul in erozij na mukozi gobca, koži seskov in na svitku parkljev. Pri mladih živalih prihaja do miokarditisa in posledičnih poginov, breje živali abortirajo. Bolne živali se slinijo, so neješče, imajo rahlo povišano telesno temperaturo. V akutni fazi bolezni se virus nahaja v vseh sekretih in ekskretih živali. Pri prežvekovalcih akutni fazi sledi sekundarna faza, ko žival izloča virus še dalj časa v esophagealno-pharyngealno tekočino. Smrtnost pri odraslih živalih je od 1 do 3-odstotna, pri mladih pa do 80-odstotna.



Slika 39: Tipične spremembe na svitku in sluznici jezika dva dni po pojavu kliničnih znakov bolezni (slika 1 in 2) ter tri dni po pojavu kliničnih znakov (slika 3) (povzeto po EU referenčnem laboratoriju za SIP, Pirbright Institute, Velika BritanijaB).

Okužba se širi posredno ali neposredno. V epidemiološkem smislu je pomemben transport živali in njihovih proizvodov. Govedo in ovce lahko izločajo virus že do 5 dni pred pojavom kliničnih znakov, prašiči pa celo do 10 dni. Drug pomemben mehanizem širjenja bolezni so kontaminirani



živalski proizvodi, kot so meso, mleko, sperma, kože. Pomemben faktor nekontroliranega raznosa virusa je veter. Prašiči producirajo velike količine virusa, tudi do 3000-krat več kot ovce. Na aerogeno infekcijo pa je najbolj občutljivo govedo zaradi velike površine pljuč. SIP je ena najpomembnejših bolezni, saj pri domačih živalih povzroča velike ekonomske izgube, ki jih lahko delimo v direktne, nastanejo kot posledica poginov, zmanjšane proizvodnje, in indirektne, vezane na omejitve prometa z živalmi in njihovimi proizvodi. Znotraj držav Evropske unije so leta 1991 prekinili z vakcinacijo parkljarjev proti SIP, posledica tega je polna občutljivost parkljarjev na virus SIP.

Bolezen se pojavlja praktično povsod po svetu, nekje sporadično, drugje je stalno prisotna. Za bolezen so dovzetni vsi parkljarji, to so govedo, ovce, koze, prašiči, divji parkljarji, ne zbolijo pa konji. Je mogoče okužiti tudi budre, miši in kunce. Ob izbruhu bolezni nastanejo v proizvodnji velike izgube zaradi poginov, manjše prireje mesa in manj mleka. Imunski odgovor je slab, prebolele živali so slabo zaščitene, zaščita je kratkotrajna, problematične so kronične okužbe, govedo je lahko nosilec virusa do 2 leti.

Patogeneza virusa Slinavke in parkljevke:

Mnogi avtorji so dokazali prisotnost virusa v ezofaringealni tekočini okuženih živali. Virus se pri aerogeni infekciji očitno najprej namnoži v celicah faringealne sluznice. Po pomnožitvi virusa na vhodnem mestu se virus z limfociti raznese po vseh organih. Viremija traja pri govedu po 3 do 5 dni. V fazi viremije lahko virus izoliramo iz vseh organov in krvi. Patohistološke spremembe se kažejo v obliki alteracij epitelnih celic, opazen je intracelularni edem stratuma spinosuma, nekroze in granulocitne infiltracije.

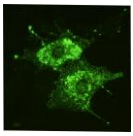
Miokarditis so ugotovili zlasti pri okužbi mladih živali. Nekroze se pojavijo zlasti na srčnih zaklopkah. Prihaja do vakuol in lize miokardnih fibril. Poškodbe se pojavijo od 6 do 7 dni po infekciji, ki so opažene zlasti na levem ventriklu in na interventrikularnem septumu. Vime pri živalih v laktaciji je prav tako lahko mesto replikacije virusa, mlečnost pade za od 30 do 50 %. V akutni fazi bolezni je v mleku velika količina virusa, tudi do 10^7 TCID₅₀ na mililiter mleka. V mleku so ugotovili prisotnost virusa še 51. dan po okužbi. Titer virusa v mleku začne upadati 6. dan po okužbi zaradi nastajanja specifičnih protiteles. V serumu okuženih živali lahko že od 4 do 5 dni po okužbi ugotovimo specifična protitelesa skupine IgM, nevtralizacijska protitelesa pa se pojavijo od 7. do 10. dne po okužbi. Ta perzistirajo več mesecev.

Za prežvekovalce je značilno, da potem ko bolezen prebolijo, posamezne živali ostanejo dolgotrajni nosilci virusa. Te živali ohranjajo specifična protitelesa v krvi.

Poročali so o dolgotrajnih nosilcih virusa. Prisotnost virusa so pri govedu dokazali tudi še 2 leti po prenehanju kliničnih znakov bolezni. Prašiči niso dolgotrajni nosilci virusa. Ko so znanstveniki ugotovili, da se virus ohranja v ezofaringealni regiji, so razvili sistem vzorčenja. S posebno čašo, ki se uvede skozi gobec v farings, pridobimo faringealno tekočino, ki vsebuje slino, sluz, celice. Ta sistem vzorčenja imenujemo vzorčenje probang in je najprimernejše, kadar ustreznega vezikularnega materiala ni mogoče pridobiti. Ugotovili so, da je 60 % živali še 4 mesece potem, ko so bolezen prebolele, še vedno nosilke virusa. Prav tako so ugotovili, da ostajajo nosilke virusa predhodno vakcinirane živali, prišle pa so v stik z virusom SIP. Mesto replikacije virusa pri perzistentno okuženih živalih je sluznica faringsa, dorzalna stran mehkega neba.

Poznano je, da je afriško govedo v naravnem okolju rezervoar virusa SIP. Eksperimentalno so dokazali, da je lahko perzistentno okuženo govedo nosilec virusa tudi do 5 let.

Perzistentnih okužb niso ugotovili pri prašičih. Pri aerogeni infekciji so z imunohistološkimi metodami ugotovili prisotnost virusa SIP v celicah stratuma spinosuma že 48 ur po eksperimentalni



aerogeni okužbi goveda. Virus se očitno transportira do celic kože po krvi. V kriptah tonzilarnega epitela so prisotnost virusa dokazali že 12 ur po aerogeni infekciji. Z metodo hibridizacije in situ, pa so virusno RNA dokazali že 6 ur po aerogeni infekciji.

Odpornost virusa

Virus SIP lahko ostane infektiven v okolju nekaj tednov, verjetno tudi dlje v prisotnosti organskih snovi, kot so zemlja, gnoj, posušeni živalski iztrebki ali kemično inertne snovi, kot so slama, dlaka, usnje.

Virus ima naslednje splošne značilnosti:

Najbolj je stabilen pri pH 7,4–7,6, preživi pa v razponu 6,7–9,5, če se temperatura zniža pod ledišče. Pod pH 5,0 ali nad pH 11,0 je inaktivacija virusa zelo hitra.

Dvig temperature zmanjša čas preživetja. Pri temperaturi pod lediščem je virus obstojen skoraj neomejeno. Temperatura 56 °C v 30 minutah praviloma uniči vse serotipe, čeprav obstajajo določene razlike med odpornostjo različnih serotipov na temperaturo pH. Sončna svetloba ima na preživetje vpliv v povezavi z izsušitvijo ali dvigom temperature.

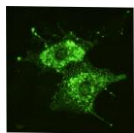
Preživetje virusa v zraku je odvisno od relativne vlažnosti zraka, pri relativni vlažnosti pod 60 % se virus inaktivira znotraj 24 ur.

Čas preživetja virusa v okolju po podatkih iz literature je v stoječi vodi do 50 dni, na pašniku pri temperaturi 18 °C do 74 dni, v zemlji, senu ali slami do 100 dni, na površinah z onesnaženo maščobo preživi tudi do 300 dni, v zraku pa do 48 ur. Ker je virus brez lipidne ovojnice je zelo občutljiv na kislinska razkužila.

Okužene živali izločajo virus z vezikularno tekočino počenih mehurčkov, izdihanim zrakom, slino, mlekom, semenom, fecesom in urinom. Okužene živali že pred pojavom kliničnih znakov izločajo velike količine virusa. Govedo in ovce izločajo virus do 5 dni, prašiči do 10 dni pred pojavom kliničnih znakov. Tudi klinično obbolele živali izločajo virus, v velikih količinah z izdihanim zrakom zlasti prašiči. V posušenih okuženih telesnih tekočinah in krvi ter pri temperaturi do 10 °C ostane virus kužen različno dolgo, kot na primer: v volni do 2 tedna, na usnju do 11 tednov, v senu do 15 tednov, na umazanih gumijastih škornjih do 13 tednov. V mesu, ki je po zakolu prešlo postopek normalnega zorenja, se virus SIP inaktivira v treh dneh, vendar lahko virus ostane obstojen dlje časa v mesu, kjer pH na pade pod 6,2. To se zgodi, če so trupi prehitro ohlajeni. Virus lahko več mesecev preživi v ohlajenih ali zamrznjenih limfnih vozlih, kostnem mozgu, drobovini in preostalih krvnih strdkih. V nasoljenem in sušenem mesu lahko virus preživi daljše obdobje. V klobasah na primer do 56 dni, v šunki pa do 183 dni. Čas preživetja v mlečnih izdelkih je daljši pri nizkih temperaturah, še posebej pri zamrzovanju. Preživetje virusa v mleku in maslu je do 45 dni, če se hrani na hladnem. Nizek pH pospeši inaktivacijo virusa SIP, na primer 4 °C pH 5,5 se virus inaktivira v 30 minutah. Temperatura 72 °C pri pH 6,7 ga inaktivira v 55 sekundah.

Faktorji, ki vplivajo na preživetje virusa v volni, so vezani na kontakt z organskim materialom, kot so feces, temperatura, relativna vlaga, sončna svetloba. Pri 4 °C preživi virus do 7 tednov, pri temperaturi 18 °C 2 tedna, pri temperaturi 37 °C pa 2 dni.

V sveže nasoljenih kožah pri temperaturi 15 °C preživi 90 dni, pri 4 °C pa preživi 352 dni. Kože, nasoljene v nasičeni slanici, s 500 ppm prostega klora, vsebujejo virus SIP še po 4 tednih shranjevanja pri temperaturi 15 °C. Virus SIP je bil izoliran tudi v posušenem vzorcu kože po 42 dneh pri temperaturi 20 °C in relativni vlagi 40 %. Virus SIP lahko dalj časa preživi v živalskih odpadkih, kot so suh gnoj do 14 dni, vlažen gnoj do 8 dni, gnoj v plasti debeline 30 cm manj kot 6 dni, v gnojevki pa 34 dni. pH normalnega urina praviloma hitro inaktivira virus.

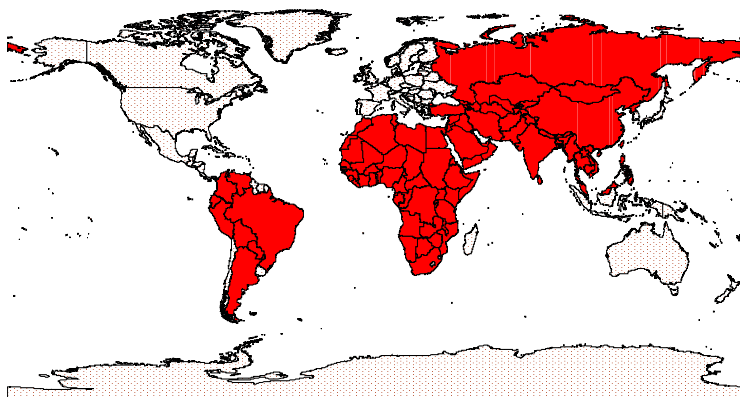


Vrste prenosa virusa

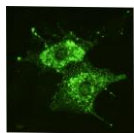
SIP je ena najbolj nalezljivih kužnih bolezni. Živali se okužijo preko dihal, prebavil in rodil. Najpogostejša oblika prenosa infekta je z direktnim kontaktom in aerosolom. Najpogostejše se živali med seboj okužijo, ko so blizu skupaj, v hlevu, napajališčih in krmiščih. Med gospodarstvi se infekcija širi zaradi premikov okuženih živali, transportnimi sredstvi, osebjem, opremo in proizvodi. Virus se lahko prenese tudi s spermo okuženih živali, v semenu se pojavlja do 4 dni pred pojavom kliničnih znakov bolezni in 37 dni po njem. V semenu se pojavi zaradi viremije in lezij v prepuciju. Virus se dokaj pogosto lahko prenaša na velike razdalje z zračnimi tokovi. Okužen aerosol se lahko razširi zelo daleč. Ko aerosol pride v ozračje, lahko potuje horizontalno ali vertikalno. Pod ugodnimi vremenskimi pogoji se okužen aerosol dvigne navpično, potuje na dolge razdalje in se ponovno spusti na zemljo, ne da bi se pri tem razredčil.

Količina virusa, ki se oddaja v ozračje, je odvisna od naslednjih faktorjev: stadija bolezni, števila okuženih živali in tipa virusa. Najpogostejše se virus z vetrom prenese na razdalje do 10 km. Govedo je najbolj dovzetno za aerogeno infekcijo. Ostali viri infekcije z aerosolom niso tako pomembni, z izjemo črpanja okuženega mleka iz bazena v cisterne brez zračnih filtrov. Pri prenosu bolezni so pomembni insekti kot tudi mehanski prenašalci virusa.

Razvite države so se odpovedale preventivnemu cepljenju predvsem zaradi velike raznolikosti virusa SIP in slabe imunske zaščite proti drugim tipom in podtipom, saj ni na razpolago cepiva, ki bi dajalo zaščito proti vsem serotipom. Če se v teh državah pojavi bolezen, jo izkoreninjajo s sistemom ubijanja in neškodljivega odstranjevanja bolnih in ogroženih živali ter strogim nadzorom in prepovedjo prometa z živalmi in živalskimi proizvodi. V državah, kjer se bolezen pojavlja pogosteje (endemično) ali pa je razširjena celo med divjimi parkljarji, pa domače parkljarje preventivno cepijo proti tistim tipom virusa SIP, ki se v določenem področju pojavljajo. Za uspešno zaščito je treba vsako žival 2–3 krat letno cepiti. Uporabljajo se inaktivirane vakcine.



Slika 40: Z virusom SIP tradicionalno okužena območja sveta (obarvano rdeče).



Laboratorijska diagnostika SIP

Sum bolezni postavimo na osnovi kliničnih znakov bolezni: prisotnost vezikul (mehurčki), neješčnost živali, povišana telesna temperatura, vezikule in razjede in pogini, ki se pojavijo pri parkljarjih. Dokončna diagnoza se postavi laboratorijsko, z dokazom virusa.

Odvzem vzorcev:

Optimalen vzorec za ugotavljanje prisotnosti virusa SIP je sloj kože nad mehurčkom. Odvzeti je treba epitel vezikule, površine vsaj 2 cm². Odvzeto steno mehurčka damo v transportni medij, ki je sestavljen iz mešanice glicerina in pufru s pH 7,2 do 7,6 v razmerju 1 : 2 ter dodatkom antibiotika. Posebno pozorni moramo biti na pH, zato je dodan indikator.

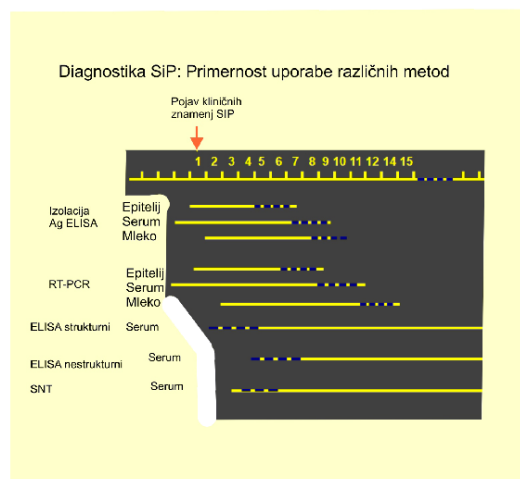
Vsebinsko mehurčka odvezamemo z iglo in brizgalko ter jo v razmerju 1 : 1 pomešamo s transportnim medijem. Pokrov epruvete naknadno ovijemo še s parafilm ovojem.

Epruveto označimo z identifikacijsko številko vzorca, jo ovijemo z vato in položimo v drugo epruveto z navojem. Tako zapakiran vzorec potopimo v razkužilo. Ti postopki so potrebni zaradi varnostnih razlogov, da preprečimo prenos okužbe iz okuženih v neokužena območja..

Bolnim in sumljivim živalim odvezamemo tudi vzorec krvi z antikoagulantom. Kot antikoagulant uporabimo raztopino EDTA (30 mg EDTA/ml), odnosno uporabimo epruvete vakuteiner z antikoagulantom. Vzorec shranimo v posodo z ledom, površino pa razkužimo.

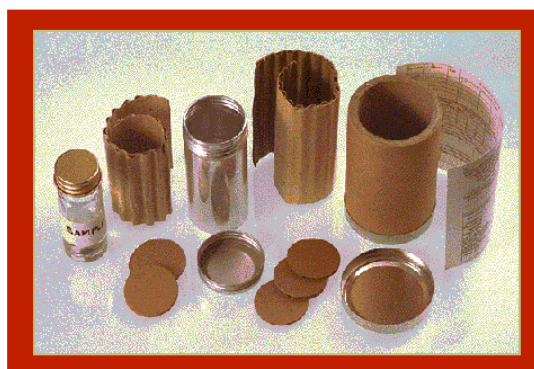
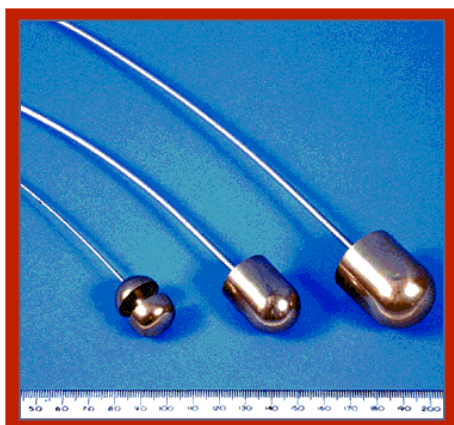
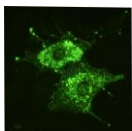
Odvzamemo tudi vzorec nativne krvi za potrebe dokazovanja specifičnih protiteles proti virusu SIP. Za potrebe diagnostike odvezamemo tudi vzorec mleka bolne ali sumljive živali. Vzorec damo v primerno epruveto, ki dobro tesni, jo potopimo v razkužilo in damo v še eno posodo, jo zatesnimo in zunanost razkužimo.

Diagnostiko slinavke in parkljevke smemo izvajati le v posebnih, ustrezno varovanih laboratorijih, v katerih zaradi sistema filtracije zraka, okolja z znižanim podtlakom in sistemom sterilizacije odplak in odpadkov lahko preprečimo varno delo brez nevarnosti kontaminacije okolice.



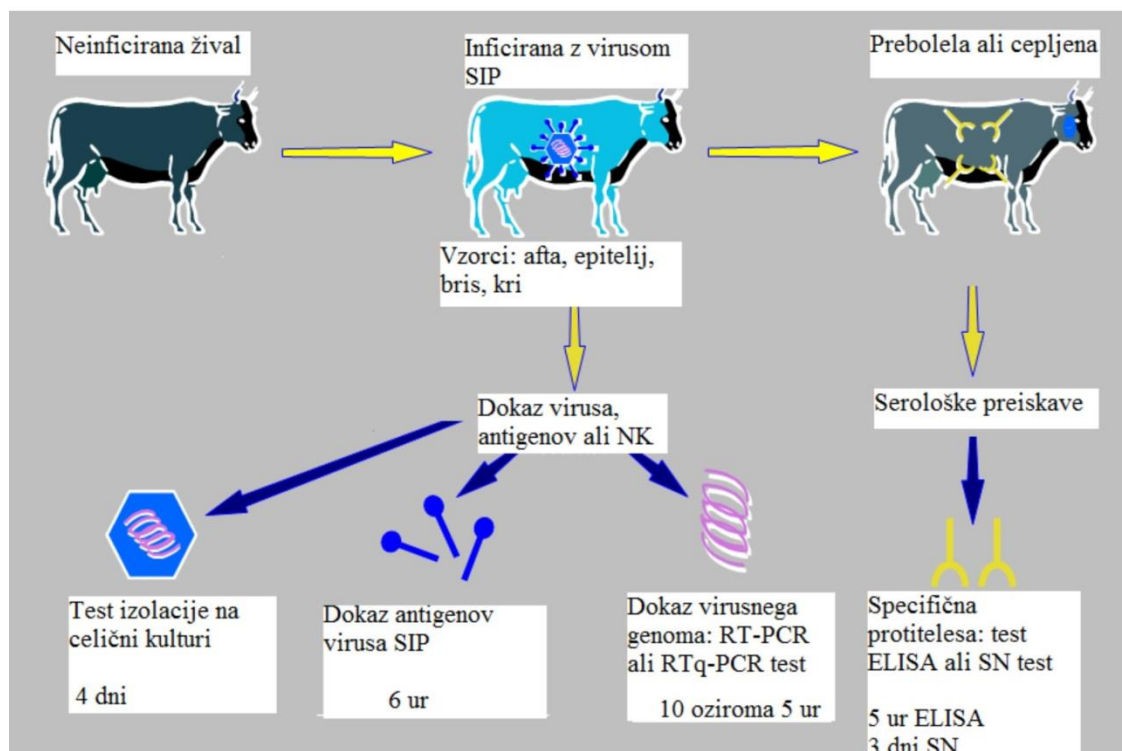
Slika 41: Prikaz vrednotenja posameznih diagnostičnih metod v razmerju od časa okužbe do odvzema vzorcev za preiskavo.

Odvzem probang vzorcev je zanimiv zlasti v primerih, ko vzorcev iz mehurčastih izpuščavev (aft) ni mogoče dobiti ali pa pri ugotavljanju perzistentno okuženih živali. Vzorčimo s čašo, pritrjeno na žici, premera 3 cm in globine 5 cm. Probang uvedemo skozi ustno odprtino do faringealnega področja, postrgamo, da na ta način pridobimo sluz, epitelne celice in slino. Zajeti vzorec prenesemo v gojišče za celično kulturo in ga do laboratorija hranimo v posodi z ledom.



Slika 42: Zajemalke za odvzem probang vzorca za govedo, ovce in koze.

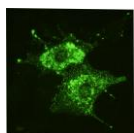
VZOREC
(stena mehurčka, kri, mleko, faringealni bris, Probang vzorec)



Slika 43: Potek diagnostičnih preiskav.

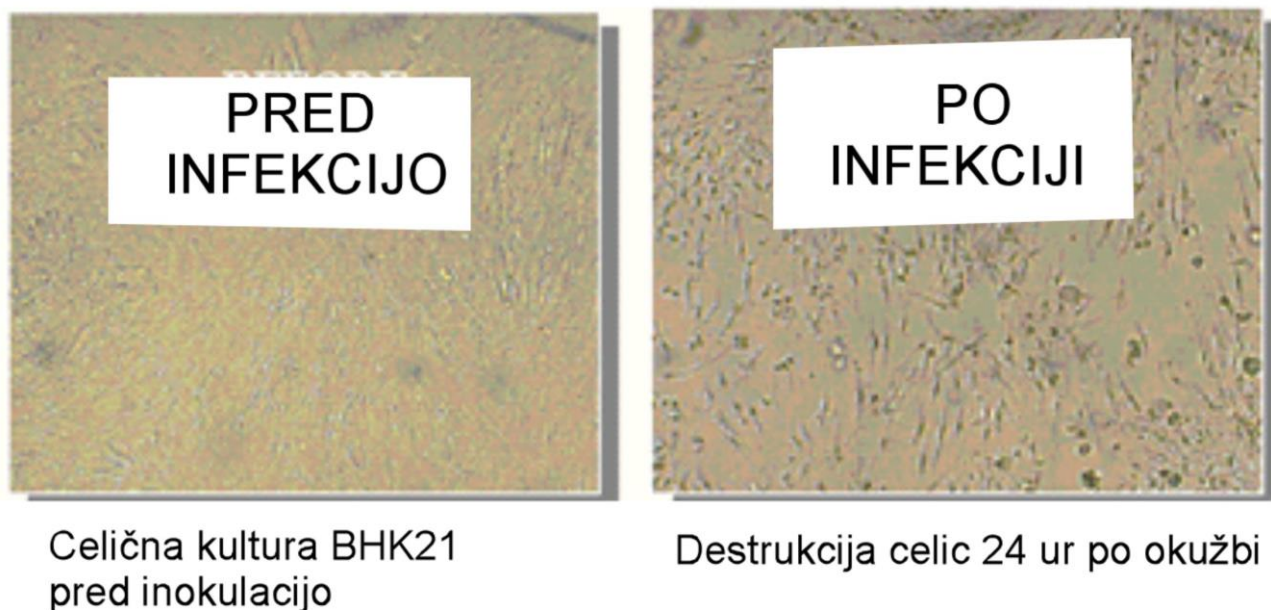
Izolacija virusa na celični kulturi:

Košček epitela razrežemo, v tarlnici zdrobimo in resuspendiramo v gojišču za celično kulturo. Suspenzijo centrifugiramo, supernatant filtriramo, da odstranimo bakterije, in ga inokuliramo na predhodno narasel celični sloj. Uporabimo celice BHK (angl. *baby hamster kidney*) ali primarne celice goveje tireoide. Inokulum pustimo stati na celičnem sloju od 30 do 60 minut, da se virusni



Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine

partikli vežejo na celične receptorje, vzorec odlijemo in dodamo gojišče za celično kulturo. Če je v vzorcu prisoten virus SIP, bo v roku od 24 do 48 ur povzročil citopatski efekt. Izolat determiniramo v testu ELISA ali z metodo RT-PCR.

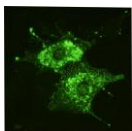


Slika 44: Prikaz neinficirane in inficirane celične kulture.

Indirektni sendvič test ELISA za dokaz virusnega antigena

Encimsko imunski testi danes predstavljajo serološko metodo, ki se pogosto uporablja za določanje virusnih antigenov ali protiteles proti določenemu virusu. V diagnostiki SIP se danes uporablja indirektni sendvič test ELISA. Na mikroplošče vežemo specifična protitelesa kunčjega izvora proti posameznemu serotipu virusa SIP ter inkubiramo čez noč na 4 °C ali 1 uro pri 37 °C, nato ploščo speremo s fosfatnim puftom. Vnesemo preiskovane vzorce (vsebina afte, suspenzija epitela afte, serum, mleko ...) in kontrolne poznane pozitivne in negativne vzorce, inkubiramo 1 uro na 37 °C ter nato ploščo ponovno speremo. Sledi faza inkubacije specifičnih protiteles proti posameznemu tipu SIP budrinega izvora, inkubiramo, dodamo anti-budrin konjugat, inkubiramo, speremo in dodamo substrat. Če je v vzorcu prisoten virus SIP določenega tipa se substrat v tisti jamici obarva.

Test ELISA je manj občutljiv v primerjavi s testom izolacije virusa ali metodo RT-PCR, zato je pogosto treba virus najprej namnožiti.

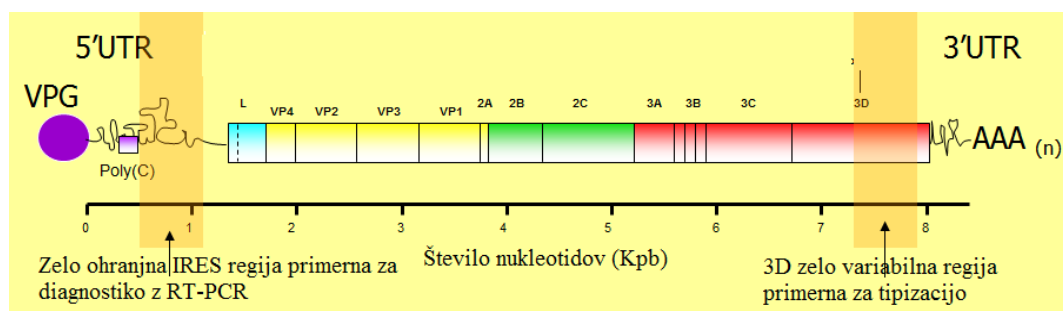


Slika 45: Prikaz sheme indirektnega sendvič testa ELISA za dokazovanje in tipizacijo virusa SIP.

Test RT-PCR

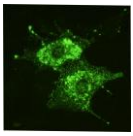
Metoda verižne reakcije s polimerazoe (PCR) je neposredno dokazovanje virusne nukleinske kisline v preiskovanem vzorcu. Glede na to, da vsebuje virus SIP pozitivno orientirano RNA, je treba po ekstrakciji virusne RNA le-to najprej prepisati v cDNA (angl. *complementary DNA*) in šele nato se lahko pomnožimo.

Pikornaviridae vsebujejo enovijačno pozitivno orientirano RNA, ki jo lahko ekstrahiramo s fenolom. RNA se nahaja v vodni fazi, beljakovine v fenolni. RNA je izjemno občutljiva na ribonukleaze RNA-ze, ki genom razgradijo, zato se je treba izogibati kontaminaciji z RNA-zami. V intaktnem virionu RNA ščiti kapsida. Po separaciji s centrifugiranjem dobimo RNA v vodni fazi, fenol pa zavržemo. Za izvedbo testa potrebujemo ekstrahirano molekulo RNA, ki jo najprej z reverzno transkriptazo prepišemo v cDNA. Ta proces imenujemo reverzna transkripcija (RT), od tod tudi ime metode RT-PCR. Pri izvedbi RT-PCR potrebujemo še dva začetna nukleotida, ki se po denaturaciji pripeneta na tarčno verigo molekule DNA. S tem omejimo segment, ki ga želimo pomnožiti.



Slika 46: Odsek genoma (regija IRES), primeren za določanje prisotnosti virusnega genoma v preiskovanem vzorcu, in variabilni del genoma na genu za polimerazo (regija 3D), primeren za genotipizacijo izolatov z metodo sekvencioniranja.

Reakcijski mešanici dodamo še deoksiribonukleotid fosfate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in termostabilno polimerazo DNA, katere naloga je pripenjanje dNTP-jev v smeri 5' proti 3' od enega do drugega izbranega začetnega oligonukleotida. Reakcija poteka v termostatiranem pomnoževalniku v treh ponavljajočih se ciklih: denaturacija osnovne molekule cDNA, pripenjanje začetnih oligonukleotidov na komplementarni del verige in sinteza nove verige DNA. Če je v preiskovanem vzorcu prisotna nukleinska kislina virusa SIP, ki je komplementarna začetnim



nukleotidom, se bo segment nukleinske kisline pomnožil do take mere, da lahko produkt reakcije dokažemo z elektroforezo v agaroznem gelu.

Primer epizootije izbruha SIP v Angliji leta 2001

Zadnji obsežen izbruh SIP Evropi se je pojavil leta 2001 v Angliji, ki je zahteval smrt 8 milijonov parkljev. Podtip serotipa O SIP (zdaj ga imenujejo tip PanAsia) je bil najprej izoliran 1990 v severni Indiji. Kasneje se je razširil v Savdovo Arabijo, najverjetneje s trgovino z živimi živalmi (ovce, koze). Leta 1996 je dosegel Turčijo (Samuel, 1997) in se od tod razširil v Bolgarijo in Grčijo. V naslednjih letih smo zasledili izbruhe z istim serotipom v Iranu, Iraku, Siriji, Izraelu, Libanonu in Jordaniji.

Širjenje virusa PanAsia proti vzhodu je manj jasno. V letih 1993–1994 je bil potrjen v Nepal, 1998 v državi Butan, 1999 na Kitajskem (provinca Hainan in Tibet). Virus je bil prav tako potrjen v Vietnamu, Kambodži, Tajvanu, Maleziji in Laosu. V marcu 2000 se je virus PanAsia pojavil v Južni Koreji in na Japonskem. Obe državi sta bili dolgo prosti bolezni (Južna Koreja od 1934, Japonska pa celo od 1908). Isti serotip je prav tako povzročil izbruh SIP v Južni Afriki blizu Durban. Domnevajo, da je izbruh SIP povzročilo krmljenje s pomijami z ladje, ki je prispela iz Azije. Posledica izbruhov SIP v omenjenih državah je bila enormna ekonomska škoda ter prepoved izvoza živih živali in živil živalskega izvora. Zaradi boljšega razumevanja hitrosti širjenja te kužne bolezni bomo opisali primer iz Anglije.

19. februarja 2001 so v referenčnem laboratoriju v Pirbrightu potrdili prisotnost virusa SIP, serotip O, v vzorcih, ki so bili vzeti ob sumu na SIP v klavnici v Essexu (južna Anglija). Kasnejša sekvenčna analiza celotnega gena VP1, izoliranega virusa in primerjava s sekvencami zadnjih izbruhov po svetu je potrdila, da je izbruh SIP v Veliki Britaniji povzročen s serotipom O PanAsia. Poznavanje bolezni in proučevanje izbruhov v preteklosti je pokazalo, da je najuspešnejše zatiranje izbruhov "stamping out", to je takojšnje pobijanje vseh obolelih živali in živali, ki so bile kakor koli v stiku z obolelimi, ter neškodljivo odstranjevanje s sežiganjem in zakopavanjem trupel. Vsi okuženi hlevi in oprema se po odstranitvi živali razkužijo ali uničijo. S prepovedjo gibanja na okuženih in ogroženih območjih se širjenje virusa prepreči.

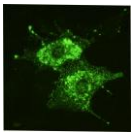
Prvi teden:

Po potrditvi prvega primera v Essexu je bilo v prvem tednu potrjenih še 11 izbruhov, skupaj 12. Izbruhi so bili potrjeni na petih lokacijah na severnem in južnem delu države. Pobite so bile vse dovzetne živali v okuženih rejah, kakor tudi reje, ki so bile v stiku z okuženimi rejami. Trupla so neškodljivo odstranili s sežiganjem na bližnji kmetij. Na okuženih območjih so se izvajali preventivni ukrepi za preprečitev širjenja virusa (prepoved prometa, razkuževanje ...). Po vsej državi je bila povečana pripravljenost na morebitne nove izbruhe SIP.

Drugi teden:

Virus je bil v drugem tednu potrjen v 73 novih izbruhih, skupno število izbruhov je doseglo število 85. Izbruhi so bili potrjeni na 18 različnih lokacijah, razpršenih po vsej državi, kar kaže na to, da se je virus razširil s prevozom okuženih živali že pred potrjenim prvim izbruhom. Nadaljevali so s programom "stamping out" in vsemi drugimi aktivnostmi za preprečitev nadaljnega širjenja. Potrjeni so bili tudi prvi primeri izbruha SIP na jugu Škotske. Številne evropske države so reagirale z zaščitnimi preventivnimi ukrepi, ki bi preprečili širitev virusa.

Tretji teden:



V tretjem tednu so potrdili 120 novih primerov. Skupno število izbruhov je naraslo na 205. Število na novo okuženih rej je naraščalo z dneva v dan. Posebej zaskrbljujoča so poročila, da se pojavljajo novi primeri okužb, ki so oddaljeni od prejšnjih izbruhov. Strokovnjaki so se bali, da se virus širi z vetrom. V Devonu so potrdili izbruhe na sedmih kmetijah, ki niso imele nobenih stikov z okuženimi rejami. Vremenske razmere tretjega tedna so bile idealne širitev virusa, saj je bilo hladno in vetrovno z občasnim dežjem.

Več kot 1000 kmetijam so izdali prepoved gibanja oziroma premikanja živali, opreme in ljudi. Pobitih je bilo že 115.000 živali. Za prevoz trupel so začeli uporabljati posebej prirejene tovornjake, ki odvažajo trupla na skupna mesta za sežiganje. Začele so se uresničevati najbolj črne napovedi o poteku izbruha. Na vlado so se začeli pritiskati turistični delavci, ki so imeli zaradi ukrepov izbruha SIP na okuženih območjih 75-odstotni padec števila gostov, kar je pomenilo 100 milijonov funtov izgube tedensko. Pojavljati so se začeli tudi problemi rednih povezav z avtobusnimi in železniškimi linijami na teh območjih. 13. marca so uvedli dodatne ukrepe o prepovedi vsakršnega gibanja v obsegu 3 kilometrov od izbruhov. Poseben problem se je pojavil, ker je bila večina ovc na koncu brejosti, nekatere pa so med tem že začele jagnjiti. Na 122 kmetijah so preventivno pobili vse dovzetne živali, ker so bile v stiku z okuženimi rejami. Pojavili sta se dve najbolj okuženi območji v Devonu in Cumbriji. Na teh dveh območjih je bilo potrjeno več kot polovica vseh novih primerov. V Devonu so potrdili okužbo na farmi s 700 prašiči.

Četrty teden:

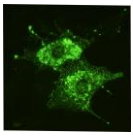
Število novih primerov je še naprej strmo naraščalo in se je v tem tednu skoraj podvojilo. Skupno število izbruhov je tako naraslo na 349. Potrjen je bil tudi prvi primer v Franciji, kjer so preventivno pobili vseh 20.000 uvoženih živali takoj po potrditvi izbruha v Veliki Britaniji. Prvi primer so potrdili tudi na Irskem. MAFF je uvedel nove ukrepe preventivnega pobijanja vseh dovzetnih živali v trikilometrskem pasu okrog okuženih kmetij. Tako je dnevno pobitih že 50.000 živali. Številni lastniki živali in drugi ljudje so nasprotovali pobijanju zdravih živali v trikilometrskem pasu, vendar so strokovnjaki zatrjevali, da je to edini in najbolj učinkovit ukrep, da zaščitijo še neokužene reje. Govori se tudi o možnosti preventivne vakcinacije, vendar je to po zagotovilih ministra zadnja možnost, ki jo bodo uporabili, če bo to potrebno.

Peti teden:

V petem tednu je število izbruhov naraslo na 693. Samo v tem tednu so ugotovili 344 novih primerov. Največje število novih primerov v enem samem dnevu je bilo 47. Novi primeri so pomenili, da se je epidemija še širila. Zdaj je že bilo jasno, da bo ta izbruh SIP povzročil pravo katastrofo. Pri najbolj črni napovedi prof. Davida Kinga, bi izbruh SIP lahko terjal polovico od 62-milijonske črede parkljarjev. Nadaljevalo se je pobijanje vseh parkljarjev znotraj trikilometrskega pasa. Uvedeni so bili novi ukrepi. Ustanovljena je bila posebna skupina, ki je skrbela, da so bile vse živali pobite v roku 24 ur po potrditvi virusa in 48 ur v trikilometrskem pasu ter da so bila trupla takoj odstranjena. Za pomoč pri nadzoru epidemije je bila 24. marca vpoklicana tudi vojska. 400 vojakov je skrbelo za logistiko in koordinacijo med različnimi resorji. Epidemija je že presegla zadnji večji izbruh SIP v Veliki Britaniji leta 1967, ko so za eradikacijo pobili 433.987 živali. Številke pobitih živali so v tem tednu dosegle 570.000, več sto tisoč živali pa je še čakalo na usmrtitev. Trupla so sežigali v velikih skupnih grobnicah.

Šesti teden:

Deževno in vetrovno vreme se je še naprej nadaljevalo in poslabšalo situacijo. Največji problemi so se pojavili v Cumbriji in Devonu, ki sta bili najbolj prizadeti območji. Samo v Cumbriji je čakalo na usmrtitev 131.000 živali, ki so bile v nevarnem kontaktu z okuženimi živalmi, in 300.000 živali v trikilometrskem pasu. Na novo okuženih rej je bilo v tem tednu 288, skupno število pa je naraslo na 991. Na številnih okuženih območjih so dosegli usmrtitev okuženih žvali znotraj 24 ur, vendar še ne na najbolj okuženem območju v Cumbriji.



Ponovno so se pojavile nove razprave o uporabi vakcine na najbolj ogroženih območjih v Cumbriji in Devonu. Cilj vakcinacije bi bila zaščita neokuženih govejih in prašičjih rej. Vendar so tudi negativne strani uporabe vakcine, med drugim daljše časovno obdobje za doseganje statusa »država prosta bolezni«. Vakcinacija ni 100-odstotna in cepljene živali bi morale prav tako kasneje pobiti. Vakcinacija bi vzela dodatno nekaj tednov, preden bi cepili vse živali, in še nekaj dni, preden bi živali postale imune. Poleg tega bi bili to dodatni stroški in preusmeritev številnih veterinarjev, ki so jih nujno potrebovali pri eradikaciji bolezni. Za primer vakcinacije je bilo pripravljenih 22 milijonov doz cepiva za vseh sedem tipov virusa SIP. Odločitev o vakcinaciji zato še zdaleč ni bila preprosta. O uporabi vakcine odloča minister za kmetijstvo. Proti koncu tedna se je število novih izbruhov v enem dnevu začelo počasi zmanjševati.

Na jugu Škotske je bilo potrjenih 88 izbruhov. Pobili so več kot 250.000 živali, pretežno ovac.

Število pobitih živali je v šestem tednu preseglo 1 milijon, kar je 1,8 % črede, okrog 400.000 jih je še čakalo na usmrnitev. Število izbruhov je naraslo za 173, skupno število je doseglo 1164. Število dnevniških izbruhov se je gibalo od 25 do 30, kar je pomenilo, da je striktno izvajanje »stamping out« znotraj 24 ur začelo prinašati prve izboljšave. V eradikaciji je sodelovalo 1458 veterinarjev, 315 ljudi, ki so izvajali usmrčitve živali, in 1750 drugih sodelavcev, ki so pomagali pri nadzoru epidemije. Po najbolj optimističnih napovedih bi lahko bolezen izkoreninili do junija.

Osmi teden:

Nadaljeval se je program eradikacije bolezni na vseh okuženih območjih. Epidemija se je počasi umirjala, čeprav so tudi v osmem tednu še vedno dnevno ugotovili po 20 novih izbruhov SIP. Ukrepi »stamping out«, odstranjevanje in sežiganje trupel so obrodili prve sadove. Vendar je do končne eradikacije tega izbruha bila še dolga pot. Posebej zaskrbljujoči so bili primeri novih izbruhov na neokuženih območjih, ki so bili od okuženih rej oddaljeni tudi po 30 km in več. Poseben problem so predstavljale ilegalne selitve živali, ki so jih izvedli rejci, kljub prepovedi, da bi rešili svoje živali. Dokazali so tudi prve zlorabe z uporabo vrele vode in namerno okužbo živali. Vse bolj številni so bili pritiski kmetov, ker jim je zmanjkovalo hrane in ker so jim zaradi nemogočih razmer po prepovedi gibanja živali umirale za ogradami. Kmetje so bili obupani, saj je ta agonija trajala že osem tednov. Želeli so si le, da bi se čim prej vse končalo in da bi lahko kupili nove živali in začeli na novo. Število usmrčenih živali je v tem tednu doseglo 1,5 milijona živali, več sto tisoč so jih usmrtili še v naslednjih dneh.

Izkoreninjanje SIP v Angliji je potekalo do konca leta 2001. Usmrtili so nad 8 milijonov parkljarjev. Leta 2007 je prišlo ponovno do izbruha SIP v Angliji. Ob velikih poplavah je voda zalila tudi sistem dekontaminacije odplak v referenčnem laboratoriju za SIP v Pirbrightu. Do izbruha je prišlo nekaj tednov po poplavah na dveh farmah, ne daleč od laboratorija. S sekvenčno analizo izoliranega virusa so potrdili, da gre za laboratorijski sev. Izbruh bolezni so omejili na ozko področje in bolezen izkoreninili.

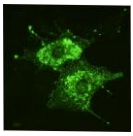
Konec decembra 2010 so v Bolgariji ob meji s Turčijo uplenili divjega prašiča, ki je bil pozitiven na virus SIP. Na istem področju so odkrili 37 pozitivnih govedi.

V Sloveniji je bil zadnji izbruh SIP ugotovljen leta 1968.

Rod *Enterovirus*

Enterovirusi so ubikvitarni in prisotni pri večini živalskih vrstah. Za veterinarsko medicino sta pomembni dve vrsti pri prašičih: virus vezikularne bolezni prašičev in virus teschenske bolezni.

Vrsta: Virus vezikularne bolezni prašičev (angl. *Swine vesicular disease virus*)



Bolezen je bila prvič ugotovljena v Italiji leta 1966. Klinična slika bolezni je močno podobna slinavki in parkljevki, s tem, da za to boleznijo obolevajo le prašiči. Pojavijo se izpuščaji in lezije po sluznicah, razvije se tudi encefalitis, ataksija. Prašiči se običajno okužijo s kontaktom ali okuženo hrano (pomije). Vstopno mesto virusa so sluznice ali koža. Bolezen je diferencialno diagnostično s SIP zelo pomembna. V diagnostiki se uporablja test ELISA, test RT-PCR ali izolacija virusa na celični kulturi. Bolezen je potencialna zoonoza in v Sloveniji še ni bila potrjena. Ker okužba ne povzroča večjih ekonomskih škod je pa pomembna diferencialno diagnostično, ker so klinična znamenja bolezni močno podobna slinavki in parkljevki. V Sloveniji te bolezni nismo nikoli ugotovili.

Vrsta: Virus teschenske bolezni

Virus so uvrstili v rod *Teschovirus*. Bolezen se kaže v encefalitisu, nekoordinirani hoji, paralizi facialne miškulature, izgubi glasu in smrtnosti, ki je do 75-odstotna. Virus je po antigenski zgradbi močno podoben humanemu poliovirusu. Povzročitelj je prašičji enterovirus 1. Virus se namnoži v prebavnem traktu, limfnih vozlih, sledi viremija in encefalitis. Teschensko bolezen so v Sloveniji izkoreninili v 70. letih prejšnjega stoletja.

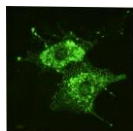
Vrsta: Virus encefalomyelitisa perutnine (angl. *Avian encephalomyelitis virus*)

Uvrščen je v rod *Tremovirus*. Za bolezen so najbolj dovzetni nekaj dni stari piščanci, obolevajo piščanci do 21. dne starosti, ne pa tudi starejši. Povzročča do 50-odstotno smrtnost. Klinično se bolezen kaže v tremorju, encefalitisu, paralizi, izgubi teže, smrti.

Diagnostika: izolacija virusa v embrioniranih jajcih in determinacija v testu IF, test RT-PCR ali nevtralizacijski test.

Dodatni študijski viri:

- Muroga N, Hayama Y, Yamamoto T, Kurogi A, Tsuda T, Tsutsui T. The 2010 foot-and-mouth disease epidemic in Japan. *J Vet Med Sci*. 2012 Apr;74(4):399-404. Epub 2011 Nov 11. Review.
- Ma LN, Zhang J, Chen HT, Zhou JH, Ding YZ, Liu YS. An overview on ELISA techniques for FMD. *Virology*. 2011 Sep 4;8:419. doi: 10.1186/1743-422X-8-419. Review.



7

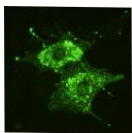
FLAVIVIRIDAE**Splošne lastnosti in klasifikacija Flavivirusov**

Za veliko vrst virusov, uvrščenih v družino *Flaviviridae*, je značilen prenos okužbe z vektorji, kot so klopi, komarji, v katerih se tudi aktivno pomnožujejo.

V družino *Flaviviridae* so uvrščeni trije rodovi; rod *Flavivirus*, rod *Pestivirus* in rod *Hepacivirus*. V rod *Flavivirus* je uvrščenih več kot 70 različnih vrst virusov, za nas so pomembni le nekateri: virus rumene mrzlice, virus japonskega encefalitisa, virus avstralskega encefalitisa, virus bolezni zahodnega Nila (angl. *West Nile virus*), virus klopnega encefalitisa in louping ill virus pri ovcah. Vmesni gostitelji in prenašalci virusov iz tega rodu so artropodi, komarji iz rodu *Culex sp.*, mušice iz rodu *Aedes sp.* in klopi (*Ixodes sp.*). Življenjski krog večine virusov tega rodu je vezan na prenos med sesalci in artropodi.

V rod *pestivirus* so uvrščeni virusi *Goveje virusne diareje 1 in 2* (BVD 1 in BVD 2), virus *borderške bolezni ovac* (BD) in *virus klasične prašičje kuge*, v rod *Hepacivirus* pa je uvrščen humani virus hepatitisa C. Razvrstitev flavivirusov temelji na podobnosti genoma in antigenski sorodnosti virusov.

Rod/Vrsta	Gostitelji/vektorji	Simptomi
FLAVIVIRUS		
<i>Japanese encephalitis virus</i> (Slo.: <i>Virus japonskega encefalomyelitisa</i>)	Ptice, prašiči, konji, človek/ <i>Culex sp.</i>	abortusi, encefalitis
<i>Murray Valley encephalitis virus</i> (Slo. <i>Virus encefalitisa doline Murray</i>)	Ptice, človek/ <i>Culex sp.</i>	encefalitis
<i>Dengue virus</i> (Slo. <i>Denge virus</i>)	primati, človek/ <i>Aedes sp.</i>	hemoragije, povišana telesna temperatura
<i>St. Louis encephalitis virus</i> (Slo. <i>Virus encefalitisa St. Louis</i>)	ptice, človek/ <i>Culex sp.</i>	encefalitis
<i>Tick borne encephalitis virus</i> (Slo.: <i>Virus klopnega meningoencefalitisa</i>)	ptice, prežvekovalci, glodalci, človek/ <i>Ixodes sp.</i>	encefalitis
<i>Yellow fever virus</i> (<i>Virus rumene mrzlice</i>)	primati, človek/ <i>Culex sp.</i>	encefalitis
<i>West Nile virus</i> (Slo.: <i>Virus mrzlice West Nile</i>)	ptice, konji, človek/ <i>Culex sp.</i>	encefalomyelitis, povišana telesna temperatura
<i>Louping ill virus</i> (Slo. <i>Virus louping ill</i>)	ovce, konji, človek/ <i>Ixodes ricinus</i>	encefalitis
PESTIVIRUS		
<i>Border disease virus</i> (Slo.: <i>Virus borderjeve bolezni</i>)	ovce	abortusi
<i>Bovine diarrhoea virus 1</i> (Slo.: <i>Virus goveje virusne diareje, BVD virus</i>)	govedo	abortusi, diareja
<i>Bovine diarrhoea virus 2</i>	govedo	abortusi, diareja
<i>Classical swine fever virus</i> (Slo.: <i>Virus klasične prašičje kuge</i>)	prašič	sistemsko obolenje



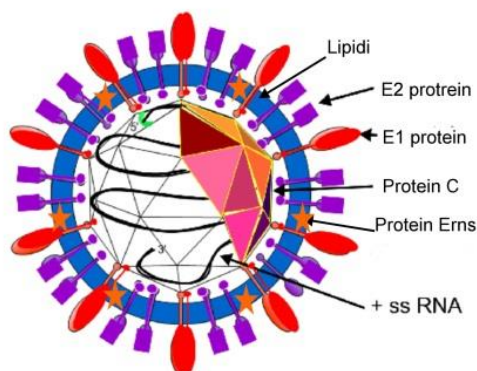
Preglednica 7: Klasifikacija virusov v družini *Flaviviridae* pomembnih za veterinarsko medicino

V rod *Pestivirus* spadajo tri za veterinarsko medicino pomembne vrste, virus goveje virusne diareje (BVD), virus borderjeve bolezni ovac in virus klasične prašičje kuge (KPK). Te vrste so si med seboj zelo sorodne tako na genetskem kot antigenskem nivoju. Virus BVD lahko povzroča navzkrižne okužbe med posameznimi živalskimi vrstami, tako da se z virusom bovine diareje lahko okužijo tudi prašiči ali ovce.

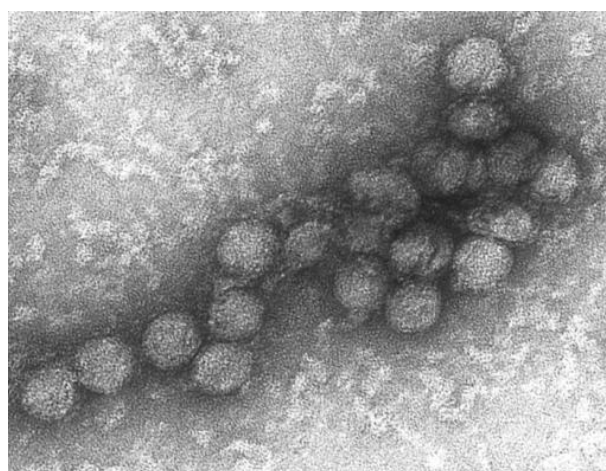
Virus je stabilen v mediju s pH 8, hitro pa ga inaktivira medij s pH pod 5 kot tudi temperatura nad 40 °C in UV svetloba.

Virusi iz rodu *Flavivirus* se od rodu *Pestivirus* razlikujejo v gostiteljih, razlike pa najdemo tudi v strukturi genoma. Virusi iz rodu *Flavivirus* imajo na 5' koncu nekodirajočo metilgvanidinsko regijo (kapa), virusi iz rodu *Pestivirus* imajo dve posebnosti, na 5' koncu se nahaja gen za nestrukturni protein N^{pro}, genom pa sestavljajo še štirje geni za strukturne proteine (proteina C in proteini E^{ms}, E1 in E2). Genom vsebuje še sedem ali osem genov za nestrukturne proteine. Genom virusov vseh treh rodov je podobno organiziran, vsebuje en bralni okvir. Strukturni in nestrukturni proteini se aktivirajo z razcepom poliproteina. Sinteza virusne RNA poteka v citoplazmi, virusi so zgrajeni v intracelularni membrani, virusni partikli pa izstopajo iz celice po principu eksocitoze.

Zgradba flavivirusov

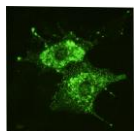


Slika 47: Prikaz zgradbe pestivirusa.



Slika 48: Prikaz virusa BVD z elektronskim mikroskopom
(http://hardinmd.lib.uiowa.edu/pictures22/cdc/PHIL_2290_lores.jpg).

Virusi iz družine *Flaviviridae* spadajo med manjše viruse, so okroglaste oblike s premerom med 40 in 60 nm in imajo lipoproteinski plašč. Flavivirusi vsebujejo tri strukturne proteine, protein C (angl. *capsid protein*), E (angl. *envelope*) in M (angl. *mature*), pestivirusi pa štiri: C, E^{ms}, E1 in E2. Lipidi predstavljajo do 17 % teže virusa, sladkorji v obliki glikolipidov in glikoproteinov pa 9 % teže. Nukleokapsida je ikozaedralne oblike, pod elektronskim mikroskopom so na površini ovojnice vidni izrastki. Protein C je sestavni element nukleokapside in ščiti virusno RNA. Protein E1 je transmembrani protein, sega vse od nukleokapside, tvori plašč virusa, molekula proteina E pa štrli iz površine virusa in ima RNA-zno aktivnost. Protein E2 je nujno potreben za vezavo virusa na celico gostiteljico, je prav tako transmembrani protein in kot močan antigen sproži nastanek specifičnih protiteles. Poznanih je več nestrukturnih proteinov. Gen za nestrukturni protein N^{pro} se nahaja

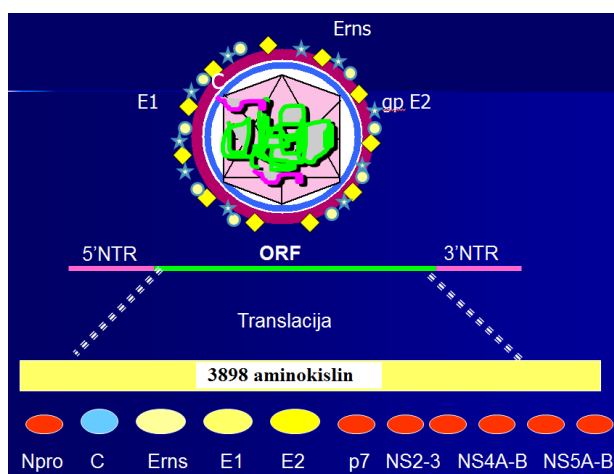


Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine

neposredno na 5' (nekodirajoča regija) koncu verige. Protein N^{pro} deluje proteolitično. Nestrukturni protein P7 se pojavlja le v fazi razmnoževanja virusa, protein NS2-3 ima encimsko aktivnost, sodeluje pri regulaciji virusne replikacije, protein NS5 ima polimerazno aktivnost in nastopa kot od RNA odvisna polimeraza RNA in je aktivna ob prepisovanju virusne RNA.

Genoma virusov v družini *Flaviviridae*

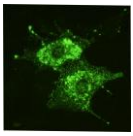
Genom predstavlja pozitivno polarna enovijačna RNA, velikosti 12,5 kbp pri rodu *Pestivirus* in 11 kbp pri vrstah iz rodu *Flavivirus*. Virusna RNA je infektivna. Virusni genom pestivirusov vsebuje bralni okvir za poliprotein, na 5' in 3' koncu je nekodirajoča regija, dolžine od 200 do 390 baz. Na 3' koncu se nahaja še kratek poli C rep. Geni za strukturne proteine se nahajajo bliže 5' konca, nato pa sledijo geni za nestrukturne proteine. Na obeh koncih verige se nahaja nekodirajoča regija. Virusna RNA ima na 5' koncu značilno strukturo, gre za nekodirajočo regijo, ki služi kot prepoznavno mesto za celične ribosome, kar omogoča začetek sinteze virusnih proteinov. Pestivirusi z razliko od flavivirusov nimajo značilnega poliadenilacijskega 3' konca, ki v evkariontski celici omogoča prenos mRNA skozi jedrne pore. Genom rodu *flavivirus* nima nekodirajoče regije IRES, je pa prisotna pri ostalih rodovih. Genom kodira 3 strukturne proteine (C, E, prE) pri flavivirusih in 4 pri pestivirusih ter 7 ali 8 nestrukturnih proteinov. Pestivirusi imajo edinstven gen za nestrukturni protein z oznako N^{pro}. Na podlagi nukleotidnega zaporedja te regije lahko razlikujemo posamezne vrste znotraj rodu pestivirusov med seboj: virus bovine diareje 1 in 2, virus klasične prašičje kuge in virus borderjeve bolezni.



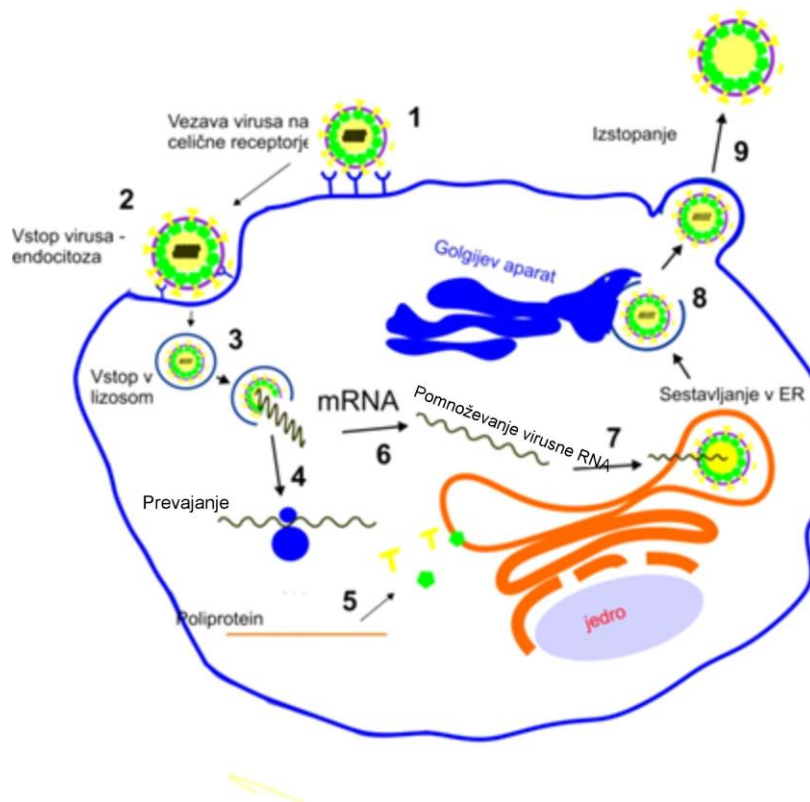
Slika 49: Zgradba genoma pestivirusov.

Pomnoževanje virusa

Za vezavo virusa na celico gostiteljico je odgovoren virusni protein E2 in E^{ms}, celični receptorji pa še niso povsem poznani. Menijo, da pri virusu BVD nastopa kot receptor celični protein CD46. Virus vstopi v celico po principu endocitoze in endosomske fuzije, tako da se celična membrana na mestu vezave uviha, nastane mehurček, ki se v citoplazmi spoji z lizosomom. Nizek pH sproži konformacijo proteina E, stena vezikla razpade, tako da se virus sprosti v citoplazmo. Sledi slačenje virusa, proteolitični encimi razgradijo plašč virusa in kapsido, tako da se virusna RNA sprosti v citoplazmo celice. Virusna RNA se z regijo IRES na 5' koncu pripne na ribosom in začne se prevajanje virusne RNA. Nastane enoten poliprotein, ki ga nato cepijo celične in virusne proteaze. Ko nastane dovolj virusne polimeraze RNA (nestrukturni protein NS5), se sproži sinteza virusne



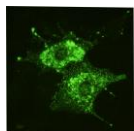
RNA, najprej nastane nova negativno orientirana RNA (cRNA), ki služi kot matrica za nastanek novih virusnih RNA. Sestavljanje virusa poteka v endoplazmatskem retikulumu in tudi v Golgijevem aparatu, kjer se tvori lipoproteinska ovojnica. Zreli virusi se kopičijo v endoplazmatskem retikulumu, se formirajo v mešiček, v mešičku zapustijo endoplazmatski retikulum. Mešiček skupaj z virusi potuje vse do celične membrane, se z njo spoji, tako da virusi izstopijo iz celice po principu eksocitoze.



Slika 50: Prikaz pomnoževanja flavivirusov: (1) vezava virusa na celične receptorje, (2) vstopanje virusa v celico, (3) slačenje virusa v lizosomu in sproščanje virusnega genoma v citoplazmo, (4) translacija na ribosomu, sinteza poliproteina, (5) razrez poliproteina na strukturne in nestrukturne proteine, (6) pomnoževanje virusnega genoma, (7) vezava strukturnih proteinov na endoplazmatski retikulum in uvedba genoma v kapsido, (8) glikolizacija proteinov plašča v Golgijevem aparatu, (9) izstopanje virusa iz celice.

Bolezni, ki jih povzročajo virusi iz rodu *Flavivirus*

V rod *Flavivirus* so uvrščeni virusi, ki se prenašajo iz živali na žival ali iz živali na človeka preko insektov (angl: *mosquito-transmitted flaviviruses*). Primarni vektor za prenos tega virusa je komar *Culex sp.* Razvojni krog poteka po prenosu preko komarjev in prašičev ali komarjev in ptic. Perutnina, prašiči in konji nastopajo kot pomemben rezervoar virusa. Ljudje se okužujejo s pikom okuženih komarjev. V ta rod spadajo naslednje vrste, patogene predvsem za človeka, domače živali nastopajo tu kot rezervoar virusa: Virus japonskega encefalitisa, St. Louis encefalitis virus, virus



encefalitisa Murray Valley, Virus bolezni zahodnega Nila. Obolevajo konji, ovce, psi, perutnina in človek.

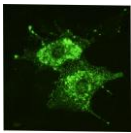
Vrsta: Virus japonskega encefalitisa (angl. *Japanese encephalitis virus*)

Okužbe z virusom japonskega encefalitisa so razširjene zlasti v jugovzhodni Aziji, od Indije, Kitajske, Pacifika do Avstralije. Patogen je zlasti za človeka, pa tudi za prašiče, konje, pse in mačke. Za širjenje virusa so pomembne zlasti ptice, ki pa za okužbo klinično praviloma ne obolevajo. Ljudje in živali se okužujejo preko pikov okuženih komarjev, virus se razmnoži v monocitih in makrofagih ter po krvi potuje do centralnega živčnega sistema. Virus se nato namnoži v nevronih in povzroča njihovo apoptozo. Če se po okužbi pri konju pojavijo nevrološki simptomi; nekoordinirana hoja, tremor in paraliza. Blezen konča s poginom. Primarni vektor prenosa so komarji vrste *Culex tritaeniorhynchus*. Pred obolenjem se je mogoče zaščititi s cepljenjem. Pri živalih v Sloveniji te okužbe še niso ugotovili.

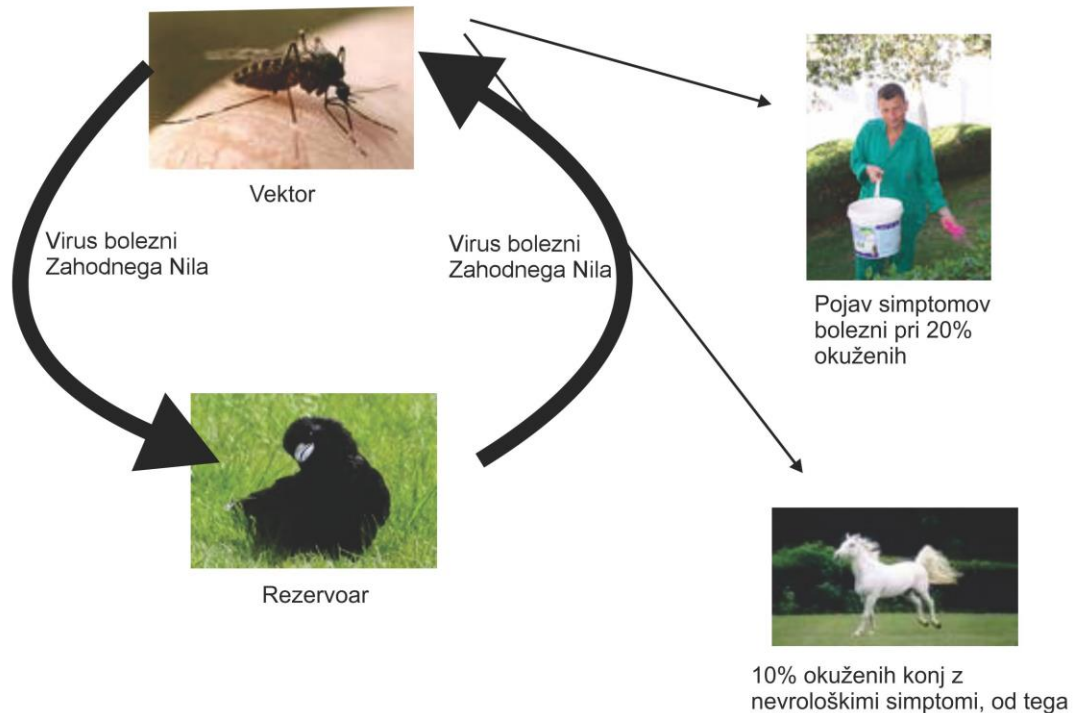
Vrsta: Virus zahodnega Nila (angl. *West Nile virus, WNV*)

Virus WN naj bi izviral iz Afrike, danes pa je razširjen tudi v Evropi, Bližnjem vzhodu, centralni Aziji in obeh Amerikah. S filogenetskimi analizami so odkrili dve liniji virusa zahodnega Nila (WNV), WNV-1, ki je bil ugotovljen v Ameriki, Evropi in Indiji, ter zlasti v Afriki pa je razširjen WNV-2. Najpomembnejši prenašalci virusa so prostoživeče ptice, v krog širjenja pa so vključeni komarji, zlasti *Culex modestus*. Kroženje virusa bolezni zahodnega Nila v naravi teče tako, da se komar hrani na okuženi ptici in virus prenese na drugo ptico ali drugega gostitelja. Ptice, naravno okužene z WNV, praviloma ne kažejo kliničnih znamenj bolezni in ne poginjajo, so pa nosilke virusa. So pa poznane izjeme, saj so v ZDA ugotovili množičen pogin vran zaradi okužbe z virusom WN. Od domačih živali so najbolj dovzetni konji. Bolezen se kaže v obliki encefalitisov. V naravi se ohranja predvsem med pticami, okužbe ljudi so naključne. Pri nekaterih vrstah ptic in konjih je okužba lahko tudi usodna. Okužba človeka neposredno od okuženega konja ni poznana, saj konj vsebuje nizek titer virusa. Tako se tudi komarji okužujejo le preko okuženih ptic, saj je v krvi okuženega konja prenizka koncentracija virusa, ki je potrebna za okužbo. Za okužbo komarja je potrebno do 10^6 infektivnih enot virusa. Širjenje virusa lahko tako spremljamo s testiranjem umrlih ptic. Virus prenašajo komarji rodu *Culex*. V nekem področju se virus ohranja med generacijami komarjev, kjer tudi prezimi. Direktni prenos okužbe brez posredništva komarjev je mogoč le pri pticah, preko iztrebkov ali kontaminiranega mesa. Primarni krog razmnoževanja virusa poteče v epidermalnih karioцитih in langerhansovih celicah. Preko limfatičnega sistema dospe do limfatičnih bezgavk, kjer se namnoži. V fazi viremije dospe do visceralnih organov, vranice, jeter. Infekcijo omejuje interferon tipa I in II, aktivacija CD8⁺ T limfocitov in protitelesa, najprej iz skupine IgM, nato še IgG. Virus lahko preko olfaktornega živčevja prispe do centralnega živčnega sistema, kar ima za posledico nevrološke simptome.

Ocenjujejo, da 80 % okužb pri konjih poteka asimptomatsko. Večina (90 %) klinično izraženih okužb poteka kot približno teden dni trajajoče vročinsko obolenje (t. i. vročica zahodnega Nila) z in generalizirano limfadenopatijo. Prisotni so lahko tudi gastrointestinalni simptomi. Pri 10 % okuženih konj pa se razvije meningoencefalitis in pride pri 10 do 15% do pogina živali. Konji v epidemiološkem smislu ne igrajo pomembne vloge, ker imajo v krvi premajhno količino virusa, da bi okuževali komarje ali človeka, pomembni so le kot indikator bolezni na določenem področju. Okužene živali razvijejo protitelesa proti virusu, kar nam kaže naprsotnost okužbe na določenem področju.



Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine



Slika 51: Razmnoževalni krog virusa zahodnega Nila.

Diagnozo lahko potrdimo s serološkimi testi. Kadar potrdimo protitelesa skupine IgG, moramo za postavitev diagnoze dokazati protitelesa skupine IgM ali štirikraten porast titra omenjenih specifičnih protiteles IgG v vzorcih, odvzetih od 2 do 3 tedne kasneje. Prisotnost virusne nukleinske kisline v vzorcu krvi lahko dokažemo z metodo RT-PCR, vendar le v akutni fazi bolezni. Virus je mogoče razmnoževati na oplojenih kokošjih jajcih pa tudi na celični kulturi insektov, vendar je metoda izolacije v tem primeru manj občutljiva. Protitelesa proti virusu bolezni zahodnega Nila so bila v Sloveniji že dokazana tako pri konjih kot pticah, prisotnost virusa in obolela žival s klinično sliko še ni bila ugotovljena. Živali, ki prebolijo okužbo, so odporne na ponovno okužbo z virusom WN. Uporaba vakcin daje zadovoljivo zaščito.

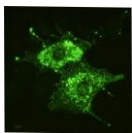
Vrsta: Murray valley encephalitis virus

Virus so ugotovili le v Novi Gvineji in Avstraliji. Njegov razvojni krog je vezan na komarje *Culex annulirostris*.

Vrsta: St. Louis encephalitis virus

Virus je razširjen v Severni in Srednji Ameriki. Povzroča tudi encefalitise pri človeku. Razvojni krog poteka med komarji (*Culex tarsalis*) in pticami.

Vrsta: Virus denge



Virus denga je prisoten v Afriki in južni Aziji. Patogen je za človeka in opice. Razvojni krog poteka v smeri komar–opice/človek–komar. V zadnjih letih se okužba širi tudi na druge celine sveta skupaj s komarji vrste *Aedes aegypti*. Obolenje se kaže v obliki vročičnih stanj in hemoragij.

Vrsta: Virus rumene mrzlice (angl. *Yellow fever virus*)

Rumena mrzlica je zoonoza. Je bolezen tropskega in subtropskega področja. Prenašajo jo insekti, za njo pa obolevajo tudi ljudje in opice. V primeru potovanja v kraje, v katerih se rumena mrzlica pojavlja, je potrebno predhodno cepljenje. Virus vstopi v organizem ob piku insekta in se namnoži v celicah kože. Z makrofagi, v katerih se ravno tako razmnožuje, se raznese po krvnem obtoku. Ciljni organi so jetra, ledvice, kostni mozeg, in v njih povzroča apoptozo celic. Krog širjenja virusa je vezan na komarje iz rodu *Aedes* in *Haemagogus*.

Vrsta: Virus klopne meningoencefalitisa (angl. *Tick-borne disease virus*)

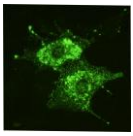
Virus je patogen predvsem za človeka. Prenaša se s klopi, za milejšo obliko pa obolevajo tudi domače živali in te so pomembne zlasti v verigi prenosa okužbe na človeka. Sesalci (gozdne živali, posebno manjši glodavci in domače živali) in ptice so gostitelji klopov. V sebi lahko nosijo viruse in bakterije, s katerimi se klop okuži, ko se na njih hrani. Za živali gostiteljice okužba ni usodna in poteka brez kliničnih znakov, prav tako pa tudi klopi sami bolezen ne razvijejo. V Evropi je v verigi prenosa najpomembnejša vrsta *Ixodes ricinus*. S krvjo se hranijo samo samice, ki se pri tem povečajo tudi do 120-krat, samci se hranijo s tkivno tekočino. Virus se lahko prenaša od samice na jajčeca in nato na vse nadaljnje razvojne stadije klopov. Od pritrditve klopov na človeka do začetka hranjenja lahko preteče tudi 12 ur. Zaradi anestezirajočega efekta klopove slane ugrize ni boleč, in zato pogosto ostane neopažen. Človek se lahko okuži ob piku klopov pa tudi ob pitju mleka okužene krave.

Vrsta: Virus louping ill

Louping ill je obolenje ovac, ki jo prenašajo klopi. Za okužbo so dovzetni tudi konji, mačke in jeleni, vendar brez izrazitih kliničnih znakov bolezni. Bolezen se prenaša v krogu ovce–klopi–ovce. Obbolele živali imajo klinične zanke: povišana telesna temperatura, ataksija. Pri ovcah se bolezen izrazi v obliki ataksije, tremorja, vrtenja v krogu in paralize. Bolezen je uvrščena med zoonoze. V Sloveniji še ni bila potrjena. Nadzor nad boleznijo se lahko izvaja s preventivno vakcinacijo.

Bolezni, ki jih povzročajo virusi iz rodu *Pestivirus*

Viruse iz rodu *Pestivirus* med seboj ločimo glede na nukleotidno zaporedje, antigenske razlike in primarne gostitelje. Pestivirusi so zgrajeni iz štirih strukturnih proteinov: nukleokapsidni protein in trije ovojnični proteini z oznakami Erns, E1 in E2 homodimerni protein. Genom pestivirusov ima en bralni okvir za poliprotein, velikosti do 4000 aminokislin, kodira 4 strukturne in 8 nestrukturnih proteinov. Velikost RNA je do 12,3 kbp. Na 5' koncu se nahaja nekodirajoča regija (NCR), velikosti do 350 nukleotidov, sledi bralni okvir za strukturne in nestrukturne proteine in zopet NCR na 3' koncu. Prvi gen na bralnem okvirju kodira nestrukturni protein N^{pro}, ki ima proteolitično aktivnost in razcepi poliprotein. Nestrukturni protein p7 sodeluje pri nastajanju virusa. Nestrukturni protein NS2 vsebuje veliko neesencialne aminokisline cistein. Protein NS3 ima serin proteazo drugi od štirih strukturnih proteinov Erns ima RNA-zn aktivnost. Vsi pestivirusi so si antigensko zelo sorodni. Potrjena je navzkrižna reaktivnost. Posamezne vrste lahko razlikujemo ob uporabi monoklonalnih



protiteles. Na proteinu E2 se nahaja hipervariabilna regija. Pri okuženi živali najdemo protitelesa proti proteinom E^{ms} in E2, pa tudi proti NS2 in NS3. Protitelesa proti proteinoma E2 in E^{ms} žival ščitijo pred reinfekcijo.

Vrsta: Virus goveje virusne diareje 1 in 2/mukozne bolezni (angl. *Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2/mucosal disease–BVD/MD*)

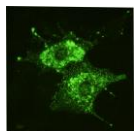
Vrsti virusa BVD-1 in BVD-2 se med seboj razlikujeta v nukleotidnem zaporedju. Za klasifikacijo je merodajno nukleotidno zaporedje regije 5' UTR (un-translated region) in gen za protein gp E2. Na osnovi te primerjave je danes znotraj vrste BVD-1 poznanih najmanj 13 različnih podgenotipov, znotraj vrste BVD-2 pa dva podgenotipa. Razlike med vrstama nastopajo tudi znotraj kodirajoče regije gena za protein N^{pro} in E2.

Protein N^{pro} je nestrukturni protein, ki se avtoproteolitično odcepi od poliproteina in je odgovoren tudi za blokado interferona v celici. Protein C je strukturni protein, sestavlja ovojnico, v fazi replikacije pa regulira prenos strukturnih glikoproteinov do endoplazmatskega retikuluma. Protein E^{ms} je strukturni glikoliziran protein z ribonukleazno aktivnostjo, je sestavni del ovojnice. Je zelo imunogen in sproža tvorbo nevtralizacijskih protiteles ter povzroča apoptozo limfocitov. Glikoproteina E1 in E2 se nahajata v plašču virusa. V fazi replikacije se pojavi 6 nestrukturnih proteinov z oznakami p7, NS2/3, NS4, NS4B, NS5A in NS5B. Nastopajo v vlogi različnih encimov, potrebnih za replikacijo virusa.

Glede na biološke lastnosti izolate virusa BVD delimo na citopatogene in necitopatogene seve, kar pomeni, da citopatogeni sevi na celicah govejega izvora povzročajo citopatski efekt. Za to skupino virusov je značilna velika heterogenost, ki nastopa zaradi mutacij, rekombinacij in insercij. Genetske spremembe so pogoste zaradi nezmožnosti polimeraze RNA, da v popolnosti popravi nepravilnosti v nukleotidnem zaporedju v fazi replikacije. Do rekombinacij prihaja ob hkratni okužbi z dvema različnima sevoma virusa BVD. Citopatogenost je vezana na pojavljanje samostojnega proteina NS2, ki se lahko med replikacijo spreminja s cepitvijo. Zaščita proti enemu podtipu ne daje popolne zaščite proti drugim podtipom.

Virus BVD je stabilen pri pH med 5,7 in 9,3, uniči pa ga temperatura nad 40 °C znotraj 30 minut.

Bovina virusna diareja je bolezen goveda, občutljive so vse kategorije živali, vendar je razvoj in potek okužbe odvisen od načina okužbe, najpogostejša je okužba preko sluznic respiratornih ali prebavnih organov. Virus lahko okuži tudi divje parkljarje, ovce in prašiče, vendar ne izzove bolezenskih znakov. Če se okužijo živali, ki se še niso srečale z virusom, traja inkubacijska doba od 5 do 7 dni. Bolezen se kaže v respiratorni in intestinalni obliki, povišani telesni temperaturi, levkopeniji v obliki profuzne diareje, respiratornega obolenja in erozivnega stomatitisa. Večina živali po nekaj dneh ozdravi, v krvi preboleznikov pa ugotovimo zaščitna protitelesa, ki so prisotna do smrti. Bolezen se razvija drugače v primeru okužbe gravidnih živali. Virus se v času akutne okužbe transplacentarno prenese tudi na plod. V primeru okužbe v obdobju do 120 dni brejosti, ko plod še nima razvitega lastnega imunskega sistema, virus pogosto povzroči smrt plodu ali pa je posledica okužbe rojstvo deformiranega teleta. V primeru, da zarodek preživi je tako tele vse življenje perzistentni izločevalec virusa. Žival, ki je perzistentni izločevalec virusa BVD, v krvi nima protiteles proti virusu BVD, je pa stalni izločevalec (perzistentni izločevalec, PI) virusa z vsemi sekreti in ekskreti, in tako prenaša okužbo na zdrave živali. Za perzistentnega izločevalca je značilno, da v krvi te živali lahko kadar koli dokažemo virus, na pa tudi protiteles. Bolna žival je zahirana, ima krajšo življenjsko dobo. V času okužbe, ko plod še ni sposoben lastnega imunskega odgovora, virusnih antigenov ne prepozna za tuje, jih sprejme kot lastne, zato tudi ne tvori protiteles proti



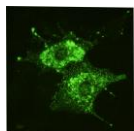
virusu BVD. Če virus v perzistentno okuženi živali mutira ali če pride do superinfekcije z drugim citopatogenim tipom virusa BVD, se razvije tako imenovana mukozna bolezen in se konča s poginom živali. Običajno se mukozna bolezen kaže v profuzni driski, erozivnem ali ulcerativnem stomatitisu, dehidraciji in poginu živali.



Slika 52: Prikaz nastanka perzistentnih izločevalcev virusa. Če pride do okužbe med gravidnostjo, se lahko rodi tele, ki nima protiteles proti virusu BVD, je pa perzistentni izločevalec virusa.

V laboratorijski diagnostiki uporabljamo metode za dokazovanje virusa in specifičnih protiteles. Ker je virus BVD limfotropen, ga lahko v fazi viremije ali pri perzistentno okuženi živali dokažemo v vzorcu krvi kot tudi v vseh drugih limfatičnih organih. Prisotnost protiteles v krvi bolne živali nam pove, da se je žival nekoč že okužila z virusom. Ker pa pri perzistentnih izločevalcih virusa nimamo specifičnih protiteles, lahko diagnozo postavimo le z dokazom prisotnosti virusa. Uporabimo test ELISA, test RT-PCR ali test izolacije virusa na celičnih kulturah. Z virusom BVD se okužijo tudi ovce in prašiči, vendar ne kažejo kliničnih znakov obolenja.

Virus BVD tudi v slovenski govedoreji povzroča velike ekonomske izgube, ki so posledica manjših prirastov, abortusov in slabše odpornosti okuženih živali. Ob pregledu rej bikovskih mater so protitelesa proti virusu BVD ugotovili v 57,6 % pregledanih rej. Ker se virus prenaša tudi s spermo okuženih bikov, moramo biti pri bikih v osemenjevalnih centrih še posebej pozorni, da se ne okužijo. V Sloveniji so razširjeni štirje različni podtipi virusov BVD vrste 1, in sicer BVD 1b, 1d, 1f in 1g. Prevladujejo virusi dveh podtipov, in sicer BVD 1d in 1f, ki so jih ugotavljali v Gorenjski regiji, v Primorski regiji najdemo predvsem viruse podtipa BVD 1f, v Štajerski regiji pa pretežno viruse podtipa BVD 1d. Virusov BVD vrste 2 v Sloveniji do danes niso ugotovili, razširjen je predvsem v Ameriki.

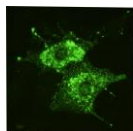
**Vrsta: Virus Borderske bolezni (angl. *Border disease virus*)**

Borderska bolezen (BB) je bolezen ovac. Virus je antigensko močno soroden virusu BVD in virusu klasične prašičje kuge. Bolezen se kaže v obliki kongenitalnih malformacij novorojenih ovac, nizki rojstni teži. Če je prišlo do okužbe v prvi tretjini gravidnosti, se rodijo jagnjeta, ki so perzistentni izločevalci virusa. Potek bolezni in patogeneza je močno podobna okužbam BVD pri govedu. Virus deluje imunosupresivno. Pri odraslih poteka bolezen subklinično, prihaja do abortusov. Podobno kot pri infekcijah z virusom BVD tudi tu srečujemo perzistentne izločevalce virusa. Diagnostika temelji na izolaciji virusa na celični kulturi ali dokazovanju virusa z molekularnimi metodami. Okužbo z virusom BB v določeni čredi pa lahko dokazujemo tudi s serološkimi metodami. V Sloveniji virusa BB še nismo ugotovili.

Vrsta: Virus klasične prašičje kuge, KPK (angl. *Classical swine fever virus, CSF*)

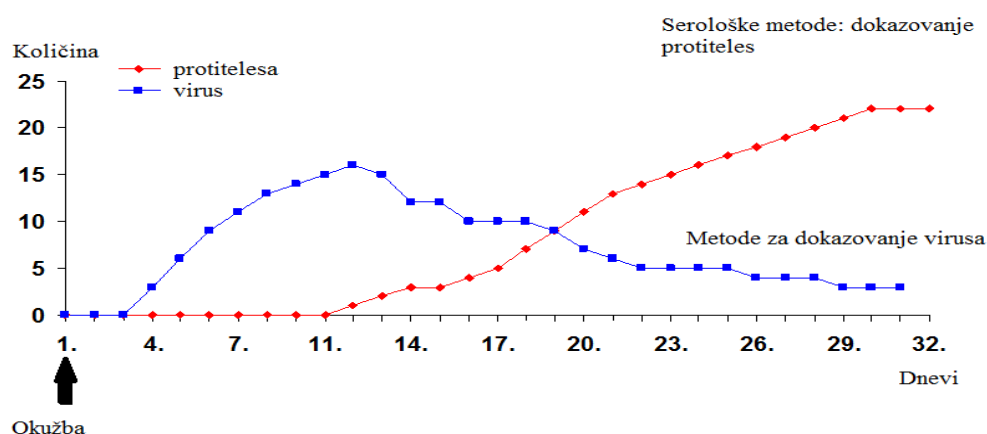
Klasična prašičja kuga spada med ekonomsko zelo pomembne bolezni v veterinarski medicini. Bolezen je prisotna v mnogih državah sveta. Pred izbruhi bolezni lahko populacijo prašičev zaščitimo z rednim cepljenjem, vendar je po zakonodaji EU cepljenje proti KPK razen v izjemnih primerih prepovedano. Poznani so različni sevi virusa KPK, ki se med seboj razlikujejo po svoji patogenosti. Virus KPK se antigensko malo razlikuje od virusa BVD in BB, razlike najdemo v nukleotidnem zaporedju genoma. Najbolj ohranjena je regija 5'NTR, dolga 285 bp, in se uporablja za dokaz prisotnosti pestivirusov v vzorcu. Variabilna regija je regija, ki kodira gen za gpE2, dolga 652 bp. Na osnovi razlik v nukleotidnem zaporedju te regije lahko druge pestiviruse ločimo od virusa KPK. Poznanih je več genotipov virusa KPK. Virus je antigensko zelo stabilen; v genomu so se tekom evolucije pojavljale točkaste mutacije. Diferenciacija posameznih izolatov temelji na analizi kratkih odsekov v genomu posameznih izolatov virusa, govorimo o hierarhijski razdelitvi na osnovi razlik s 89,5 in 95-odstotno sorodnostjo v nukleotidnem zaporedju. Prva filogenetska skupina virusov KPK se je pojavljala v Evropi, Srednji Ameriki in na Karibih. Drugo genetsko skupino sestavljata podskupini KPK 2.2 in 2.3. Tretja genetska skupina se pojavlja v Aziji. Vsaka genetska skupina je razdeljena v podskupine, skupini 1 in 2 v tri, tretja pa v štiri, vse pa delimo dalje v podpodskupine (angl. *cluster*).

Najpogostejša je oronazalna pot okužbe. Primarno mesto razmnoževanja virusa so običajno tonzile, nato pa se virus po krvi raznese v ostale limfatične in parenhimske organe. Virus ima tropizem do vaskularnih endotelnih celic in limfocitov. Zaradi poškodb sten krvnih žil najdemo petehialne krvavitve po sluznicah, bezgavkah, ledvicah. Za kronično obliko je značilno formiranje ulcerativnih sprememb na sluznici debelega črevesja, ki jih imenujemo butoni. Po okužbi traja inkubacijsko obdobje od 2 do 4 dni. Bolezen se kaže v povišani telesni temperaturi, depresiji, bruhanju, anoreksiji ter vnetju sluznic, parezi, paralizi in poginu. Bolni prašiči imajo značilne hiperemične uhlje in področje trebuha. Praviloma zbolijo vse živali v reji, mlade živali poginjajo tudi brez predhodnih kliničnih znakov bolezni. Močno patogeni sevi povzročajo tudi do 100-odstotni pogin živali v določeni reji. Najbolj občutljive so mlade živali. Poznane so tudi kronične oblike KPK. Podobno kot pri okužbi z virusom BVD pri govedu se tudi pri KPK srečujemo s perzistentnimi izločevalci virusa. Če pride do okužbe v prvi tretjini brejosti, se rodijo pujski, ki perzistentno izločajo virus, niso pa nosilci specifičnih protiteles. Okužba se običajno prenaša s kontaktom. Pri kronični obliki bolezni so klinični znaki manj izraziti, vendar te živali lahko izločajo virus.

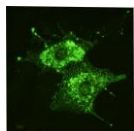


Slika 53: Petehialne krvavitve in hemoragije po ušesih in trebuhu kože (z dovoljenjem dr. Lorene Jemeršič, Veterinarski institut Hrvatske, Zagreb).

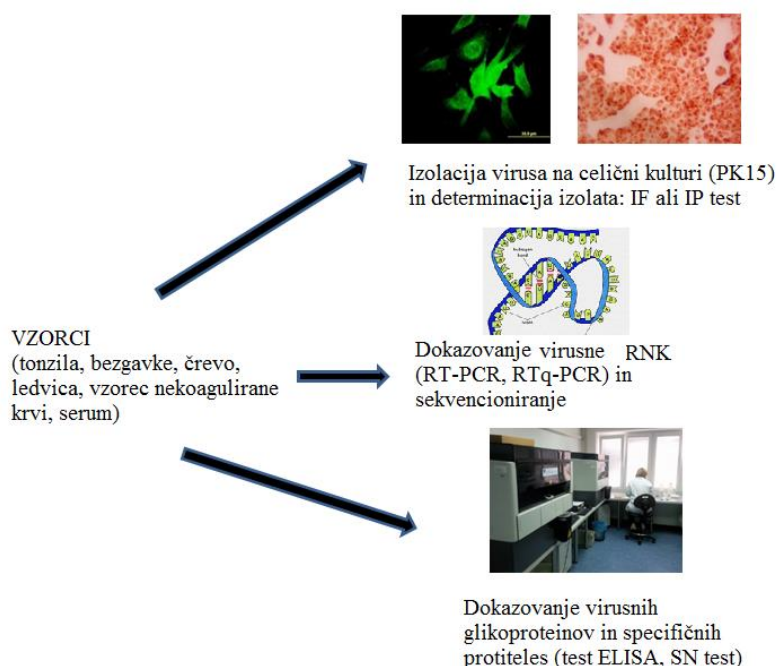
Laboratorijska diagnostika temelji na dokazu prisotnosti virusa v krvi bolnih živali ali v limfatičnih organih, kot so vranica, tonzile, bezgavke pa tudi v ledvicah. Ob sumu na KPK v laboratorijsko preiskavo pošljemo vzorec krvi z antikoagulantom in vzorec koagulirane krvi, ob sekciji pa odvezamo košček tonzil, vranice, ledvic in ileuma. V 10 do 14 dneh po okužbi že lahko v serumu prašiča dokažemo prisotnost protiteles proti virusu KPK. V diagnostiki uporabljajo test RT-PCR. Po izolaciji virusne RNA jo prepišejo v cDNA in ta odsek pomnožijo v pomnoževalniku. Pomnožujejo ca. 300 baznih parov dolg fragment na regiji 5-NTR, ki je specifična za vse pestivirusse. Specifična regija samo za KPK je na genu za protein E2. Za testiranje velikega števila vzorcev je primernejši RT-PCR v realnem času.



Slika 54: Krivulja prikazuje pojav in količino virusa ter specifičnih protiteles v dnevih po okužbi. Virus se v vzorcu krvi pojavi 3–5 dan po okužbi (lahko tudi do 30 dni, odvisno od virulence virusa), vrh doseže v enem tednu, potem pa titer virusa pada in ga pogosto že 3 tedne po okužbi virusa ni mogoče več dokazati. Protitelesa se pojavijo 10–11 dan po okužbi, titer protiteles do 21. dne narašča, potem pa zelo počasi pada. Protitelesa se ohranjajo v krvi okuženega prašiča tudi več let.

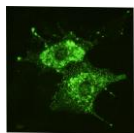


Uporabljamo tudi metode za dokazovanje virusa, kot so test izolacije virusa na celični kulturi, test ELISA, zelo uporabna pa je metoda RT-PCR in RT-PCR v realnem času za dokaz virusne nukleinske kisline. Virus lahko množimo na celičnih kulturah prašičjega izvora, vendar ne povzroča citopatskega efekta. Za determinacijo izolata uporabljamo peroksidazni ali imunofluorescenčni test. Z uporabo monoklonalnih protiteles v indirektnem imunoperoksidaznem testu ali določanjem nukleotidnega zaporedja na genu za protein N^{pro} lahko virus KPK ločujemo od ostalih pestivirusov. Ob postavitvi suma KPK v praksi, vzorec najprej testiramo z metodo RT-PCR v realnem času (RTq-PCR). Pomnožimo regijo 5'NTR. V pozitivnem primeru opravimo še test RTq-PCR, pomnožimo odsek na proteinu gpE2, ki je specifičen za virus KPK. Ker se virusa BVD in BB razmnožujeta tudi v prašiču, je potrebno za razlikovanje vseh treh pestivirusov potrebno uporabiti zelo specifične metode.



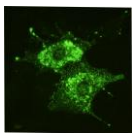
Slika 55: Model dokazovanja okužbe z virusom KPK pri prašičih.

Virus se med prašiči prenaša z direktnim in indirektnim kontaktom; zelo pogost je prenos infekta s pomijami, zato je v državah EU prepovedano krmljenje prašičev s pomijami. V nekaterih državah EU (v Nemčiji) je bolezen razširjena med divjimi prašiči. Cepljenje domačih prašičev je iz ekonomskih razlogov v državah EU omejeno le na primere nadzora in obvladovanja bolezni ob izbruhu. Slovenija ima status države proste KPK. Zadnji izbruh KPK v Sloveniji je bil evidentiran leta 1996. S preventivnim cepljenjem prašičev proti KPK smo zaključili leta 2000. V letih 2007 – 2008 je bilo na sosednjem Hrvaškem v neposredni bližini Slovenije ugotovljenih več izbruhov KPK, vendar so z ustrezno kontrolo prometa uspeli preprečiti širjenje bolezni.



Dodatni študijski viri:

- Jamnikar Ciglenecki U, Grom J, Toplak I, Jemersić L, Barlic-Maganja D. Real-time RT-PCR assay for rapid and specific detection of classical swine fever virus: comparison of SYBR Green and TaqMan MGB detection methods using novel MGB probes. *J Virol Methods*. 2008 Feb;147(2):257-64. Epub 2007 Nov 14.
- Terzić S, Jemersić L, Lojkić M, Madić J, Grom J, Toplak I, Sver L, Valpotić I. Comparison of antibody values in sera of pigs vaccinated with a subunit or an attenuated vaccine against classical swine fever. *Vet Res Commun*. 2003 May;27(4):329-39.
- TOPLAK, Ivan, MAURER WERNIG, Jedrt, VENGUŠT, Gorazd, HARI, Aleksandra, ARIČ, Tina, HOSTNIK, Peter, GROM, Jože. Control of Classical swine fever (CSF) in Slovenia. V: PETROVIĆ, Tamaš (ur.). International Conference Prevention of Classical Swine fever in the Border Region Croatia - Serbia (STOP - CSF), Novi Sad, June 7-8, 2012. *Proceedings*. Novi Sad: Scientific Veterinary Institute "Novi Sad": = Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", 2012, str. 60-70
- Toplak I. Molekularna epidemiologija bovine virusne diareje (BVD) v Slovenskih plemenskih rejah govedi : doktorska disertacija. Ljubljana: UL Veterinarska fakulteta, 2004: 142 str.



8

ARTERIVIRIDAE

Virusi, uvrščeni v družino *Arteriviridae*, so bili prvotno na osnovi morfoloških značilnosti uvrščeni v družino *Togaviridae*, v katero ravno tako spadajo virusi, ki imajo pozitivno polarno enovijačno RNA, lipidno ovojnico, ikozaedrično nukleokapsido. Zaradi razlik v aminokislinskih zaporedjih in dolžini genov za replikazne proteine so določili novo družino, poimenovano *Arteriviridae*. V rodu *Arterivirus* sta za nas pomembni dve vrsti: *Equine arteritis virus*, EAV (virus kužnega arteritisa kopitarjev) in Virus prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma (*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRS).

Virus je stabilen v območju vrednosti pH od 6 do 7,5. Temperature nad lediščem infektivnost hitro zmanjšajo, pri 37 °C izgubi infektivnost v od 2 do 3 dneh, pri temperaturi 56 °C pa že v 30 minutah. Ker ima virus EAV lipidno ovojnico, ga z uporabo detergentov inaktiviramo.

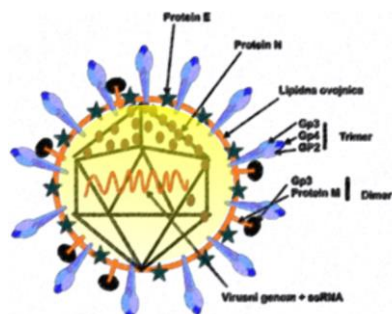
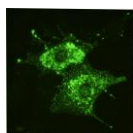
Morfološke značilnosti virusa

Arterivirus je okroglaste oblike, v premeru meri med 50 in 65 nm, ima lipoproteinski ovoj, nukleokapsida pa je ikozaedralne oblike, velikosti od 25 do 35 nm. Na površini virusne ovojnice so proteini v obliki peplomerov.

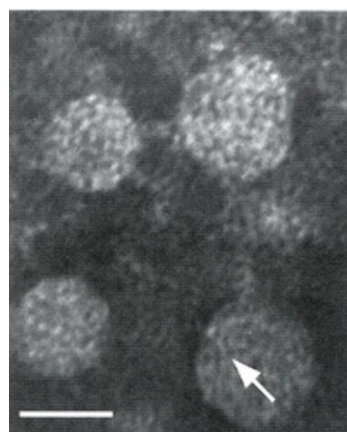
Plašč virusa gradi neglikozilirani protein M in glikoproteini z oznakami GP2b, GP3 in GP4, ki jih kodirajo geni ORF2b, ORF3 in ORF4. GP2 in GP4 proteina imata več mest za pripenjanje na oligosaharide. Protein E je neglikozilirani membranski protein, integriran v lipidni ovoj, ki ima pomembno vlogo pri infektivnosti virusa. Genom pa obdaja fosforiliran nukleoprotein N. Protein N predstavlja 20–40 % vseh virusnih proteinov.

V imunološkem smislu je pomemben protein GP5, v katerem se nahajajo epitopi za nevtralizacijska protitelesa. Okužena žival tvori protitelesa proti temu proteinu. Neglikozilirani protein M (17 kDa) in glikoprotein GP5 (30–44 kDa) sta glavna intermembranska proteina, ki segata s tremi transmembranskimi regijami v notranjost virusne lipidne ovojnice. Protein GP5 je najbolj imunogen virusni membranski protein.

Kapsida je sestavljena iz fosforiliranega proteina z oznako N (nukleoprotein), ki je v povezavi s proteinoma M in GP5 v plašču virusa. V protein N se prevede sg mRNA⁷. V zrelem virionu predstavlja protein N kar velik delež (20–40 %) vseh virusnih proteinov. Epitopi na proteinu N so zelo ohranjeni, zato so monoklonalna protitelesa proti proteinu N zelo primerna za uporabo v diagnostiki v indirektnem imunoperoksidaznem testu za dokaz virusnih antigenov ali v testu ELISA. Protein M je sicer zelo ohranjen, ni pa tako imunogen, ker ni na zunanem delu ovojnice tako izpostavljen imunskemu sistemu. Nastaja na endoplazmatskem retikulumu. Proteina GP5 in M tvorita dimer. Proteini GP2, GP3 in GP4 tvorijo trimer. Ta se nahaja v virusnem plašču. Znano je, da je protein E skupaj z glikoproteini GP2b/GP3/GP4 odgovoren za sposobnost infektivnosti virusa, sodeluje tudi pri prepoznavanju receptorjev na površini celic in/ali vstopu virusa v celico.



Slika 56: Shematski prikaz arterivirusa.



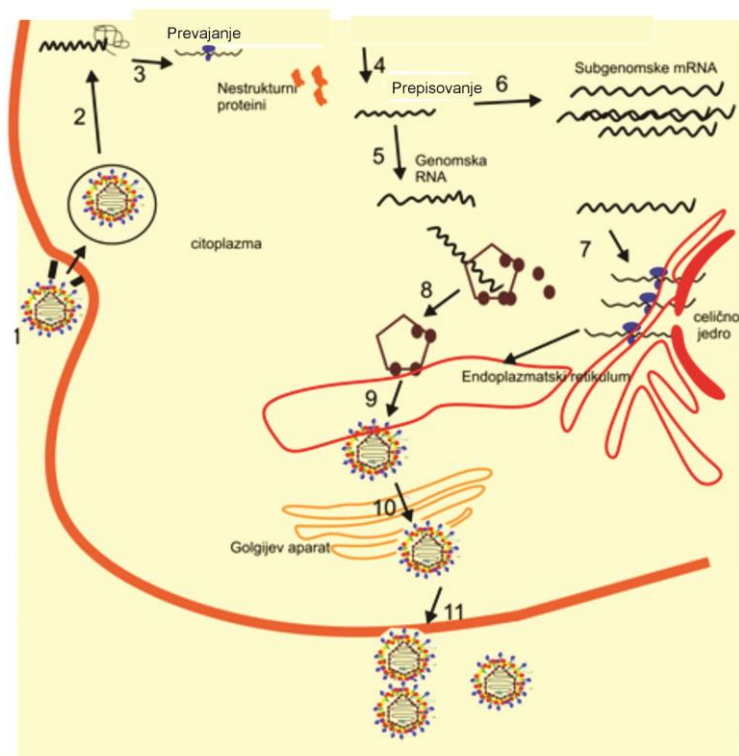
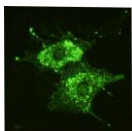
Slika 57: Elektronsko mikroskopski posnetek arterivirusa (povzeto po http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-0-387-95919-1_7)

Genom arterivirusov

Genom predstavlja linearna molekula pozitivno polarne enojnovijačne RNA, dolžine okrog 15.000 nukleotidov. Genom virusa deluje kot mRNA, ki se prevede v proteine. Genom, ki ima na 3' koncu poli A rep vsebuje devet bralnih okvirjev (angl. *open reading frame*, ORF). Približno tri četrtine genoma zajemata bralna okvirja ORF1a in ORF1b, ki se nahajata proti 5' koncu in nosita zapis za replikazne poliproteine. Po translaciji ta poliprotein proteaze razcepijo na 12 nestrukturiranih proteinov (angl. *nonstructural protein*, NSP). Na ostali tretjini genoma si sledijo bralni okvirji, ki nosijo zapise za strukturne proteine E, GP2, GP3, GP4, GP5 za M in N. Proteini se sintetizirajo v procesu prevajanja iz šestih subgenomskih mRNA (sgmRNA). Na 5' koncu genoma se pred kodirajočo regijo nahaja 5' nekodirajoče področje (angl. *5' untranslated region*, 5' UTR), dolgo 224 nt, ki vsebuje signalna zaporedja, potrebna za regulacijo procesa prepisovanja in pomnoževanja genoma virusa kot tudi sinteze mRNA. Arteriviruse sestavljajo 6 strukturnih proteinov.

Pomnoževanje arterivirusov

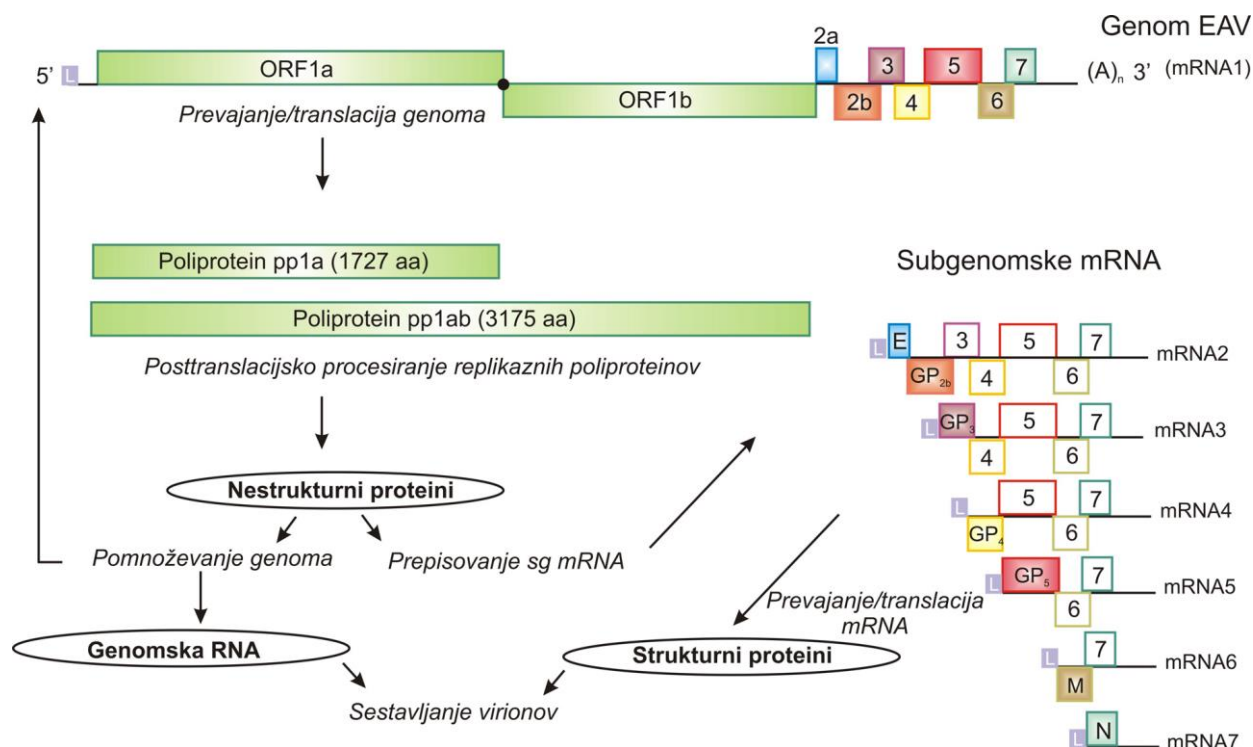
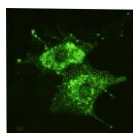
Pomnoževanje arterivirusov poteka izključno v citoplazmi celice. Receptorji za EAV virus še niso povsem poznani, poznano pa je, da so za PRRS virus molekule sialoadhezina in heparan sulfata. Pri vezavi virusa na celico sodelujejo GP2, GP3 in GP4 proteini ter tudi protein M. V celico vstopa po principu endocitoze. Virusna membrana se spoji s steno vezikla, tako da se v citoplazmo sprosti virusna ssRNA. Razmnoževalni cikel začne z vezavo virusne RNA na ribosom in prevedbo ORF1a in ORF1b, ki nosita zapis za virusno replikazo.



Slika 58: Prikaz poteka replikacije arterivirusov: (1) Vezava virusa na gostiteljsko celico, (2) vstop z endocitozo, (3) sprostitve ssRNA(+) in sinteza poliproteinov, proteoliza in nastanek replikaznih proteinov, (4) prepis virusne +RNA v komplementarno -RNA (matrica), (5) pomnoževanje virusnega genoma, (6) sinteza subgenomskih mRNA, (7) sinteza strukturnih proteinov ob translaciji subgenomskih mRNA, (8) izgrajevanje kapside in uvajanje genoma v kapsido, (9) izgrajevanje virusa na endoplazmatskem retikulumu, (10) glikolizacija zunanjih strukturnih proteinov v Golgijevem aparatu, (11) izstopanje.

Translacija poteka na celičnih prostih ribosomih. Rezultat prepisa je nastanek dveh poliproteinov. Ta se razcepita na 12 nestrukturnih proteinov (NSP), ki nastopajo v funkciji encimov, NSP9 in NSP12 imata vodilno vlogo pri procesu pomnoževanja virusne RNA. NSP1 in NSP2 sta pomožni proteinazi, ki ne sodelujeta pri pomnoževanju genoma. En del novonastalih nestrukturnih proteinov regulira pomnoževanje genoma, drugi del pa pri sintezi subgenomskih mRNA (sg mRNA). Proces nastanka sg mRNA regulirajo zaporedja TRS (angl. *transcription-regulating sequence*, TRS), ki so prisotna na 3' koncu vodilnega zaporedja in pred začetkom vsakega strukturnega gena. Zaporedja TRS so pri virusu EAV sestavljena iz niza šestih nukleotidov 5'-UCAACU-3'. Genomska RNA deluje kot matrica, na podlagi katere od RNA odvisna polimeraza RNA (replikaza RNA) katalizira prepis RNA (mRNA1), ki je komplementarna genomski RNA. Sinteza RNA poteka tudi s pomočjo na membrano vezanih celičnih encimov. Translacija posamezne sg mRNA poteka na ribosomih in endoplazmatskem retikulumu. Subgenomska mRNA7 se prevede v protein N.

Virusi potem preidejo iz ER v Golgijev aparat in zapustijo celico. V fazi izgrajevanja virusa se protein E pripne na virusno RNA. Ključnega pomena za uspešno izgradnjo viriona je prisotnost proteina E. Slednji je v interakciji s kompleksom GP2b/GP3/GP4 in z GP5/M in ali z N ter usmerja kompleks glikoproteinov. Virioni se iz celice sproščajo po principu eksocitoze.



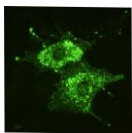
Slika 59: Splošna shema pomnoževanja genoma virusa EAV. Zgradba policistronskega genoma EAV je prikazana z delno prekrivajočimi se bralnimi okvirji različnih barv. Genom za replikazo ORF1a in ORF1b (zelena), sledijo geni ORF2a-ORF5, ki nosijo zapis za virusne glikoproteine (modra, oranžna, rožnata, rumena in rdeča). Na skrajnem 3' koncu genoma pa gena ORF6 (olivno zelena) in ORF7 (sivomodra) kodirata membranski protein M in nukleoprotein N. Črna pika prikazuje mesto premika bralnega okvirja za 1 nukleotid nazaj (−1). Z veliko tiskano črko L je označeno vodilno zaporedje (vijolična), ki se nahaja na 5' koncu genoma in na 5' koncu (subgenomske) sg mRNA (mRNA2-mRNA7). Osnovna značilnost prepisovanja je sinteza sg mRNA, ki predstavlja nabor različno dolgih molekul RNA. Z barvo, ki ustreza barvi pripadajočega ORF, so na sg mRNA označena le tista zaporedja, ki se prevajajo v virusne beljakovine. Medtem ko so 3' konci sg mRNA, ki niso prevajalno aktivni, nepobarvani (z dovoljenjem dr. Sare Mankoč, disertacija).

Vrsta: Virus kužnega arteritisa kopitarjev (angl. *Equine arteritis virus*)

Virus je zelo nestabilen pri pH izven meje med 6 in 7,5. Infektivnost hitro izgubi, tudi če ga hranimo pri temperaturi nad 4°C. Pri temperaturi 60 °C se titer virusa v pol ure razpolovi.

Virusni genom izgrajuje zaporedje 12.687 baznih parov in vsebuje 9 bralnih okvirjev. Bralni okvir 1a in 1b sta locirana na 5' koncu genoma in kodirata virusne replikaze. Bralni okvirji 2a, 2b, 5, 6 in 7 kodirajo strukturne proteine z oznakami E-GP2-GP3-GP4-GP5, sledita še bralna okvirja za strukturna proteina M in N. Gen za protein E, ki se nahaja na bralnem okvirju 2a, je zelo enoten za vse viruse družine *Arteriviridae*. Protein E je integriran s proteinom M in ni glikoliziran. V povezavi s proteini GP2, GP3 in GP4 tvori heterodimerni kompleks. Ta kompleks predstavlja mesto vezave virusa na celico.

Tako kot velja za večino virusov RNA se tudi pri virusu kužnega arteritisa kopitarjev pojavljajo razlike v genomih, vendar je poznan samo en serotip KAK. Nukleotidna zaporedja in filogenetska



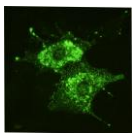
analiza genov za protein M in N kažejo heterogenost med različnimi geografsko vezanimi izolati – med evropskimi in ameriškimi izolati nastopajo večje razlike. Dosedanje izolate so razdelili v 4 različne filogenetske skupine, dve ameriški in dve evropski filogenetski skupini. Zaradi premikov živali med celinami prihaja tudi do mešanja različnih tipov virusa. Poliklonalna protitelesa proti referenčnemu sevu *Bucyrus* nevtralizirajo vse izolate. Najbolj variabilno mesto genoma je bralno mesto 5 (ORF5), kjer je prisotna 89-odstotna homolognost. Protein GP5 je imunogen, serumi nekaterih okuženih konj vsebujejo tudi visok titer protiteles proti proteinu N. Protein GP4 je sestavni del membrane virusa. Protitelesa proti proteinu GP5 preprečijo vezavo virusa na celico. Opazili so spremembe v aminokislinskem zaporedju imunodominantnega dela GP5. Antigenske variacije so v glavnem vzrok za nastanek novih različic virusa EAV, ki se razlikujejo v nevtralizacijskem fenotipu. Variacije v nevtralizacijskem fenotipu določamo z nevtralizacijskim testom (NT), s katerim ugotavljamo prisotnost in titer nevtralizacijskih protiteles v specifičnem serumu. Nevtralizacijska aktivnost protiteles proti virusu EAV je vezana na imunoglobuline razreda IgG, ki preprečijo pojav klinične slike kužnega arteritisa kopitarjev tudi v primeru ponovne okužbe. Primerjalne analize nukleotidnih zaporedij ORF5, ki kodira GP5, so pokazale, da obstajajo med sevi virusa EAV precejšnje genetske raznolikosti.

Diagnostika virusa KAK

V primeru akutne okužbe odvezamemo za potrebe diagnostike nazalni ali očesni bris, vzorec krvi ali vzorec sperme. Vzorce je treba hraniti pri temperaturi nižji od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prisotnost virusa dokazujemo z metodo RT-PCR ali izolacijo virusa na celični kulturi. Prisotnost protiteles v spermi žrebca preprečuje vezavo virusa na celično kulturo, zato lahko dobimo v testu izolacije virusa na celični kulturi negativen rezultat, v testu RT-PCR pa je rezultat istega vzorca pozitiven. V serološki diagnostiki uporabljamo test SN. Pozitiven rezultat pomeni, da je žival nekoč imela stik z virusom KAK. Kobile, ki bolezen prebolijo, ostanejo dolgotrajne nosilke specifičnih protiteles in v tem času virusa ne izločajo. Pri serološko pozitivnih žrebcih pa pomeni, da do 30 % serološko pozitivnih žrebcev občasno ali permanentno izloča virus s spermo, zato je nujno, da serološko pozitivnemu žrebcu odvezamemo še vzorec sperme in jo preiščemo na prisotnost virusa v testu izolacije virusa na celični kulturi ali določimo prisotnost virusnega genoma z metodo RT-PCR.

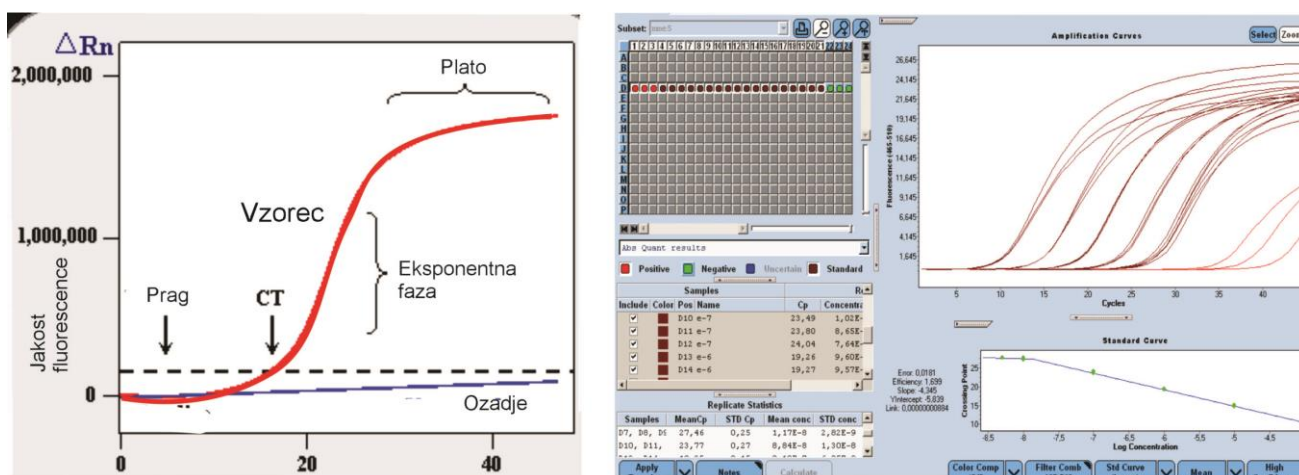
Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RTq-PCR)

Metoda RTq-PCR je izpeljanka metode verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki jo je razvil Kary Mullis, ko je v in vitro pogojih uspel pomnožiti specifični del DNA s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in encimom polimerazo. Ker virus KAK vsebuje RNA genom, moramo virusno RNA najprej prepisati v komplementarno DNA. V osnovi PCR sestavljajo trije osnovni koraki: denaturacija, ko razklenemo DNA verigo s povišanjem temperature na $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, naleganje: reakcijsko mešanico ohladimo da začetni nukleotidi naležejo na DNA matrico in podaljševanje: ko DNA polimeraza sintetizira novo verigo. Aktivnost DNA polimeraze je optimalna pri $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, hitrost nastajanja verige je 100 baznih parov na sekundo. Z metodo RTq-PCR v realnem času lahko količino produkta merimo med samo reakcijo. Ta metoda omogoča tudi kvantitativno določanje količine pomnožene virusne nukleinske kisline v vzorcu. Ta metoda tako združuje podvojevanje DNA in hkratno detekcijo pomnoženih produktov. Pri tem se v reaktivno mešanico dodajo še interkalirajoča barvila, ki imajo lasnost, da se njihova fluorescenca močno poveča pri vezavi na DNA, tako, da je intenziteta signala odvisna od količine DNA. Pri tem uporabljamo barvilo SYBR green I. Vezan na DNA odda tisočkrat večjo fluorescenco kot v raztopini. S pomnoževanjem DNA v PCR reakciji se tako povečuje tudi intenziteta fluorescence, ki jo merimo z aparaturo npr. Light Cycler. V aparaturi se produkt osvetli z laser svetlobo, detektorski sistem kot je CCD kamera ali fotodiode pa zazna. Za



uspešen test je najpomembnejša izbor začetnih oligonukleotidov. Odsek nukleinske kisline, ki jo pomnožujemo ne sme biti daljši od 250 baznih parov (BP), začetni oligonukleotidi (praimerji) morajo biti dolgi od 18 do 24 baznih parov. Lasnosti posameznih začetnih oligonukleotidov predhodno analiziramo z ustreznimi računalniškimi programi, da preprečimo nespecifično vezavo prajmerjev.

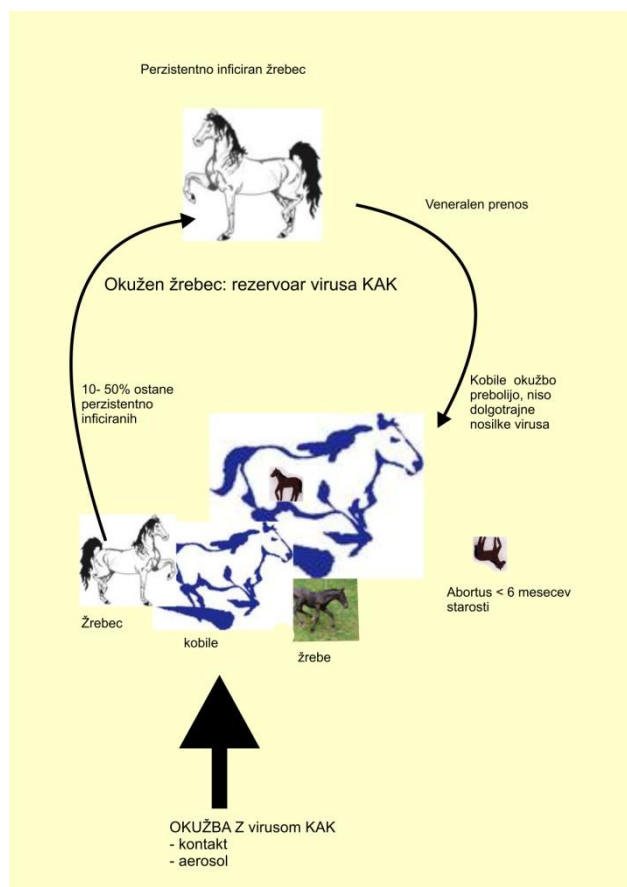
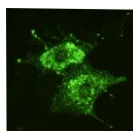
Med potekom reakcije merimo intenzivnost fluorescence. Graf pomnoževanja dobimo, ko izrišemo krivuljo odvisnosti fluorescence od števila ciklov. Na grafu so vidne tri linije: bazna linija, eksponentna faza in plato. Ko se količina produkta pomnoževanja odseka nukleinske kisline doseže kritično točko se na ekranu izpiše linija fluorescence produkta. Rezultat dobimo na osnovi izračuna eksponentne faze fluorescence. Ko začne primanjkovati reaktantov podvajanje ni več učinkovito. Mejo, oziroma začetek eksponentne faze imenujemo prazni cikel (angl. threshold cycle, C_t). Nižja ko je vrednost C_t , več nukleinske kisline je v vzorcu. Ubičajno se izvaja 40 ciklov pomnoževanja. Primer: C_t 28 pomeni močno pozitivno reakcijo, vrednost 39 pa pomeni nizko količino produkta



Slika 60: Graf teoretičnega pomnoževanja ciljnega zaporedja z metodo PCR v realnem času in dejanski prikaz večjega števila vzorcev na ekranu računalnika

V primeru diagnostike KAK, dokaz virusnega genoma v spermi okuženih žrebcev uporabljajo metodo RTq-PCR. Pri tem pomnožujejo odsek gena ORF7.

Virus KAK je prisoten tudi v populaciji slovenskih konj. Nizek odstotek okužbe ugotavljamo v populaciji hladnokrvnih konj. Najbolj pa je razširjen med športnimi konji, kar je vsekakor vezano na intenziven promet z njimi. Okužbo je mogoče zanesljivo preprečevati le z ustreznim nadzorom prometa z živalmi. Na tržišču so tudi cepiva, ki učinkujejo le v smislu preprečevanja pojava klinične slike bolezni, ne dajejo pa popolne zaščite. Domneva se, da žrebec, ki je prvič cepljen pred okužbo in je njegova imunost vzdrževana z vsakoletnim cepljenjem, ne postane perzistentni izločevalec virusa. Obolenje pri kopitarjih lahko poteka subklinično ali pa se kaže v obliki respiratornih obolenj, abortiranju gravidnih kobil in perzistentni infekciji žrebcev. Inkubacija traja od 3 do 14 dni, pojavi se povišana telesna temperatura, edemi po skotumi in prepuciju, pogosto je prisotna pljučnica. Če se žrebci okužijo v puberteti, le-ti ostanejo dosmrtni nosilci in izločevalci virusa. Prebolele živali so nosilci specifičnih protiteles proti virusu KAK. V puberteti so okuženi žrebci perzistentno okuženi, virus pa se ohranja v ampulah semenovodov in celicah akcesornih spolnih žlez. Prenos virusa je vertikalni in horizontalni. Virus ne povzroča teratogenih sprememb na plodu. Zelo pogost je prenos z aerosolom. Za ohranjanje okužbe je zelo pomemben veneralni prenos virusa, zlasti s perzistentno okuženimi žrebci.

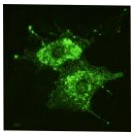


Slika 61: Pot širjenja virusa KAK.

Vrsta: Virus prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma (angl. *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRS*)

Prašičji reproduktivni in respiratorni sindrom (PRRS) je bolezen, ki je po svetu razširjena v skoraj vseh državah, v katerih redijo prašiče. Prvič so jo diagnosticirali v Združenih državah Amerike leta 1987, 1988 v Kanadi, v Evropi se je najprej pojavila v Nemčiji, in sicer leta 1990, leta 1991 na Nizozemskem, v Španiji, Belgiji in Veliki Britaniji. V državah, kjer je bolezen dokazana, je inficiranih od 60 do 80 % rej prašičev. V Sloveniji smo protitelesa proti PRRS prvič ugotovili pri uvoženih prašičih v karanteni leta 1994. Predvidevamo, da se je širjenje virusa PRRS pri nas začelo leta 2004, najprej v majhnih rejah, v zadnjem času se pojavlja tudi na velikih farmah.

Virus PRRS ima genom velikosti okrog 15 kbp in vsebuje devet bralnih okvirjev, ki se med seboj prekrivajo. PRRS virus je soroden virusu konjskega arteritisa in simian hemoragičnemu virusu. Prve analize sekvenc in antigenske analize značilnosti so pokazale, da obstajajo evropski tipi virusa PRRS, ki so sorodni prvemu izolatu virusa Lelystad. Ameriški sevi virusa PRRS na regiji ORF5 kažejo samo od 55 do 79-odstotno sorodnost nukleotidnega zaporedja z evropskim sevom in tako formirajo svojo genotipsko skupino. Znotraj obeh genotipov obstajajo številni različni podtipi posameznih virusov. V regiji ORF5 virusnega genoma kažejo virusi znotraj evropskega genotipa na nukleotidnem nivoju od 87,1 do 99,2-odstotno podobnosti, virusi ameriškega tipa pa od 89 do 94-odstotno podobnosti. Z ugotavljanjem vedno novih podskupin virusov PRRS se potrjuje, da



obstaja velika genetska raznolikost med razširjenimi sevi PRRS, ki pomembno vpliva na ohranjanje virusa med populacijo prašičev. Pomembna ugotovitev je, da je zaščita prašičev po infekciji ali vakcinaciji učinkovita le, če se v vakcini uporabi homologen sev virusa. To pomeni, da gre za zaščito prašičev le, če se reja sreča ponovno z istim tipom virusa oziroma če se za cepljenje prašičev uporabi isti ali zelo soroden tip virusa PRRS. Virus se razmnožuje v citoplazmi celic, najpogosteje v prašičjih alveolarnih makrofagih in makrofagih drugih tkiv, *in vitro* pa lahko tudi na različnih celičnih linijah. Množenje virusa na celičnih kulturah je težavno, izjema je njegovo množenje v kulturi prašičjih pljučnih makrofagov. Virus povzroča citopatski efekt na tej celični kulturi.

Virus je najbolj stabilen pri nizkih temperaturah, pri temperaturi od -20 do -70 °C, in ohrani infektivnost več let, en mesec lahko preživi pri temperaturi do $+4$ °C, pri temperaturi 37 °C preživi 48 ur, pri temperaturi 56 °C pa manj kot 45 minut. Prav tako se preživetje virusa zmanjšuje v okolju z nižjim pH od 6,5 in sušenjem.

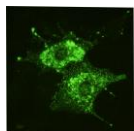
PRRS virus se najpogosteje širi z inficiranimi prašiči. Okuženi prašiči lahko širijo virus s slino, z nosnim izcedkom, z urinom, s semenom in z blatom. Breje svinje, ki se okužijo v pozni brejosti, izločajo virus preko mamarnih žlez. Znan je tudi vertikalni prenos virusa, in sicer transplacentarno iz okužene breje svinje na fetus. Posledica je lahko fetalna smrt ali prasitev inficiranih slabotnih pujskov. Možno je tudi, da so v gnezdu inficirane svinje posamezni pujski, ki ostanejo daljše obdobje negativni. Če pride do okužbe po 100 dnevu brejosti, so v gnezdu prisotni pujski z velikimi razlikami v teži, mrtvorojeni in mumificirani.

V čredi je za prvih 8 tednov po okužbi značilna visoka (do 33-odstotna) smrtnost pred odstavitvijo, kasneje se pojavijo mumificirani pujski in zmanjšanje števila prasitev (povprečno znižanje je 1 pujske na gnezdo). Poviša se smrtnost po odstavitvi (povprečno za 9 %) in očitno se poveča število zdravljenj v čredi. Za drugo obdobje, ki traja 6 tednov, pa je značilno splošno izboljšanje zdravstvenega stanja črede. Kljub temu pa se še vedno pojavljajo mumificirani pujski in zmanjšano število prasitev. V drugem obdobju še vedno raste število zdravljenj. V tretjem obdobju opazimo padec v skupnem številu rojstev, in sicer zaradi kontinuiranega nizkega števila novorojenih pujskov in rastočega števila zdravljenj. Šele 26 tednov po okužbi zaznamo podobne rezultate produkcije kot pred okužbo.

Zaradi podobnosti kliničnih znakov z drugimi boleznimi lahko zanesljivo diagnozo postavimo le z laboratorijsko preiskavo. Z diagnostičnimi metodami lahko dokažemo protitelesa proti virusu PRRS, virusni antigen, virus PRRS ali kratek odsek virusnega genoma. Za dokaz virusa uporabljamo izolacijo virusa na celični kulturi, bodisi prašičjih alveolarnih makrofagov bodisi celični liniji MARC 145. Najzanesljivejša metoda je dokaz virusnega genoma z metodo RT-PCR kot tudi z metodo RT-PCR v realnem času. Virus se nahaja v tkivu pljuč, srca, ledvic, bezgavk, vranice kot tudi v serumu bolne živali. Okužbo v čredi lahko dokažemo tudi s serološkimi metodami, kot so test ELISA, indirektni imunofluorescenčni, indirektni imunoperoksidazni test, serum nevtralizacijski test.



Slika 62: Pujski v gnezdu, okuženi z virusom PRRS. Rodijo se normalni in zahirani pujski kot tudi mumificirani in mrtvi plodovi. Preživi zelo malo pujskov svinj, okuženih z virusom PRRS.

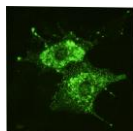


V preventivne namene lahko živali vakciniramo. Komerzialno dosegljiva cepiva niso najprimernejša, ker se hlevski izolati običajno razlikujejo od virusa, ki je v cepivu, tako da na ta način ne dosežemo zadovoljive zaščite. Treba je uporabljati cepivo z virusom, ki je podoben prisotnemu sevu virusa v hlevu, zato je zelo na mestu izdelava hlevske vakcine (priprava cepiva iz virusa, ki je prisoten v dotični reji). S cepljenjem plemenskih svinj lahko zaustavimo kroženje virusa v reji, kar privede do samoprekužitve in ozdravitve črede, pod pogojem izvajanja ustreznih veterinarskih zoohigijskih pravil (nadzorovan vnos živali v čredo, ločena reja plemenskih svinj od pitancev).

Okužbe z virusom PRRS so prisotne tudi v Sloveniji. Prisotnost okužbe so ugotovili v 40 % rej.

Dodatni študijski viri:

- King AMQ., Adams MJ., Carstens EB in Lefkowitz EL: Virus Taxonomy, 9th report of the ICTV. Elsevier, 2012, 796 – 8'05.
- Mankoč S. Molekularno-epidemiološke in biološke značilnosti virusov kužnega arteritisa kopitarjev: doktorska disertacija. Ljubljana: UL Veterinarska fakulteta, 2010: 351 str.
- Toplak I, Rihtarič D, Hostnik P, Grom J, Stukelj M, Valenčak Z. Identification of a genetically diverse sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Slovenia and the impact on the sensitivity of four molecular tests. J Virol Methods. 2012 Jan;179(1):51-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.09.019. Epub 2011 Oct 1.
- Mankoc S, Hostnik P, Grom J, Toplak I, Klobucar I, Kosec M, Barlic-Maganja D.: Comparison of different molecular methods for assessment of equine arteritis virus (EAV) infection: a novel one-step MGB real-time RT-PCR assay, PCR-ELISA and classical RT-PCR for detection of highly diverse sequences of Slovenian EAV variants. J Virol Methods. 2007 Dec;146(1-2):341-54. Epub 2007 Sep 12.



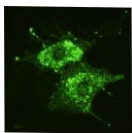
9

CORONAVIRIDAE

Splošne lastnosti koronavirusov

Družino *Coronaviridae* sestavljata dve poddružini: *Coronavirinae* in *Torovirinae*. Poddružino *Coronavirinae* sestavljajo trije rodovi: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* in *Gammacoronavirus*. Rod *Alphacoronavirus* sestavlja 8 vrst virusov, rod *Betacoronavirus* 7 vrst, *Gammacoronavirus* pa sestavljata dve vrsti, od teh je pomemben *Avian coronavirus*. Poddružino *Torovirinae* sestavljata dva rodova, v rod *Torovirus* so uvrščene za nas pomembne vrste: *Bovine torovirus*, *Equine torovirus* in *Porcine torovirus*. Coronaviruse lahko najdemo pri vseh domačih živalih pa tudi miših, podganah, netopirjih. V rod *Alphacoronavirus* so uvrščeni za veterinarsko medicino pomembne vrste, kot so pasji koronavirus, mačji koronavirus prašičji respiratorni koronavirus, transmissible gastroenteritis virus (TGE) pri prašičih in virus prašičje endemične diareje.

Rod/vrsta	Bolezen/simptomi	Prenos/vzorci
ALPHACORONAVIRUS		
<i>Feline coronavirus</i> (Slo. <i>Virus kužnega peritonitisa mačk</i>)	peritonitis, pljučnica, meningoencefalitis, bruhanje, anoreksija, povišana telesna temperatura	kontakt, fekalno-oralna pot / feces, kri, telesne tekočine
<i>Canine coronavirus</i> (Slo. <i>Koronavirus psov</i>)	blag gastroenteritis — diareja	fekalno oralna pot / feces, analni bris, jejunum
<i>Transmissible gastroenteritis virus pri prašičih</i> (Slo.: <i>Virus vnetja želodca in črevesja, TGE</i>)	gastroenteritis — vodena driska, bruhanje, dehidracija	Fekalno-oralna pot / feces, analni bris, jejunum
<i>Porcine respiratory coronavirus.</i> (Slo.: <i>Prašičji respiratorni koronavirus</i>)	intersticijska pljučnica — blago respiratorno obolenje	aerosol / nosni bris; ob sekciji pljuča
<i>Porcine endemic diarrhoea virus</i>	gastroenteritis, bruhanje, vodena driska	fekalno-oralna pot / feces, jejunum
BETACORONAVIRUS		
<i>Bovine coronavirus</i> (Slo. <i>Koronavirus goveda</i>)	gastroenteritis, diareje, dehidracija, respiratorno obolenje	fekalno-oralna pot, aerosol / feces, nosni bris, pljuča
<i>Equine coronavirus</i> (Slo. <i>Koronavirus konj</i>)	blaga diareja ali respiratorno obolenje	aerosol, feces, nosni bris
<i>Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus</i>	bruhanje, encefalomyelitis, anoreksija, tremor	aerosol, kontakt / nosni bris, tonzile, možgani, pljuča
<i>Gammacoronavirus</i>		
<i>Avian coronavirus</i> (Slo. <i>Koronavirus perutnine</i>)	traheobronhitis, nefritis, padec nesnosti	aerosol, kontak / trahealni bris, kloakalni bris, ledvica, cekum
<i>Turkey coronavirus</i> (Slo. <i>Koronavirus puranov</i>)	enteritis, diareja, depresija, cianoza kože	fekalno-oralna pot / feces, črevesje
<i>Duck coronavirus</i> (Slo. <i>Koronavirus</i>)	enteritis, diareja, depresija,	fekalno-oralna pot / feces,



<i>Koronavirus rac</i>)	cianoza kože	črevesje
<i>Goose coronavirus</i> (Slo. <i>Koronavirus gosi</i>)	enteritis, diareja, depresija, cianoza kože	fekalno-oralna pot / feces, črevesje
TOROVIRUS		
<i>Equine torovirus</i>	Blaga diareja	fekalno-oralna pot / feces, tanko črevesje
<i>Bovine torovirus</i>	enteritis, diareja, dehidracija	fekalno-oralna pot / feces, tanko črevesje

Preglednica 8: Razvrstitev virusov znotraj družine *Coronaviridae* pomembnih za veterinarsko medicino.

Morfološke značilnosti koronavirusov

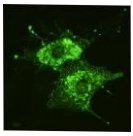
Virusi, uvrščeni v družino *Coronaviridae*, so sferične do pleomorfne oblike, velikosti od 120 do 200 nm v premeru, kapsida je helikalne oblike, ki jo obdaja proteinski sloj ikozaedralne oblike, premera do 65 nm. Na površini nukleokapside se nahajajo betičasti izrastki velikosti do 20 nm. Izrastki dajejo pod elektronskim mikroskopom videz krone, od tod tudi ime korona. Pri nekaterih vrstah, kot je goveji torovirus, je prisoten še dodaten sloj izrastkov, ki jih formira protein HE (hemaglutinacijski).

V rod *Betacoronavirus* spadajo goveji in konjski koronavirus in virus prašičjega encefalomyelitisa, kokošji in puranji koronavirusi pa so uvrščeni v rod *Gammacoronavirus*.

Razlike med rodovima *Koronavirus* in *Torovirus* nastopajo v velikosti genoma kot tudi v morfološkem videzu virusa. Torovirusi se od koronavirusov razlikujejo tudi morfološko, so bolj pleomorfne oblike, spominjajo na obliko ledvice, koronavirusi pa so bolj okroglasti. Poleg tega pa so torovirusi brez proteina E. Virus sestavljajo odvisno od vrste, trije ali štirje strukturni proteini. Nukleokapsido obdaja lipoproteinski plašč. V plašču koronavirusov se nahajata protein S (angl. *spike*), protein M (angl. *membrane*) in protein E (angl. *envelope*), pri nekaterih vrstah pa na površini najdemo še protein HE (angl. *hemagglutinin-esterase*), kar je značilno za vrste iz rodu *Betacoronavirus*. Nukleokapsida je helikalne strukture. Masa virusnega genoma je 60 kDa, torovirusov pa 18 kDa.

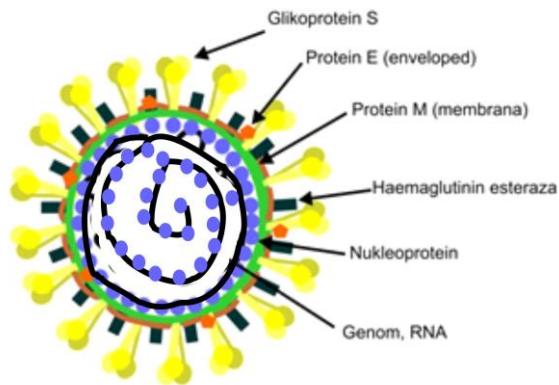
Protein S je močno imunogen in je odgovoren za vezavo virusa na celico. Zgrajen je iz štirih strukturnih domen; citoplazemske domene, transmembranske domene in dveh zunanjih domen, S1 in S2. Funkcije proteina S so vezava z receptorji na celici gostiteljici. Protitelesa proti proteinu S preprečujejo infekcijo. Citoplazemska domena sodeluje pri sestavljanju kijastih izrastkov in pri povezavi z drugimi virusnimi proteini. Transmembrana domena je zasidrana v lipoproteinski sloj plašča in je pritrjena na domeno S2. Domeni S1 in S2 povezujejo aminokisline, ki jih cepi encim tripsin. Protein S1 je zelo raznolik med različnimi sevi. Na proteinu S1 se nahajajo hipervariabilna področja, ki so posledica mutacij in rekombinacij. Protein S je odgovoren za vezavo virusa na celico, sodeluje pri vstopanju virusa v celico, saj sproži zlitje virusnega plašča s celično membrano, sproži tvorbo nevtralizacijskih protiteles. Monoklonalna protitelesa proti proteinu S nevtralizirajo virus. Funkcije proteina S so vezava na celično membrano, izzove nastanek nevtralizacijskih protiteles in celične imunosti kot tudi lepi eritrocite.

Protein M gradi od 225 do 260 aminokislin. Protein M formira lipoproteinski plašč in se po translaciji kondenzira na celični membrani. Ugotovili so, da se med brstenjem veže na

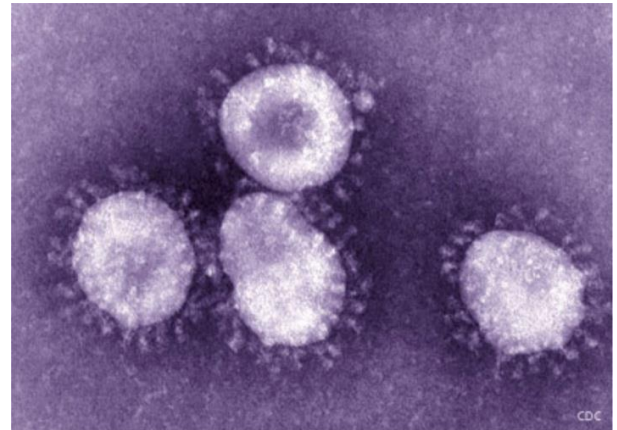


Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine

nukleokapsido. Protitelesa proti proteinu M ob prisotnosti komplekta nevtralizirajo virus. Potreben je za formiranje virusne ovojnice, je povezan z virusno nukleokapsido in inducira tvorbo alfa interferona.



Slika 63: Shematski prikaz koronavirusa.



Slika 64: Elektronsko mikroskopski posnetek koronavirusov (povzeto po <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>).

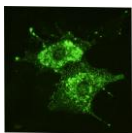
Glede na prisotnost oziroma odsotnost proteina HE (angl. *heamagglutinin-esterase*) so koronaviruse delili v dve antigenski skupini. Protein HE povzroča hemaglutinacijo in haemadsorbcijo eritrocitov. Protein HE vsebujejo koronavirusi, uvrščeni v antigensko skupino II (*Betacoronavirus*).

Protein E se ravno tako nahaja v ovojnici virusa, vendar v manjši količini. Njegova biološka funkcija je v tem, da sproži apoptozo celice, vključen je tudi v proces izstopanja virusa iz celice, ter formiranje veziklov ob izstopanju iz Golgijevega aparata.

Protein N (angl. *nucleocapsid protein*) gradi nukleokapsido, ki obdaja virusni genom. Nukleokapsida je pri torovirusih tubularne oblike. Protein N formira nukleokapsido in ščiti genom. Sodeluje pri podvajanju virusne RNA, med brstenjem virusov se veže na protein M. Protein N je imunogen, saj limfociti T prepoznajo antigenski peptid proteina N na površini okuženih celic.

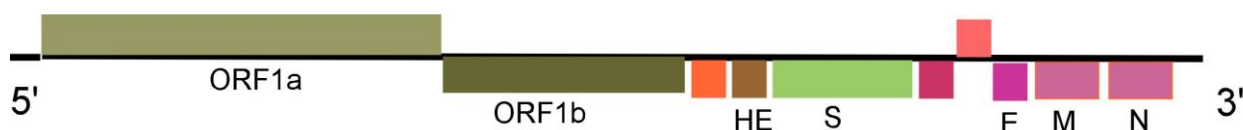
Virusni genom

Genom predstavlja pozitivno orientirana enovijačna RNA molekula, velikosti od 27 do 32 kb, 3' konec genoma je adeniliran, na 5' je nekodirajoča metilgvanozinska regija (kapa), na katero je pripet fosfoprotein N. Skupaj sestavljata dolgo helikalno nukleokapsido. Lahko deluje kot sporočilna RNA. Na obeh koncih genoma se nahaja nekodirajoče zaporedje (angl. *untranslated region*, UTR). Dve tretjini genoma zaseda gen za polimerazo. Genom je sam po sebi infektiven, ker je v funkciji mRNA. Na 5' koncu se nahajata bralna okvirja za polimerazo ORF1a in ORF1b (virusna od RNA odvisna RNA polimeraza) in proteaze, med obema bralnima okvirjema pa se nahaja mesto vezave na ribosom, sledijo geni za strukturne proteine v zaporedju S-E-M-N, nato sledijo še geni za



nestrukturne proteine. Na 5' koncu vsakega bralnega okvirja se nahaja transkripcijsko regulatorno zaporedje (TRS), ki je ključno pri nastajanju subgenomskih mRNA. Genomska RNA ima poliadenilacijski signal in je povezan s proteinom N, lahko deluje tudi kot mRNA. Med ORF1a in ORF1b se pojavlja od 7 do 18 nukleotidov dolg fragment, to so intergenska zaporedja (angl. *intergenic sequences*, IS), ki so homologna zaporedju na 3' koncu vodilnega zaporedja. Oba konca genoma se začneta z nekodirajočo regijo

Genom virusov iz rodu *Torovirus* imajo na 5' koncu bralni okvir za polimerazni gen, sledijo štirje geni za strukturne proteine. Vse genomske mRNA imajo na 5' koncu vodilno zaporedje, dolgo od 60 do 80 baz, ki je identično zaporedju na 5' koncu genomske RNA.

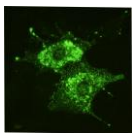


Slika 65: Shematski prikaz genoma koronavirusov. Bralna okvirja ORF1a in ORF1b predstavljata gen za encim replikazo (virusna polimeraza RNA), oznake HE, S, E, M in N predstavljajo gene za strukturne proteine ostalo pa so geni za druge nestrukturne proteine.

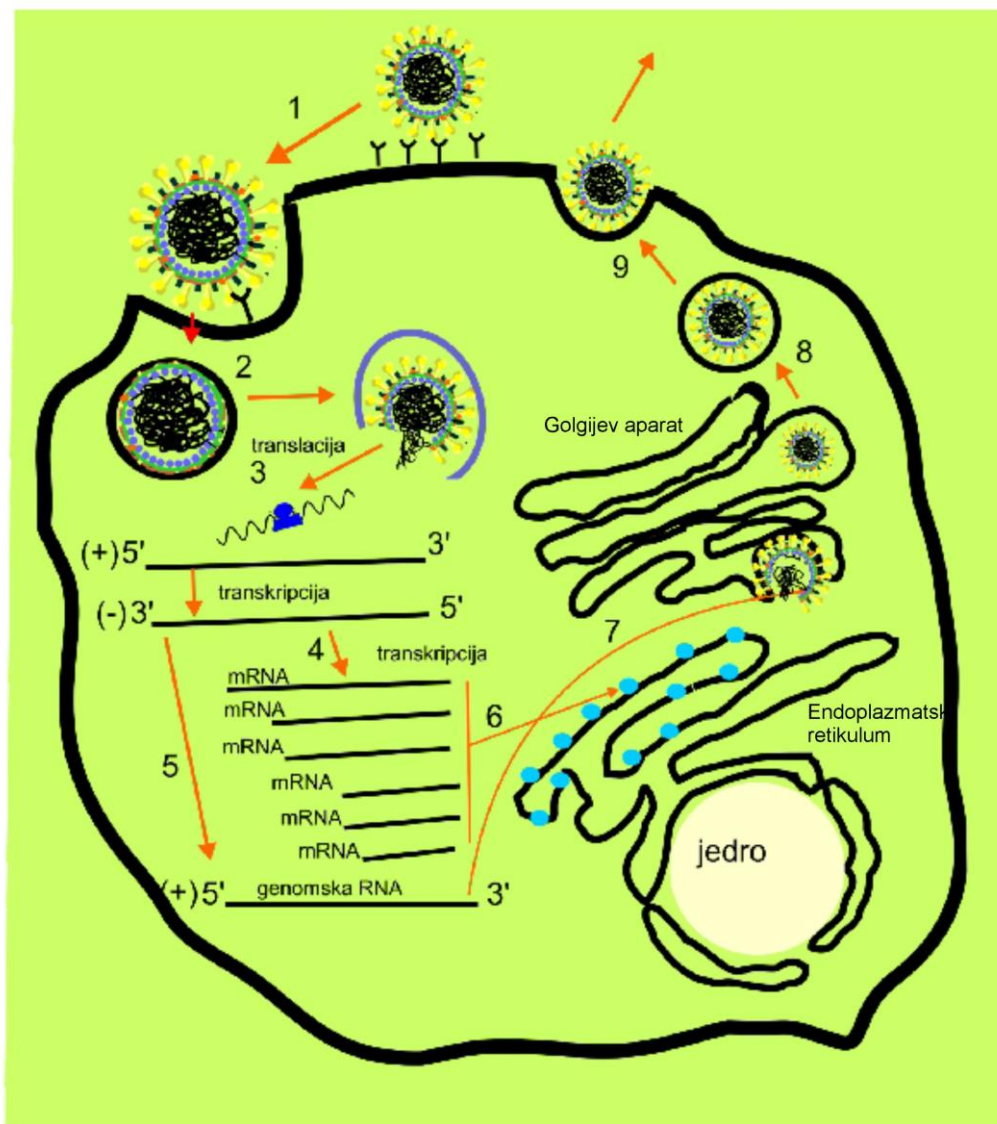
Koronavirusi so zelo podvrženi mutacijam. Te so posledica pomanjkljivega popravilnega mehanizma virusne polimeraze RNA. Zaradi velike hitrosti podvajanja genoma prihaja do izbrisov ali vstavljanja nukleotidov. Mutacije na genu za protein S, ki kodira epitope, odgovorne za nastanek nevtralizacijskih protiteles, lahko pripeljejo do nastanka novih sevov s tako spremenjenimi epitopi.

Pomnoževanje koronavirusov

Virusni partikel se pripne na celico gostiteljico z antigeni, ki se nahajajo na proteinu S, koronavirusi iz rodu Betakoronavirusov, ki imajo protein HE, pa se vežejo na *9-o-acetylated neuraminic acid* (Slo: acetil-nevraminska kislina). Pojavljajo se različni receptorji; to je odvisno od vrste živali. Kot receptor za alfa koronavirus nastopajo aminopeptidaze ali protein 229E za virus TGE in CCV (angl.: Canine coronavirus). Virusni plašč se zlije s celično steno, vstopi v celico s fuzijo in endocitozo. Takoj po vstopu v celično citoplazmo se genom, ki nastopa kot mRNA, pripne na ribosome, kjer poteka translacija, nastane encim od RNA odvisna polimeraza RNA (replikaza). Ta encim se vključi v prepis celotne, komplementarne negativno orientirane RNA. Novo sintetizirana replikaza prepiše celotni genom, tako da nastane negativno orientirana virusna RNA. Polimeraza RNA se med prepisovanjem ustavi na enem izmed intergenskih zaporedij in preskoči na 5'-konec vodilnega segmenta genomske RNA. Intergenska zaporedja tako omogočajo preskok polimeraze RNA med sintezo molekule RNA, negativne polarnosti. Ta molekula kot matrica služi za nastanek virusne +RNA, ki se ob izgrajevanju virusa vgradi v kapsido. Prav tako služi kot matrica za nastanek posameznih mRNA. Tako v nadaljnjem prepisovanju nastane od 5 do 7 različnih mRNA. Prepis ne poteka po celotnem genomu, tako da so novonastale mRNA različno dolge. Novonastale mRNA katalizirajo nastanek virusnih proteinov. Protein S se transportira do celične membrane in se vgradi v virus ob izstopanju iz celice. Protein M se po sintezi transportira do Golgijevega aparata, kjer se molekule združijo in pride do glikolizacije na aminokislini serin. Že pred vstopom v Golgijev aparat se strukturni proteini akumulirajo, protein N obda virusno nukleinsko kislino, zatem ga obdajo ostali



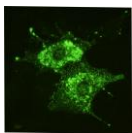
proteini. Posledica razmnoževanja virusa v celici je propad celice. Enterične seve koronavirusov je težko razmnoževati na celičnih kulturah. Antigeni odziv spodbujajo zlasti proteini S, HE, M in N.



Slika 66: Pomnoževanje koronavirusov: (1) vezava virusa na celične receptorje, (2) zlitje celičnega plašča s celično steno in vstop nukleokapside z endocitozo, (3) translacija virusne RNA na ribosomih, sinteza encima replikaze., (4) prepis cRNA in nadaljnji prepis v mRNA, (5), pomnoževanje virusne RNA, (6) translacija posameznih mRNA v proteine, (7) uvajanje virusne RNA v kapsido, (8) glikolizacija površinskih beljakovin, (9) izstopanje virusa iz celice.

Diagnostika koronavirusnih infekcij

Okužbe s koronavirusi lahko dokazujemo z dokazovanjem virusa, dela virusa ali specifičnih protiteles. Izolacija virusa na celični kulturi ni najprimernejša metoda, ker se neadaptirani terenski sevi slabo podvajajo na teh sistemih. Uporabljajo se metode za dokazovanje virusnega antigena, kot je test ELISA. Najuporabnejše so molekularne metode, s katerimi lahko ugotavljamo genomsko



RNA virusa direktno v vzorcih tkiva ali brisov. Prvi korak je izolacija RNA, prepisovanje genomske RNA v komplementarno DNA ter pomnoževanje komplementarne DNA z metodo PCR. Naslednji korak je analiza produktov metode RT-PCR.

Nekateri vzorci tkiv ali vzorci blata lahko vsebujejo inhibitorje, ki zavrejo delovanje encima polimeraze DNA in s tem znižajo občutljivost metode RT-PCR. Specifičnost in občutljivost metode je odvisna od izbora začetnih oligonukleotidov. Par začetnih nukleotidov je treba izbrati tako, da se prilegata na območje genoma, ki je ohranjeno pri vseh sevih posameznega virusa. Pri koronavirusih je to običajno na genu za protein N in M. Koronavirusi imajo visoko frekvenco mutacij, zato je razvrščanje ugotovljenih virusov znotraj vrste v genotipe zelo pomembno, saj med posameznimi genotipi nastopajo velike razlike v patogenosti. Razvrščanje izoliranih virusov v genotipe se opravlja s primerjavo zaporedij nukleotidov. Običajno se v ta namen uporablja primerjava zaporedij na genu S1.

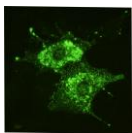
Koronavirusne infekcije pri prašičih

Pri prašičih se pojavljajo tri vrste koronavirusov: virus transmisibilnega gastroenteritisa (angl. *porcine transmissible coronavirus*, virus TGE), prašičji respiratorni koronavirus (angl. *porcine respiratory coronavirus*, virus PRC) in virus prašičje endemične driske (angl. *porcine endemic diarrhea virus*) ter virus prašičjega encefalomielitisa (angl. *porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus*), ki je uvrščen v rod *Betacoronaviridae*.

Vrsta: Virus vnetja želodca in črevesja (TGE) in prašičji respiratorni koronavirus (angl. *Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus, PRCV*)

Ti epitelotropni virusi imajo afiniteto do epitelnih celic respiratornega ali gastrointestinalnega trakta. Najbolj dovzetni so sesni pujski. Virus vstopi v organizem običajno po fekalno-oralni poti. Inkubacija traja le od 18 do 72 ur. Virus pasira želodec, ker je pH pri pujskih višji kot pri odraslih živalih. Razmnoži se v enterocitih tankega črevesja, zaradi tega propadejo resice in s tem se zmanjša zmožnost resorpcije, posledica tega pa je pojav profuzne diareje. Ob izbruhu bolezni je zaznan zelo visok pogin zlasti pri pujskih, starih do 3 tednov. Bolni pujski bruhamo, prisotna je profuzna driska, izgubijo težo, so dehidrirani. Pri odraslih živalih poteka bolezen običajno v milejši obliki, molzne svinje pa izgubijo mleko. Živali se običajno okužijo po peroralni poti. Virus se namnoži v epitelnih celicah intestinalnega trakta, zlasti v tankem črevesju. Patohistološko je vidna izguba resic, posledica je slabša resorpcija. Pred okužbo delujejo protitelesa skupine IgA zaščitno. Zaradi izgube elektrolitov prihaja do dehidracije in acidoze.

Bolezen lahko diagnosticiramo s preiskavo histološke rezine črevesja; z imunofluorescentnim ali imunoperoksidaznim testom, uporabljamo tudi test izolacije virusa na celični kulturi in test RT-PCR, s katerim je mogoče razlikovati TGEV od PRCV. Živali, ki so okužbo preživele, imajo prisotna specifična protitelesa proti virusu TGE. Virus PRC je zelo podoben virusu TGE, vendar ima ta na genu za protein S delečko, zaradi tega se protein S tako spremeni, da se ne veže na enterocite črevesja. Respiratorna oblika virusa povzroča blage, pogosto neopazne znake obolenja, okužena žival pa prav tako tvori specifična protitelesa. Protitelesa proti respiratorni obliki TGE nevtralizirajo enterično obliko virusa TGE. Za preprečevanje bolezni je zelo pomembno, da so matere prekužene, in tako s kolostrumom dajejo zadostno zaščito pred okužbo pujskom.



V Sloveniji TGE trenutno ni prisoten, izkoreninili so ga v osemdesetih letih prejšnjega stoletja, močno pa je razširjen PRCV.

Vrsta: Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus

Ta virus so ugotovili v Kanadi, v Sloveniji ga do zdaj še niso ugotovili. Najbolj so prizadeti pujski, mlajši od 3 tednov. Značilno je bruhanje takoj po sesanju, depresija in pogosti pogini, pojavijo se tudi nevrološki znaki bolezni. Razmnožuje se v tonzilah, pljučih, črevesju, in se po perifernem živčevju širi do možganov. Bruhanje je posledica infekcije senzornih ganglijev nervusa vagusa in ne infekcije želodčne sluznice. Cepiva ni na voljo.

Vrsta: Porcine endemic diarrhea virus

Klinični znaki bolezni, ki jih povzroča ta virus, so povsem podobni okužbam z virusom TGV. Virus je manj kontagiozen. Virus so ugotovili v Aziji pa tudi v Evropi, a ne v Sloveniji.

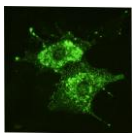
Vrsta: Goveji coronavirus (angl. *Bovine coronavirus*)

Goveji coronavirus lahko povzroča različne oblike obolenja pri govedu. Spada v rod *Alphacoronavirus*. Goveji coronavirus so ugotovili tudi pri človeku in psu. Izolati so razdeljeni v dve genetski skupini. Izrazi se v obliki hude diareje, ki se pojavlja zlasti pri teletih, pri odraslih pa se pojavi tudi respiratorno obolenje. Obolevnost je do 100-odstotna, smrtnost pa od 1 do 5-odstotna. Zaradi poškodb epitelnih celic intestinalnega trakta bolna teleta dehidrirajo, izgubljajo vodo in elektrolite, metabolizem glukoze in laktoze se poruši. Posledica tega je zastoj srca in hiter pogin. Virus se razmnožuje tudi v epitelih celicah respiratornega trakta in povzroča pljučnice. Najbolj so dovzetna teleta v starosti od 1 do 3 tednov. Bolna žival izloča virus z izdihanim zrakom in fecesom. Cepiva ne dajejo najboljših rezultatov, pomembno je napajanje telet s kolostrumom krav, ki so bolezen prebolele, da dobijo zadostno zaščito. Povzroča zimsko drisko, za katero zbolijo tudi odrasla goveja živina. Kaže se v obliki hude, pogosto tudi hemoragične driske. Obolevnost v čredi je običajno blizu 100-odstotna, smrtnost pa do 2-odstotna.

Vrsti: Virus kužnega peritoneitisa mačk (angl. *Feline coronavirus* in *canine coronavirus*)

Coronavirusi mačk so razdeljeni v dve skupini. Serotip 1 ima večjo afiniteto do razmnoževanja v makrofagih, serotip 2 pa je bolj soroden pasjemu koronavirusu in je tipičen enterotropen virus, vendar oba serotipa lahko povzročata kužni peritonitis pri mačkah. Virus se razmnožuje v monocitih in makrofagih okuženih živali. Na visceralnih organih bolnih mačk najdemo sivobeke vozličke v premeru do 5 mm. Mačke so prve dni po rojstvu zaščitene z maternalnimi protitelesi. Virus se razmnožuje tudi v celicah prebavnega trakta, se pa z makrofagi in monociti raznese tudi v ostale organe. Imunski kompleksi in vnetni procesi (komplemen) poškodujejo stene kapilar, izstopa serofibrin, posledično prihaja do nabiranja peritonealne tekočine. Prizadet je imunski sistem. V trebušni votlini se pojavi transudat. Humoralna imunost ne zaščiti živali pred reinfekcijo. Coronavirus psov povzroča blaga vnetja prebavil, virus je zelo razširjen, prizadene pa predvsem mlade psičke.

Presejalna diagnostika obeh okužb se lahko izvaja s hitrimi lateral flow testi že v sami ambulanti. Zanesljivo diagnostiko in tipizacijo opravimo z metodo RT-PCR in določitvijo nukleotidnega zaporedja običajno na genu za protein S. Vzorec krvi, blato, rektalni bris ali nosni bris so primerni materiali za izvedbo diagnostike.

**Vrsta: Virus kužnega bronhitisa perutnine (angl. *Avian coronavirus*)**

Znotraj te vrste je poznanih več genotipov virusa, ki se med seboj razlikujejo tudi v stopnji patogenosti. Najbolj so dovzetni piščanci v starosti do 4. tednov. Inkubacija je lahko izredno kratka, tudi samo od 18 do 24 ur. Virus se najprej namnoži v epitelni celici gornjih dihalnih poti, sledi viremija. Najbolj so prizadete ledvice, ovarijski in ovidukt. Najdlje se virus ohranja v cekumu, tako da ga v fecesu lahko dokažemo še do 20 tednov po infekciji. Virulentni sevi povzročijo oteženo dihanje, pojavi se nazalni eksudat in diareja. Smrtnost lahko doseže tudi do 75 % vhlavljenih piščancev. Virus se razmnožuje v respiratornem traktu, povzroča poškodbe ledvic pa tudi črevesja. Virus lahko dokažemo v vzorcih ledvic, burze fabricije in epitelni celici traheje. Zaradi poškodb reproduktivnega trakta pri nesnicah imajo jajca bolnih kokoši tipično voden beljak. Okužba se širi v jati preko aerosola in s kontaktom. Virus izoliramo z aplikacijo kužnine v alantoisno vrečo oplojenega kokošjega jajca, zelo primerna je metoda RT-PCR. Obolenje lahko preprečimo s cepljenjem enodnevnih piščancev. Uporabljamo atenuirana cepiva. Cepivo se inokulira preko pitne vode, z aerosolom ali z aplikacijo intraokularno.

Vrsta: Koronavirus puranov (angl. *Turkey coronavirus*)

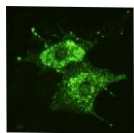
Večje razlike med puranjim in kokošjim koronavirusom nastopajo v proteinu S, sicer pa ima nukleotidno zaporedje genov za polimerazo in proteine N in M 85 do 90-odstotno sorodnost. Koronavirus puranov je blago patogen tudi za kokoši. Poznan je samo en serotip. Virus se razmnožuje prvenstveno v epitelni celici jejunuma in duodenuma. Klinični znaki bolezni so diareja, dehidracija, apatija in izguba teže. Najbolj so prizadeti purani v prvem tednu starosti.

Rod: Torovirus

Poznane so torovirusne (Breda virus) infekcije pri govedu in kopitarjih. Obolenje se kaže v obliki blage diareje. Okužba je močno razširjena.

Dodatni študijski viri:

- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B in Lefkowitz, E. L: Virus Taxonomy, 9th report of the ICTV. Elsevier, 2012, 153–161.
- Krapež Uroš. Molekularno ozadje slovenskih izolatov virusa kužnega bronhitisa: doktorska disertacija. Ljubljana: UL Veterinarska fakulteta, 2008: 113 str.
- Maclachlan NJ, Dubovi EJ. Fenner's veterinary virology. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011



VIRUSI S SEGMENTIRANIM POZITIVNO ORIENTIRANIM RNA GENOMOM

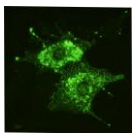
10 RETROVIRIDAE

Splošne lastnosti in klasifikacija retrovirusov

Ime »retro« izhaja iz reverzne transkriptaze (od RNA odvisna polimeraza DNA), ki se nahaja znotraj virusa. Mnogi od teh virusov, ki so sposobni transformacije okuženih celic, povzročajo levkemije, limfomatoze in sarkome pri mnogih živalskih vrstah.

Družino sestavljata poddružini *Orthoretrovirinae* in *Spumaretrovirinae*. Poddružino *Orthoretrovirinae* sestavlja sedem rodov: *Alpharetrovirus* (avian leukosis virus), *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus* (bovine lavkosa virus), *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* (caprine arteritis, MAEDI/VISNA, HIV) in *Spumavirus*. Klasifikacija virusov je opravljena na osnovi razlik genoma posameznih izolatov in antigenske strukture virusa. Virus vsebuje lastno transkriptazo: od RNA odvisna polimeraza DNA, ki ima funkcijo prepisa RNA v DNA. Virusna DNA se integrira v celični kromosom kot provirus. Nekateri retrovirusi so onkogeni, mnogi od njih povzročajo latentne infekcije. Prisotnost virusnega genoma v celici sproži motnjo kontrole celične rasti, s tem da vpliva na rastne faktorje ali na celične transkriptaze. Viruse hitro inaktivirajo detergenti, so pa bolj odporni na svetlobo UV kot ostali virusi.

Poddružina / Rod	Vrsta	Gostitelj	Bolezen
ORTHORETROVIRINAE			
Alpharetrovirus	<i>Avian leukosis virus</i> (Slo:virus levkoze pri perutnini)	piščanci	Levkemija
	<i>Avian carcinoma virus 2</i> (Slo. Virus karcinoma perutnine)	perutnina	Limfomi, sarkomi
	<i>Avian myeloblastosis virus</i> (Virus myeloblastoze perutnine)	perutnina	
	<i>Avian myelocithomatosis virus</i> (Slo: Virus myelocistomatoze perutnine)	perutnina	
	<i>Avian sarcoma virus</i> (Slo. Sarkoma virus perutnine)	perutnina	
Betaretrovirus	<i>Mause mammary tumor virus</i>	miši	
Deltaretrovirus	<i>Bovine leukemia virus</i> (Slo. Virus goveje enzootske levkoze)	govedo	Levkemija
Epsilonretrovirus	<i>Walleye dermal sarcoma virus</i>		
Gammaretrovirus	<i>Feline leukemia virus</i> (Slo. Virus mačje levkemije)	mačka	FeLV, sarkom
	<i>Porcine typeC oncovirus</i>	prašič	
	<i>Bovine immunodeficiency virus</i>		
Lentivirus	<i>Caprine arthritis encephalitis virus</i> (Slo. Virus kozjega artritisa in encefalitisa)	koza	Artritis
	<i>Equine infectious anemia virus</i> (Slo. Infekciозна anemia kopitarjev)	konj	IAK
	<i>Feline immunodeficiency virus</i>	mačka	Mačji AIDS

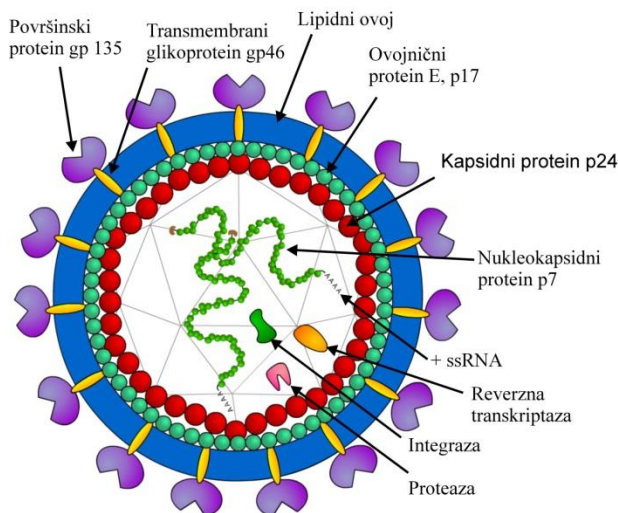


	(Slo. <i>Virus imunske pomanjklivosti mačk</i>) (Slo. <i>Virus imunske pomanjklivosti mačk</i>)		
	<i>Visna/Maedia virus</i>	Ovca/koza	Maedi/visna
SPUMARETROVIRINAE			
<i>Spumavirus</i>	<i>Bovine foamy virus</i>	govedo	
	<i>Equine foamy virus</i>	konj	
	<i>Feline foamy virus</i>	mačka	

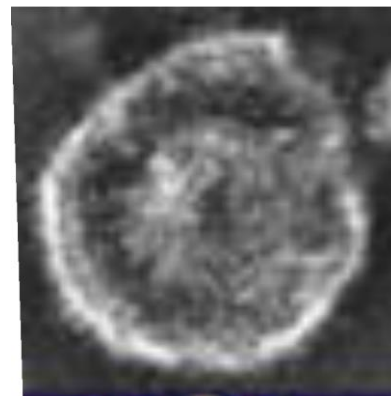
Tabela 8: Razvrstitev virusov znotraj družine *Retroviridae*

Morfološke lastnosti retrovirusov

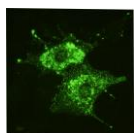
Virusi iz družine *Retroviridae* so okroglaste oblike s premerom 80 do 100 nm, vsebujejo lipoproteinsko ovojnico. Pod elektronskim mikroskopom je viden troslojni plašč. Na površini se nahajajo proteinske molekule s katerimi se vežejo na celico, znotraj ovojnice pa je virusna nukleokapsida ikozaedrične strukture. Znotraj nukleokapside se poleg genoma nahaja tudi reverzna transkriptaza, encima integraza in proteaze. Na lipoproteinski ovojnici se nahajata dva glikolizirana proteina gp135 in transmembrani protein gp46. Površinski protein gp135 je glikoliziran in sestavlja zunanje izrastke ovojnice in je tarča tako za nevtralizacijska protitelesa kot za receptorje na površini celic. Protein gp46 se z enim koncem veže na protein gp 135 z drugim pa je vsidran v lipidni dvosloj. Transmembrani glikoprotein gp46 je zasidran v lipidni sloj plašča in je vezan z površinskim glikoproteinom gp 135. Kapsidni protein p24 je močan antigen, tako da lahko pri okuženi živali ugotovimo protitelesa proti temu proteinu. Ta dva proteina sta ključna za vezavo virusa na tarčno celico.



Slika 67: Shematski prikaz retrovirusov



Slika 68: Elektronsko mikroskopski posnetek retrovirusov



Genom retrovirusov

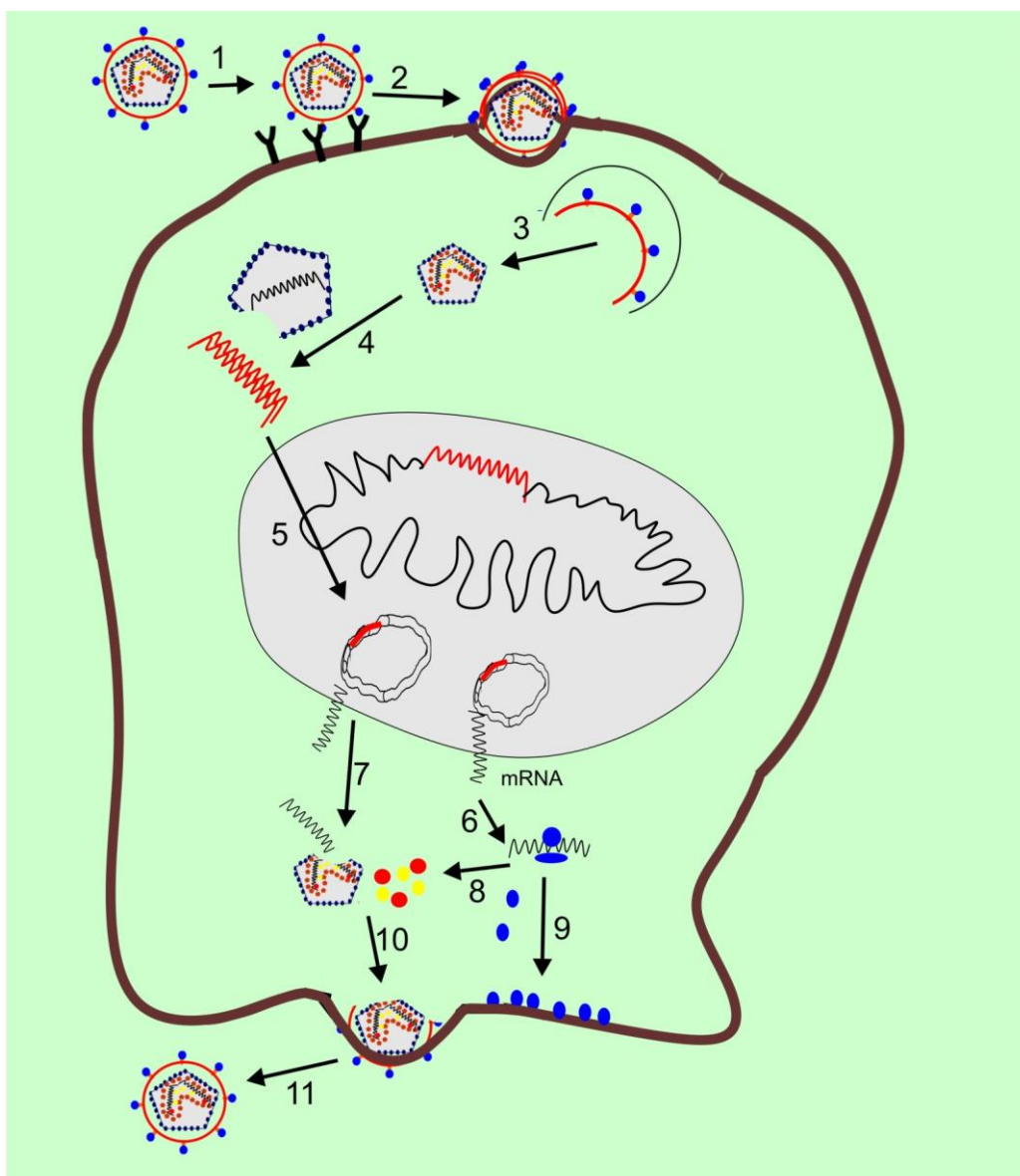
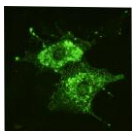
Genom sestavljata dve identični molekuli pozitivno orientirane RNA, sta nekovalentno povezani preko vodikovih vezi na 5' koncu - diploidni genom. Vsak haploidni segment genoma je linearna pozitivno orientirana ssRNA molekula, ki pa nima funkcije mRNA takoj po infekciji. Na obeh koncih genoma se nahajata enaki nekodirajoči regiji (regija R, angl.: repeat) in še kratki nekodirajoči regiji, ki sta na 5' koncu in 3' koncu različni. Genom Retrovirusov je edinstven iz mnogih razlogov:

- edini virus, ki ima diploidni RNA genom
- virusno RNA sintetizirajo encimi celice
- pozitivno orientirana RNA virusa ne nastopa kot mRNA
- ima lastno reverzno transkriptazo

Genom retrovirusov vsebuje tri ali štiri najpomembnejše gene za strukturne proteine, vsak od njih kodira dva ali tri proteine. Gen **gag** (angl: group-specific antigen) kodira nukleokapsidne proteine matriksa in kapsidni protein, ki nosijo oznake p14 (protein matriksa), p7 (nukleokapsidni protein), p24 (kapsidni protein), gen **pro** kodira encim proteazo, gen **pol** kodira encim reverzno transkriptazo, integrazo, proteinazo ter gen **env** (angl. envelope) kodira glikoproteine virusne ovojnice (gp 135/140 in gp46) ki so nujni pri vezavi virusa na gostiteljsko celico. Geni gag, pol in env so skupni vsem retrovirusom, najbolj se razlikujejo pri lentivirusih. Sledijo še geni za nestrukturne proteine z oznakami **tat**, nastopa kot transaktivator celične RNA polimeraze., gen **rev**, ki kodira proteine ki so vključeni v transport iz jedra v citoplazmo in gen **vif**, potreben za replikacijo virusa v makrofagih. V fazi translacije posamezni gen kodira poliprotein, ki se nato cepi v posamezne proteine. Nekodirajoče regije na obeh koncih genoma so ključne za pomnoževanje virusa

Pomnoževanje retrovirusov

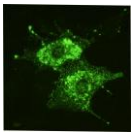
Retrovirusi vsebujejo dve pozitivno orientirani RNA molekuli, vendar ta ne deluje kot sporočilna RNA tako kot pri pikornaviridih, ampak jo virusna transkriptaza prepíše v RNA-DNA hibridno molekulo. Pomnoževanje virusa poteka tako v citoplazmi kot jedru celice. Virus se veže na površino celice s površinskim proteinom. Receptorji na celici so dokaj vrstno specifični, lahko so to tudi MHCII molekule na površini celice. Pomnoževanje virusa se prične z vstopom virusa skozi celično steno v celico, plašč virusa se zlije s celično steno. Še v kapsidi, ob aktiviranju virusne transkriptaze RNA veriga poteče prepis. Nastane hibrid RNA-DNA na katero deluje ribonukleaza H, ki oddvoji RNA, tako da se po prepisu DNA polimeraze sintetizira druga veriga DNA. Novonastala dvojnovijačna DNA ali tako imenovana provirusna DNA se transportira v jedro celice in se vgradi v celično DNA, v celični kromosom. V celici je tudi prisotne nekaj izvenkromosomske virusne DNA. Vgrajevanje virusne DNA sproži virusna integraza. Provirus je tako matrica za prepis v celoten virusni genom in v mRNA molekule. mRNA se nato na ribosomih prevede v proteine Gag, Pro, Env in Pol. Prepisovanje poteče ob aktiviranju celične RNA polimeraze. V inficirani celici najdemo provirusno DNA, ki se lahko nahaja v linearni ali cirkularni obliki. Ta dvojnovijačna virusna DNA postane cirkularna in se vgradi v kromosomsko DNA celice in se tam uporabi za transkripcijo tako celotnega genoma kot virusnih mRNA. Provirusni genom se pomnožuje skupaj s celico. In šele sedaj se more začeti pomnoževanje virusnih partikov. To poteka po poznanem postopku ob pomoči celične DNA polimeraze in sintezo mRNA preko katere se sintetizirajo virusne beljakovine in virusna RNA. Virusni glikoproteini se vgradijo v celično membrano, kapsidni in nukleokapsidni proteini se kondenzirajo, kamor povlečejo še virusni genom. Virus dobi ovojnico ob izstopanju iz celice z eksocitozo



Slika 69: Pomnoževalni krog retrovirusov: (1) Vezava virusa na celične receptorje, (2) penetracija virusa v celično citoplazmo (3) Sproščanje nukleokapside iz endosoma, (4) prepis molekule RNA v komplementarno DNA poteče znotraj nukleokapside ob vključitvi lastne transkriptaze, (5) prenos virusne DNA v jedro celice in integracija virusne DNA v celični kromosom s pomočjo encima integraze, (6) tvorba mRNA in vezava mRNA na ribosome, (7) prepis genoma znotraj celičnega jedra, (8) sinteza kapsidnih proteinov (9) sinteza proteinov ovojnice in njihov prenos na celično membrano (10) uvajanje virusnega genoma v kapsido, (11) izstopanje virusa iz celice

Rod: *Alpharetrovirus*

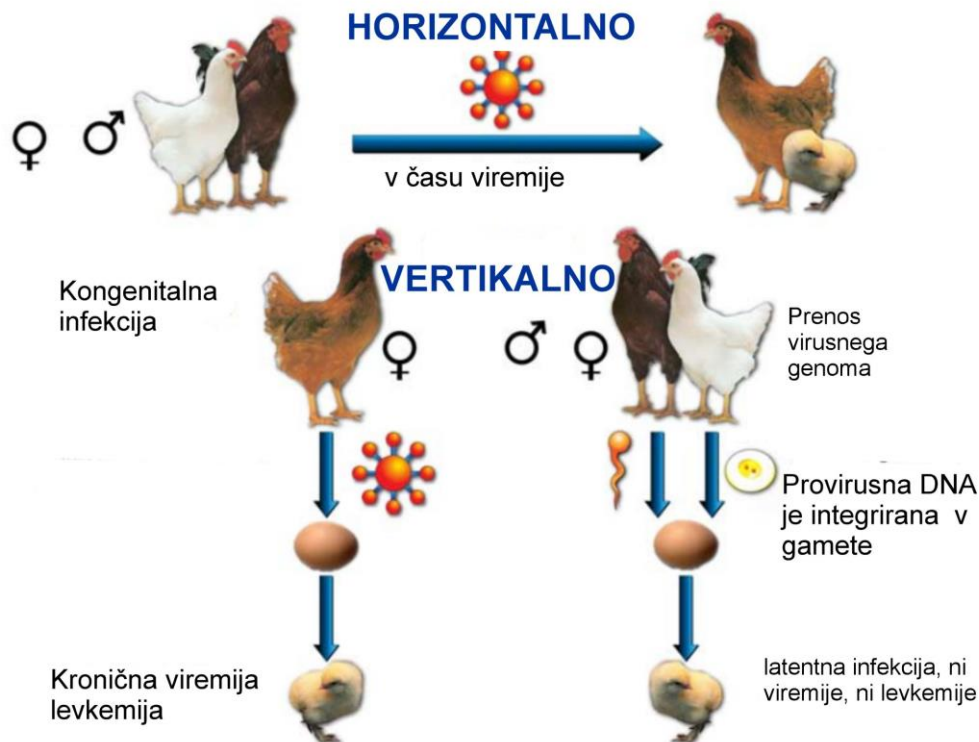
Vrsta: Virus aviarne levkoze (angl. *Avian leukosis virus*)



Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine

Virus povzroča limfoidno levkozo perutnine (sinonimi: visceralna limfomatoza, big liver disease). Okužbe so razširjene v populaciji perutnine po celem svetu, okuženih je do 20% jat. Virus je uvrščen v rod *Alpharetrovirus* in ga sestavlja 5 različnih tipov (A, B, C, D, E), ki se razlikujejo po antigenskih lastnostih. Virus povzroči onkogeno transformacijo limfocitov B. Okužba se prenaša vertikalno preko okuženih jajc in horizontalno v prvih dneh po rojstvu. Virus je nosilec genov onkogenih proteinov, ki zavirajo apoptozo in s tem smrt okužene celice. Okuženi piščanci so

Model prenosa virusa levkoze perutnine



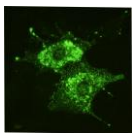
perzistentno viremični, ker se razvije imunotoleranca na virus. Virus izločajo s slino in fecesom. Ciljne celice virusa so limfoblasti in busra Fabricia. Burseektomija prepreči razvoj limfoidne levkoze. Prihaja do limfoidne infiltracije notranjih organov: jetra, ledvica, vranica, Bursa fabricia. V nekaterih oblikah prihaja do proliferacije osteoblastov.

Slika 70: Model prenosa virusa aviarne levkoze v naravi.

Rod: *Deltaretrovirus*

Vrsta: Virus goveje enzooske levkoze (angl. *Bovine leukemia virus*)

Virus povzroča obolenje z imenom Goveja levkoza ali Enzootska goveja levkoza (EGL). Za ta virus za razliko od ostalih virusov uvrščenih v družino *Retroviridae* je značilno da nima velike genetske heterogenosti. Pozasnih je 7 različnih genotipov virusa EGL, ki so geografsko razporejeni po vseh celinah. Gre za sistemsko počasi se razvijajoče obolenje z visoko stopnjo smrtnosti, kaže pa se v obliki maligne neoplazije retikuloendotelnega sistema. Izvor infekcije je okuženo govedo. Inkubacija traja od 1 do 8 let in samo do 5% okuženih živali razvije limfosarkom B-limfocitov, pri ostalih pa se razvije kronična limfocitoza. Virus se nahaja v limfocitih. Virus ima tropizem do limfatičnega tkiva,



zlasti do limfocitov B, je pa tudi v limfocitih T (CD8), monocitih in granulocitih. Virus je izven limfocitov zelo občutljiv na vplive okolja, temperatura pri 60 °C ga uniči v 15 minutah. Poleg krvi je izvor okužbe tudi kolostrum, mleko, bronhoalveolarni izpirek, in sperma okuženega bika. V kužnini mora biti dovolno število inficiranih levkocitov. Okužba se prenaša s tesnim kontaktom, z limfociti, transfuzijo, poškodbami, iatrogeno in artropodi. Najpogostejši prenos virusa je ob neupoštevanju »lege artis« zahtev veterinarske prakse, ob vakcinacijah, tuberkulinizacijah, odvzemu krvi, kastracijah, tetoviranju porodi. Govorimo o iatrogenem prenosu, zlasti zaradi uporabe nesterilnih igel. Mogoči prenašalci okužbe so tudi hematofagi insekti. Prenos je tudi vertikalni; preko placente ali kolostruma vendar zbolijo le 10% živali. Za pomnoževanje virusa predstavljajo limfociti B ciljne celice. Poznamo prelevkemično in levkemično oziroma tumorsko fazo bolezni. Obolenje lahko razdelimo v dve fazi: prelevkemično in levkemično. V prelevkemični fazi se 3 tedne po okužbi že pojavijo specifična protitelesa proti virusu EGL. V drugi fazi pride do povečanja limfocitov-limfocitoza. Pojavijo se tumorji na limfatičnih bezgavkah, te se lahko tako povečajo, da vplivajo na funkcijo notranjih organov. Smrt nastopi običajno zaradi ruhture vranice. Klinični znaki niso jasni, žival počasi hujša. Pri 1-2% živali pa pride do proliferacije in do limfosarkoidoze. Obolenje se kaže v izgubi teže, padcu mlečnosti, anoreksiji, kar je odvisno od poškodovanih organov.

Po okužbi je možno, da žival ne zbolijo - genetsko rezistentne živali. Infekcija teče asimptomatsko, 4 do 10 tednov po okužbi se pojavijo specifična protitelesa proti virusu EGL. Le 5% okuženih živali zbolijo za limfosarkomom, ostale imajo stalno limfocitozo. Do pojava specifičnih protiteles prihaja že v prelevkemični fazi, vendar ne prej kot 3 tedne po infekciji. Najbolj imunogen je protein E (envelope). Tipična oblika subklinične oblike leukoze je limfocitoza. Pri dovzetni skupini živali prihaja do benigne proliferacije limfocitov B – takšna žival je perzistentni in permanentni nosilec virusa.

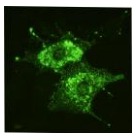
V laboratorijski diagnostiki uporabljamo test ELISA in test AGID (agar gel imunodifusion test) za dokaz protiteles proti virusu EGL. Važna antigena sta proteina gp51 in gp24, ki se uporabljata pri pripravi antigena za AGID test. V testu ELISA uporabljamo monoklonalna protitelesa proti gp51 proteinu kar daje specifične rezultate. Cito-morfološke preiskave periferne krvi so zelo uporabna podpora diagnostična metoda. Virus se na celičnih kulturah replicira počasi in pogosto neuspešno, lahko pa v levkocitih bolne živali dokažemo virusno nukleinsko kislino z metodo PCR (provirusni genom). Prednost te metode je, da lahko pomnožene segmenta genoma uporabimo v molekularni karakterizaciji virusa.

EGL je razširjena po vseh celinah sveta. V Sloveniji so serološko diagnostiko uvedli v 80 letih 20. stoletja. Z izločanjem serološko pozitivnih živali so bolezen Sloveniji izkoreninili, tako da ima Slovenija od leta 2010 dalje status države proste EGL.

Rod: *Gammaretrovirus*

Vrsta: Virus mačje levkemije (angl. *Feline leukemia virus (FeLV)*)

Virus FeLV je uvrščen v rod *Gammaretrovirus*. Kot za vse retrovire je tudi za FeLV značilno, da se virusni genom integrira v celični kromosom prenaša na hčerinske celice v fazi delitve celic. Ta sposobnost vgraditve virusnega genoma je najpomembnejši faktor doživljenjske prisotnosti virusa v inficiranih celicah kostnega mozga. Virus se iz mačke na mačko prenaša tudi horizontalno. Znanе so štiri podskupine virusa: FeLV-A, FeLV-B in FeLV-C in FeLV-T. FeLV ima gen gag, pol in env. Gag gen kodira strukturne virusne proteine kot so p15c, p12, p27 in p10. Protein p27 se nahaja v inficiranih celicah, pa tudi v krvni plazmi, zato prisotnost tega proteina v krvi izkoriščamo v diagnostične namene, lahko ga dokazujemo s testom ELISA. Ciljne celice so makrofagi, limfociti in



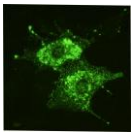
nezreli enterociti. Za to obolenje je značilna huda anemija, virus deluje imunosupresivno zaradi uničevanja limfocitov B in T, prisoten je enteritis in težave z reprodukcijo. Dovzetne so divje in domače mačke. Mačke se okužijo običajno po oronasalni poti. Inkubacija traja od 6 tednov pa do 3 let. Mačke s protitelesi proti FeLV ne razvijejo viremije in ne izločajo virusa. Virus se najprej namnoži v lokalnem limfoidnem tkivu. V fazi viremije se raznese v ostale organe in se razmnoži v vranici, limfatičnem tkivu kot so bezgavke in kostni mozeg. Protein P27 je vrstno specifičen. Protein Gp70 je ključen za vezavo virusa na celične receptorje. Na osnovi razlik v proteinu gp 70 je vrsta FeVL razdeljane v štiri skupine. FeVL tip A, ki je za mačke najubolj patogen povzroča maligne spremembe in se prenaša s kontaktom. Virus je izven levkocitov izredno občutljiv na vplive okolja in razkužil. Na sobni temperaturi ne preživi dlje kot 24 ur. Virus se razmnožuje v leukocitih, bolna žival pa ga nepretano izloča s slino, solzami. Sarkomatozne spremembe se pojavijo po bezgavkah ter parenhimskih organih.

FOCMA antigen (angl.: feline oncornavirus cell membrane antigen) to je tumor specifični antigen ki je prisoten le v steni celic okuženih z virusom FeLV. Živali s FOCMA protitelesi so rezistentne na razvoj levkemije ali limfoma čeprav so lahko pozitivne na FeLV. Ta protitelesa ne neutralizirajo virusa, preprečijo pa razvoj rakavih sprememb. Perzistentno inficirane mačke nosijo specifična protitelesa, virus je prisoten v limfocitih. Vse vrste hematopoetskih celic se ob okužbi lahko transformirajo v limfoidne in mieloidne celice. Maligni limfomi predstavljajo 30% tumorjev pri mačkah. Alimentarni limfosarkom je običajno posledica brstenja limfocitov T, celične tumorje pa najdemo zlasti desiminirano po bezgavkah in timusu. Virus FeLV povzroča mieloproliferativne spremembe, ko gre za nenormalno proliferacijo hematopoetskih celic, gre za propad kostnega mozga: eritromieloza, - brstenje eritroidnih celic, granulocitna levkemija, eritroleukemija in mielofibroza: proliferacija fibroblastov kar vodi v osteosklerozo. Izguba limfocitov T ima za posledico neutropenijo, pojavlja se lahko hipokomplementija (pomanjkanje komplementa). V kolikor so mačke v času viremije gravidne se rodijo viremične mucke, ki v nekaj dneh poginejo. Pri teh živalih je prisotna atrofija timusa. Glavni izvor infekcije so trajno inficirane mačke, virus izločajo s telesnimi sekreti. Bolezen ima tri možne izhode: mačka je trajno inficirana, mačka je inficirana začasno do 3. mesecev na kar eliminira virus s protitelesi, ali razvije latentno infekcijo, ko je virus mogoče občasno dokazati. Oblika bolezni je lahko proliferativna (limfomi, levkemija) ali pa degenerativna, kar je odvisno od imunskega odgovora živali. Mlade mačke zbolijo znotraj 3 do 5 let starosti. Najpogosteje se razvije mediastinalni, renalni ali spinalni limfom. Zaradi poškodbe kostnega mozga je prisotna anemija.

Prisotnost okužbe lahko dokažemo z dokazom virusnega antigena p27, ki se nahaja v krvni plazmi, serumu, slini ali solzah. Antigen p27 se nahaja tudi v okuženih limfocitih, zato ga lahko dokažemo v vzorcu polne krvi. Na voljo so tudi hitri imunokromatografski testi za dokaz prisotnosti virusnega antigena. Pozitivne živali lahko izločajo virus, ni pa nujno da bodo zbolele. Ker virus ni vedno prisoten v primeru latentnih infekcij se priporoča v primeru postavitve suma bolezni naknadno testiranje čez 6 tednov. Pri trajno viremičnih mačkah je rezultat testov vedno pozitiven. FeLV pozitivno mačko je potrebno izolirati ali evtanazirati. V diagnostiki se uporabljata tudi imunofluorescenčni in PCR test. Optimalen vzorec je kostni mozeg ali punktat bezgavk. Metoda izolacije virusa na celični kulturi zaradi počasne replikacije virusa v rutinskih preiskavah ni primerna. Bolezen preveniramo s cepljenjem, na ta način jo lahko preprečimo bolezen v 80 odstotkih

vakciniranih mačk. FeLV je prisoten tudi v Sloveniji. Okuženih je med 10 do 25% mačk.

Rod: *Lentivirus*



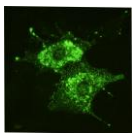
Za viruse iz rodu lentivirus je značilno, da genom vsebuje le tri gene, ki kodirajo strukturne proteine. Gen **gag** kodira protein matriksa, kapsidni in nukleokapsidni protein. Gen **pol** kodira proteazo, reverzno transkriptazo in integrazo, gen **env** pa površinski glikoprotein in glikoprotein ovojnice. Geni za nestrukturne proteine pa nosijo oznake **tat**, **rev** in **vif**.

Vrsta: Virus mačjega sarkoma (Angl. *Feline sarkoma virus*)

Ta virus je uvrščen v rod Gamaretrovirus. Obolenje se pojavlja pri mladih mačkah, gre za invazivno obolenje z metastazami v obliki limfosarkoma, fibrosarkoma ali v obliki proliferacije mieloblastov. Okužba se prenaša horizontalno ob ugrizih pa tudi transplacentarno. Inficirane mačke izločajo virus tudi z urinom, slino in mlekom. Nastane z rekombinacijo mad FeLV in genomom gostitelja in se ne more razmnoževati brez pomoči divjega tipa FeLV.

Vrsta: Virus imunske pomanjklivosti pri mačkah (sinonim: mačji AIDS virus, angl.: *Feline immunodeficiency virus* (FIV))

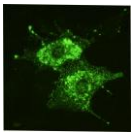
Uvrščen je v rod Lentivirus. In je bil prvič izoliran leta 1986 pri mački s podobno krvno sliko, kot jo ima človek pri okužbi s HIV. Virus FIV je na osnovi razlik v nukleotidnem zaporedju razdeljen v več skupin označenimi s črkami od A do H. Ista žival je lahko okužena tudi z več tipi virusa. V diagnostičnem smislu sta pomembna imunogena proteina p24 in p17. Virus se širi s slino, običajno z ugrizom, lahko tudi transplacentarno, spolno ali kontaktom. Inkubacija lahko traja tudi več le. Povzroča kronično okužbo s perzistentno viremijo. Zaradi pogostih mutacij virusa je v okolju veliko variant tega virusa. Vrsto sestavljajo izolati FIV ki so na osnovi razlik ovojničnih proteinov uvrščeni v 8 podskupin, najpogostejše ugotovljene so skupine A, B, C, in D. Bolna žival največ virusa izloča s slino. Zdrave mačke se okužijo od bolnih ob igri, v primeru ugriza in skozi poškodovano kožo, mladiči pa se okužijo intrauterino ali s kolostrumom. Virus ima tropizem do limfocitov T, astrocitov in makrofagov. V akutni obliki se obolenje kaže s povišano telesno temperaturo in generalizirano limfadenopatijo. Poznan je latentna faza bolezni, ko ni kliničnih simptomov bolezni lahko traja več mesecev. Spremenjena je krvna slika, prisotna leukopenija, trombopenija in hipergamaglobulinemija. Zaradi padca imunosti in odpovedi obrambnega sistema žival pogine zaradi okužb z ubikvitarnimi bakterijami. Okužbo dokažemo z dokazom protiteles proti virusu FIV, proti proteinoma p24 in p17 v testu ELISA. Mačke okužene z FIV so dovzetnejše za okužbo z FeLV. Protitelesa se pojavijo 2-4 tedna po okužbi in so doživljensko prisotna. Dogodi pa se tudi, da inficirane živali nimajo specifičnih protiteles. V testu ELISA dokazujemo tudi prisotnost virusnega antigena p24 ali prisotnost virusne nukleinske kisline z metodo PCR. V tem testu pomnožujemo ohranjen odsek na genu gag in env. Tudi PCR ni idealna metoda, ker nastopa veliko genetsko različnih izolatov, zato potrebujemo PCR metodo, s katero bo mogoče dokazovati vse tipe virusa. V seroloki diagnostiki se uporablja tudi Western blott metoda, s katero dokazujemo protitelesa v terminalni fazi bolezni, ki jih s testom ELISA ne detektiramo. Noben test ni 100% občutljiv in specifičen, in se lahko pojavljajo lažno pozitivni ali lažno negativni rezultati, zato je smiselno večkratno testiranje ob spremljanju krvne slike. Virus je vrstno specifičen in se ne razmnožuje v celicah človeka. Kontrola je mogoča s preprečevanjem kontakta med bolnimi in zdravimi mačkami. Vakcinacija ne daje zadovoljivih rezultatov, hkrati pa nam zakrije protitelesa, ki so posledica cepljenja in jih ni mogoče razlikovati od protiteles ki so posledica okužbe. Virus FIV je razširjen v populaciji mačk po vsem svetu in tudi v Sloveniji.

**Vrsta: Virus infekcijske anemije kopitarjev (IAK), (angl.: Equine infectious anemia (EIA))**

Virus IAK je uvrščen v rod *Lentivirus*, poznan je samo en serotip. Povzroča infekcijsko anemijo kopitarjev (IAK) ali latinsko Anemia Infectiosa Equorum – AIE. Za to bolezen se uporablja tudi sinonim Kužna malokrvnost konj pa tudi Močvirska mrzlica. Poznan je samo en serotip virusa, se pa posamezni izolati močno razlikujejo v stopnji patogenosti. Tarčne celice virusa IAK so monociti, največ virusa je v tkivnih makrofagih. Ob prisotnosti specifičnih protiteles se aktivira komplementni sistem ki povzroči lizo eritrocitov. Za to kronično obolenje je značilno pojavljanje kliničnih simptomov v valovih. Gre za kužno vendar nenalezljivo obolenje, saj se ne prenaša direktno, za prenos iz bolne na zdravo žival je potreben vektor, običajno so to insekti. Virus se razmnožuje v makrofagih in limfocitih. Razvije se doživljenska viremija pri vseh okuženih konjih. Okužba poteka preko prenosa okuženih krvnih celic iz bolnega na zdravega konja. V naravi se to prenaša preko krvosesnih insektov in obadov. Prenos je pasiven. Virus ostane infektiven na ustju obada do 30 minut. Okužba se lahko prenaša tudi vertikalno, preko palcente in kolostruma vendar redko. Po okužbi prihaja do tvorbe imunskih kompleksov in posledične hipersenzitivnosti, kar vodi do poškodb endotelija žil, prisoten je vaskulitis in pojavijo se vnetne spremembe na parenhimskih organih, zlasti na vranici. Vaskulitis centralnega živčnega sistema ima za posledico pojav ataksij, nekoordinirane hoje. Virusni antigen se veže na eritrocite skupaj s protitelesi proti virusu IAK, kar ima za posledico lizo eritrocitov zaradi aktivacije komplementa, prihaja tudi do fagocitoze teh kompleksov in s tem do pojava anemije, od tod tudi ime »Infekcijska anemija«. Poznamo akutno, subklinično in kronično obliko bolezni. Klinični znaki se navadno kažejo kot povišana telesna temperatura, anemija, izguba telesne mase in levkopenija. V akutni obliki se pojavi povišana telesna temperatura, anemija, kri v blatu, petehialne krvavitve, edemi in v 80% smrt. Pri subklinični obliki so klinični znaki manj ali neizraziti, preide v kronično, ko se v ciklikih pojavlja povišana telesna temperatura in edemi na ventralnem delu telesa. Žival se hitro utruja, se poti in je nestabilna v zadnjem delu telesa. Pri takšni živali je virus dosmrtno prisoten v gostitelju. V serumu okužene živali se specifična protitelesa pojavijo 3 do 6 tednov po okužbi. Viremija se običajno pojavi dva tedna po okužbi. Za bolno žival je značilna anemija in trombocitopenija. Anemija nastane zaradi destrukcije eritrocitov, zaradi oblikovanja kompleksov antigen-protitelo. Virus se z površinskim glikoproteinom veže tudi na površino eritrocitov.

Diagnostiko izvajamo z dokazom protiteles proti virusu IAK. Serološko pozitivna žival je tudi nosilka virusa. Uporabljamo agar gel imunodifuzijski test (AGID, sinonim: Coggins test) ali test ELISA. V testu AGID določamo protitelesa proti proteinu p26 in p15. Na ta način dokažemo vse okužene živali razen v zgodnji fazi, ker 2-3 tedne po okužbi ni mogoče dokazati protiteles. Virus se slabo razmnožuje v celicah tkivne kulture, primerna pa je kultura konjskih makrofagov. Uporabnejša je molekularna PCR metoda, s katero dokazujemo prisotnost provirusne DNA v celicah vranice. Serološko pozitivni rezultat pomeni, da je žival tudi nosilec virusa. Kontrola nad boleznijo se izvaja s testiranjem konj v prometu. Pozitivne živali je potrebno držati v hlevu in oddvojeno od ostalih konj ali jih evtanazirati.

Zdravljenja te bolezni ni, tudi ne obstaja zaščitno cepljenje živali. IAK je razširjen povsod po svetu, pojavlja pa se tudi v Sloveniji. V 70. letih prejšnjega stoletja je bil močno razširjen zlasti na močvirnih področjih v Sloveniji, vendar so ga s sistematičnim testiranjem in izločanjem serološko pozitivnih živali uspešno izkoreninili. Pri tem ima velike zasluge zlasti prof. Ivan Jazbec. Danes so vsi konji, ki so v prometu pod kontrolo na to bolezen, vendar vsako leto ugotovimo nekaj primerov, kar pripisujemo prometu konj iz Romunije in Bolgarije.

**Vrsti: Virus kozjega artritisa in encefalitisa (angl: *Caprine arthritis encephalitis virus*) in Virus MAEDI/VISNA (angl: *Visna/Maedia virus*)**

Kozji lentivirus primarno povzroča obolenje pri kozah, ki ga imenujemo kozji artritis in encefalitis, najdemo pa ga tudi pri ovcah. Virus MAEDI/VISNA je primarno patogen za ovce, najdemo pa ga tudi pri kozah. Na osnovi analiz nukleotignega zaporedja genov gag, pol in env so izolate razvrstili v 6 različnih genetskih skupin. Znotraj posamezne genetske skupine pa se nahaja po več podskupin. Za to obolenje je značilen poliartritis, encefalomielitis, mastitis in pljučnica. Razširjen je po celem svetu. Okužba se prenaša s kolostrumom in mlekom v manjši meri preko kontakta. Inkubacijska doba je več mesecev ali let. Okužba se prenaša z matere na potomca s kolostrumom, med starejšimi pa tudi preko aerosola. Prenos preko kolostruma je ključen zaradi prepustnosti črevesja prvih 48 ur po rojstvu. Možen je tudi intrauterini prenos od matere na plod. Potek bolezni je počasen, živali ostanejo okužene vse življenje. Večina jih ne kaže kliničnih znakov bolezni, tiste ki pa zbolijo se kažejo spremembe centralnega živčnega sistema, pljuč, sklepov in mlečne žleze. Pojavljajo se kronične vnetne spremembe sklepov, pljuč, mlečne žleze in centralnega živčnega sistema. Okužene živali so doživljenjske nosilke virusa. Veliko okuženih živali ne kaže kliničnih znamenj bolezni, so pa vir okužbe za zdrave živali.

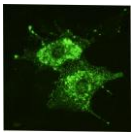
Virus vstopi v organizem preko sluznic respiratornega in prebavnega trakta, razmnožuje se v monocitih in makrofagih ter perzistentno okuži celice kostnega mozga. Tarčne celice so tudi pljučne celice, nevroni, celice mlečne žleze in sklepov. Šepanje je posledica artritisa, ki je prisotno zlasti pri odraslih kozah, najbolj so prizadeti karpalni sklepi. Bolečine v sklepih zmanjšujejo mobilnost živali, slabšo ješčnost in zmanjšano proizvodnjo. Encefalomielitis se pojavi zlasti pri mladih kozličkih do starosti 5 mesecev. Zaradi encefalomielitisa prihaja do paraliz, izgube apetita, živali niso febrilne. Pri molzečih kozah se pojavlja mastitis z nastankom značilnih fibroznih odebelin vimena.

Bolezen v čredi je mogoče izkoreniniti tudi z takojšnjim oddvajanjem novorojenih jagnet in kozličev od matere in hranjenje s neokuženim kolostrumom in mlekom, kar pa je v reji prektično izredno težko izvedljivo, zato je edini praktično uporaben način izkoreninjanja izločanje pozitivnih živali iz reje in ločevanje bolnih od zdravih živali.

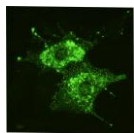
Diagnozo postavimo z dokazom protiteles proti virusu CAE: test ELISA ali AGID ali z dokazom virusnega genoma z metodo PCR. Specifična protitelesa se pojavijo 1-3 mesece po okužbi in vztrajajo doživljenjsko. Bolezni sta razširjeni tudi v Sloveniji. Ustreznega cepiva ni na voljo, tako da je edini učinkovit način izkoreninjanja bolezni izločanje okuženih živali. Kontrola nad boleznijo je mogoča le z oddvajanjem mladičev od bolnih mater takoj po rojstvu in s hranjenjem z mlekom od neokuženih koz. Kolostrum ni kužen, če ga 1 uro segrevamo pri 56 °C. Okužena žival je doživljenjski nosilec virusa, zato je potrebno okužene živali izločiti iz reje. Okužene živali so nosilci protiteles proti lentivirusom drobnice, ki jih dokazujemo v serumu s testom ELISA. Prisotnost virusa pa dokazujemo v makrofagih z metodo PCR, kjer pomnožujemo provirusni DNA segment vključen v celični kromosom.

V Sloveniji so lentivirusne okužbe prisotne tako pri ovcah kot kozah. Velike škode ugotavljamo zlasti pri v visokoproizvodnjih rejah. Ugotovljeni so virusi iz genetske skupine A in B. K eradikacijskim programom so pristopili le posamezni rejci.

Dodatni študijski viri:



- Završnik J. Molekularna determinacija in epidemiologija virusa infektivne anemije kopitarjev: Prešernova naloga. Ljubljana: UL Veterinarska fakulteta, 2010: 55 f.
- Kuhar U, Barlič-Maganja D, Grom J. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses detected in Slovenia. *Vet Microbiol.* 2013; 162:201-206.
- Pépin M, Vitu C, Russo P, Mornex JF, Peterhans E. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet Res* 1998; 29(3/4): 341–67.

**VIRUSI Z NEGATIVNO ORIENTIRANIM RNA GENOMOM**10 *Paramyxoviridae*11 *Rhabdoviridae***11 PARAMYXOVIRIDAE****Splošne lastnosti in klasifikacija paramiksovirusov**

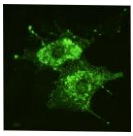
Veliko povzročiteljev izredno nevarnih kužnih bolezni pri živalih in ljudeh spada prav v družino *Paramyxoviridae*. Naj naštejemo samo nekatere bolezni, ki tvorijo pomemben kompleks okužb respiratornega trakta pri živalih: goveja kuga, pasja kuga, kokošja kuga in tudi bolezni, kot so parainfluenca in okužbe z respiratornim sincicialnim virusom. Kontrola teh bolezni uspešno poteka z izvajanjem preventivnega cepljenja z izjemo okužb z respiratornim sincicialnim virusom pri govedu. Družina *Paramyxoviridae* je z družinami *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* in *Bornaviridae* uvrščena v rod *Mononegavirales*. Za viruse tega rodu je značilno, da imajo lipoproteinski plašč pokrit s peplomeri, genom pa predstavlja enojna negativno orientirana molekula RNA.

PARAMYXOVIRINAE	Vrsta
AVULAVIRUS	<i>Newcastle disease virus</i> (Slo. Virus atipične kokošje kuge)
	<i>Avian paramyxovirus 2–9</i> (Slo. Virus parainfluence perutnine)
HENIPAVIRUS	<i>Nipah virus</i>
MORBILLIVIRUS	<i>Canine distemper virus</i> (Slo. Virus pasje kuge)
	<i>Peste-des-petits ruminants virus</i>
	<i>Rinderpest virus</i> (Slo. Virus goveje kuge)
RESPIROVIRUS	<i>Bovine parainfluenza 3 virus</i> (Slo. Virus goveje parainfluence 3)
RUBULAVIRUS	<i>Porcine rubulavirus</i>
PNEUMOVIRINAE	
METAPNEUMOVIRUS	<i>Avian metapneumovirus</i>
PNEUMOVIRUS	<i>Bovine respiratory syncycial virus</i> (Slo. Goveji respiratorni sincicilani virus)

Preglednica 9: Razvrstitev virusov znotraj družine *Paramyxoviridae*, pomembnih za veterinarsko medicino.

Družina *Paramyxoviridae* je razdeljena v dve poddružini, in sicer *Paramyxovirinae* in *Pneumovirinae*. V poddružino *Paramyxovirinae* so uvrščeni naslednji rodovi: *Avulavirus*, *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Morbillivirus*, in *Henipavirus*. Rod *Avulavirus* sestavlja 9 vrst ptičjih paramiksovirusov z oznakami avian paramyxovirus od 1 pa do 9 (APMV). Bolezen klasično kokošjo kugo (angl. *Newcastle disease*) povzroča vrsta virusa APMV-1, poimenovan tudi virus bolezni Newcastle. Povzroča bolezen perutnine z izredno visoko smrtnostjo. Za poddružino *Paramyxovirinae* je značilna hemadsorbijska aktivnost (aglutinacija eritrocitov ob prisotnosti virusa). Lastnost vezave na eritrocite primatov imajo tisti virusi, ki imajo glikoprotein hemaglutinin (HE). Fenomen hemaglutinacije je zaznaven pri virusu parainfluence in morbilivirusih, ne pa tudi pri pnevmovirusih. Prenos virusa med živalmi poteka s tesnim kontaktom ali z aerosolom. Za veterinarsko medicino je pomemben tudi rod *Morbilivirus*, kamor spada povzročitelj pasje kuge in goveje kuge.

V poddružino *Pneumovirinae* sta uvrščena rodova *Pneumovirus* in *Metapneumovirus*.



Zgradba paramiksovirusov

Virusi, uvrščeni v družino *Paramyxoviridae*, so pleomorfne pa tudi sferične in nitaste oblike. Nukleokapsido obdaja lipoproteinska ovojnica (plašč), ki je pokrita s peplomerami (proteinskimi izrastki), velikosti od 3 do 20 nm. Virus dobi plašč ob prehodu skozi citoplazemsko membrano celice. Poleg lipidov ga sestavljajo še trije transmembrani glikoproteini. Skozi lipoproteinski plašč sega protein HN (hemaglutinin-nevrominidaza protein), ki sodeluje pri procesu vezave virusa na tarčno celico. Izven lipoproteinskega plašča štrli še protein F (angl. *fusion protein*), ki ima pomembno vlogo pri prehodu virusa iz celice v celico. Na notranjo stran plašča je pripet neglikoziran protein M (matriks).

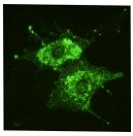
Proteini, ki tvorijo peplomere, vspodbudijo tvorbo nevtralizacijskih protiteles. Specifična nevtralizacijska protitelesa inhibirajo vezavo virusnih partikov na celično steno. Fuzijski protein ima pomembno vlogo pri virulentnosti virusa. Vključen je pri aktivnem prehajanju iz celice v celico po principu fuzije, kar ima pomembno vlogo pri patogenezi paramiksovirusov. Uspešne vakcine proti paramiksovirusnim infekcijam morajo vzpodbuditi močno tvorbo protiteles zlasti proti hemaglutininu in nevraminidazi ter proti proteinu F. V biološkem smislu je prisotna medsebojna navzkrižna nevtralizacija, kar pomeni, da na primer protitelesa proti virusu parainfluence delno nevtralizirajo tudi morbiliviruse.

Biološki pomen virusnih proteinov

Pri virusih, uvrščenih v družino *Paramyxoviridae*, zasledimo različne proteine, ki so odgovorni za vezavo virusa na celico gostiteljico. V rodu *Morbilivirus* je to protein H (hemaglutinin), pri respirovirusih protein HN (hemaglutinin-nevaminidaza), pri pnevmovirusih in metapnevmovirusih pa je to protein G. Sposobnost vezave je močno odvisna od okolice pH, ki vpliva na trodimenzionalno strukturo proteina. Sialična kislina na celični steni je na primer receptorsko mesto za protein HN.

Hemaglutinin-nevraminidaza (H/N) protein je več funkcionalni protein. Odgovoren je za vezavo virusa na tarčno celico, saj prepozna celične receptorje s sialično kislino. Vključen je tudi v aktivacijo proteina F in tako sodeluje pri vstopanju virusa v celico. Njegova neurominidazna aktivnost odstranjuje ostanke sialične kisline, ki jih pridobi virus ob izstopanju iz celice, kar virusu omogoča lažje širjenje iz celice na celico. Molekula se nahaja v obliki tetramera, ki je sestavljen iz para dimerov. Zunanji del H/N proteina sestoji iz peclja, ki je zaključen v obliki betiča. Protein HN predstavlja vezno mesto virusa na molekulo sialične kisline kot receptorja na površini celice, ima nevraminidazno aktivnost in predstavlja antigensko mesto za nevtralizacijska protitelesa. Ob vstopanju virusa prihaja do zlitja plašča s celično membrano le ob interakciji s proteinom F.

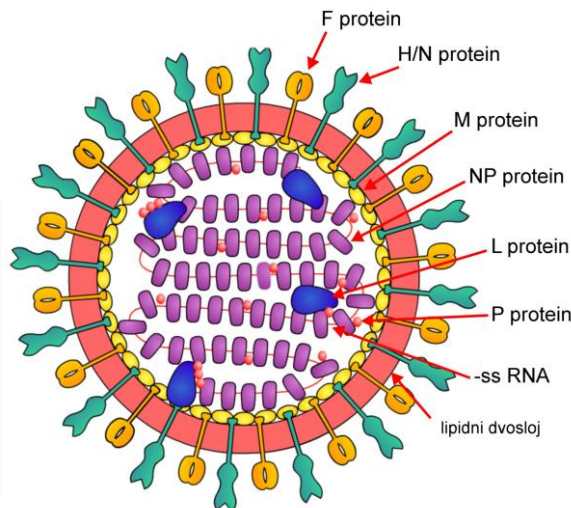
Protein F je transmembranski glikoprotein, ki je prvotno v procesu translacije sintetiziran kot neaktivni prekurzor z oznako F0, ki se prav tako nahaja v virusni ovojnici in je vključen v proces vstopanja virusa v celico. Sproži tudi celično fuzijo; omogoči fuzijo celic med seboj in na ta način se infekt lahko širi iz celice na celico brez sproščanja virusa, kar lahko poteka ob prisotnosti protiteles. Da postane protein F biološko aktiven, ga mora najprej celična proteaza razcepiti na dve molekuli, nastaneta proteina F1 in F2. Aktivna molekula sestoji iz dveh podenot molekule F1 in F2. Med vstopanjem virusa v celico se protein F zlije z membrano ciljne celice in na ta način omogoči fuzijo. Cepitveno mesto proteina F se med posameznimi izolati virusov razlikuje. Iz tega proteina po cepitvi v Golgijevem aparatu nastane aktivni kompleks proteina F s podenotama F1 in F2. Med zlitjem se



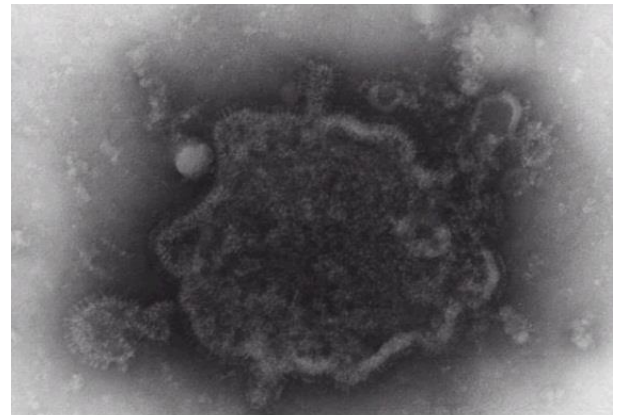
Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine

protein F1 vključi v membrano tarčne celice. Cepitveno mesto na proteinu F0 predstavlja determinanto virulence, tako da lahko z določanjem aminokislinskega zaporedja na tem delu določimo posameznemu izolatu virulentnost.

Protein M (angl. *matrix protein*) predstavlja sloj, razpet med virusnim lipoproteinskim plaščem in nukleokapsido. Nastopa tudi kot promotor prekinitve sinteze RNA in promotor sestavljanja virusa. Vloga nukleokapsidnega proteina NP je sodelovanje pri enkapsidaciji RNA, sodeluje pri transkripciji in replikaciji in je povezovalni člen s proteinom M in nukleokapsido. Sestavlja ga 489 aminokislin.



Slika 71: Shematski prikaz paramiksovirusov.

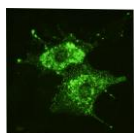


Slika 72: Elektronsko mikroskopski posnetek paramiksovirusa
(<http://www.stanford.edu/group/virus/paramyx/2005/index.htm>,
24.04.2012)

Fosfoprotein (protein P) je fosforiliran, sestavlja ga od 507 do 603 aminokislin. Skupaj s proteinom L predstavlja aktiviran encim polimerazo. S proteinom L je vključen v sintezo mRNA. Velikost proteina je pri posameznih vrstah znotraj te družine različna. Protein P je po strukturi zelo variabilen, prisotno je samo od 22 do 40-odstotno ujemanje med posameznimi rodovi. Ko je aktiven, se nahaja v tetramerni obliki. Njegova značilnost je, da stabilizira virusno polimerazo. Skupaj s proteinom N regulira prehod iz prepisovanja genoma v pomnoževanje. Na genu za protein P se nahaja še zapis za dva nestrukturna proteina z oznakama V in W.

Protein L: virusna polimeraza (od RNA odvisna polimeraza RNA, L, angl. *large protein*) je nedvomno največji virusni protein paramiksovirusov. Njegov zapis je na genomu od promotorja najbolj oddaljen. V virionu je povezan z ribonukleokapsidnim kompleksom. Protein je nujen za sintezo virusne RNA in nastopa kot encim pri sintezi posameznih funkcionalnih virusnih mRNA molekul. V zadnjih študijah so z uporabo reverzne genetike in himer ugotovili, da ima protein L vpliv na izraženo virulenco APMV-1. Virusno polimerazo aktivira proteinski kompleks proteina P/L in je odgovoren za prepis virusne RNA v mRNA kot tudi za prepis v cRNA.

Nukleokapsidni protein (N): predstavlja jedro spiralne strukture nukleokapside, glede na bližnjo lokacijo gena za nukleoprotein na 3' koncu genoma se ta gen največkrat podvoji, zato je v okuženi celici tudi največja koncentracija tega proteina. Protein N je sestavljen iz od 391 do 553 aminokislin. Njegova vloga je v zaščiti genoma. Nastopa kot aktivator polimeraznega kompleksa. Protein N se specifično veže na fosfoprotein (P) in virusno RNA polimerazo (L), s katerima tvori



ribonukleoproteinski kompleks, ki služi kot osnovni gradnik pri sintezi RNA. Znano je, da so centralni deli proteina močno ohranjeni, kar se izkorišča v diagnostiki paramiksovirusnih okužb. Razlike v proteinu N med posameznimi izolati vplivajo tudi na virulenco virusa.

Proteina V in W se pojavljata le med replikacijo virusa. To sta nestrukturna proteina, ki se pojavita v fazi razmnoževanja virusa. Protein V deluje kot inhibitor interferona. Njegova vloga je v kontroli sinteze RNA.

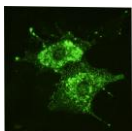
Genom paramiksovirusov

Virusni genom predstavlja enojna nesegmentirana negativno polarna molekula RNA, velikosti od 15 do 16 kbp. Organizacija genoma se razlikuje med posameznimi rodovi znotraj družine *Paramyxoviridae*. Genom virusov iz poddružine *Paramyxovirinae* kodira od 7 do 9 proteinov, odvisno od vrste virusa, genom iz poddružine *Pneumovirinae* pa od 9 do 11 proteinov. Zaporedje genov v smeri 3' do 5' je naslednje: N – nukleokapsidni protein, P – fosfoprotein, M – protein matriksa, F – fuzijski protein, HN – hemaglutinin-nevraminidazni protein, L – od RNA odvisno polimerazo RNA. Gena z oznako NS1 in NS2, predstavljata gena za nestrukturane proteine. Struktura genoma med posameznimi rodovi je različna. Pri nekaterih rodovih se pojavlja še gen za nestrukturana proteina V in W. Med posameznimi izolati je nukleotidno zaporedje proteinov M in NP zelo variabilno, zelo enotno pa pri proteinu L. Signalno mesto za transkripcijo in replikacijo genoma predstavlja nukleotidno zaporedje na 3' koncu. Med vsakim genom se nahaja nekodirajoča regija (stop/start signal), ki je zelo ohranjena. Virusna RNA ima dve skupni funkciji; služi kot osnova za sintezo sporočilne RNA (mRNA) in kot osnova za tvorbo antigenoma. Virusi te družine vsebujejo lasten protein, ki nastopa kot transkriptaza RNA. V procesu replikacije se najprej sintetizira sporočilna RNA, šele nato sledi sinteza virusnih proteinov in novo sintetizirana pozitivno orientirana virusna RNA, podobno kot pri družini *Rhabdoviridae*.

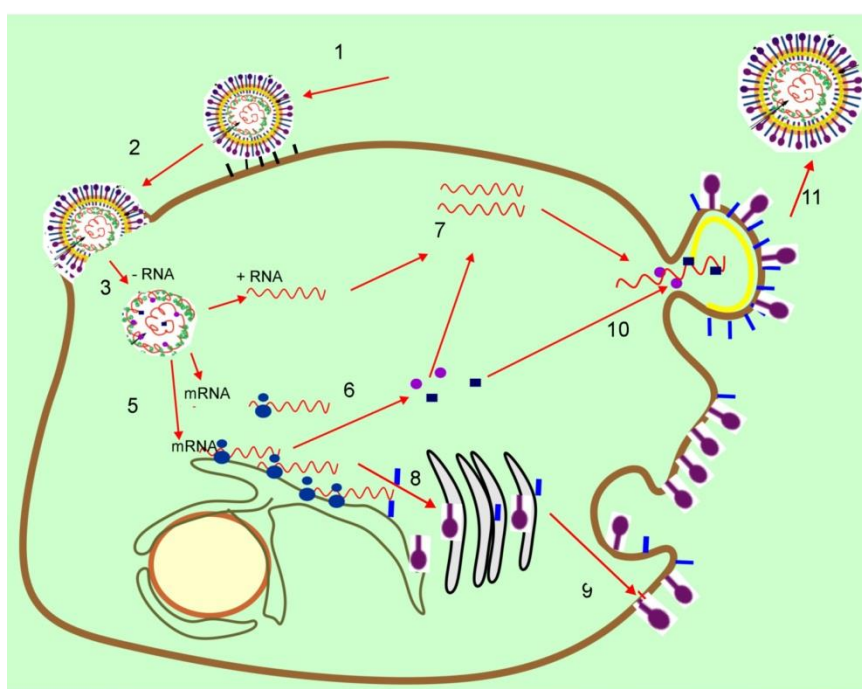
Pomnoževanje paramiksovirusov

Pomnoževanje poteka v celicah gornjih dihalnih poti in prebavilih z izjemo virusa pasje kuge, ki se razmnožuje v limfatičnih organih in nevronih.

Virus se veže na ustrezne receptorje celice (sialična kislina) na površini celice gostiteljice s proteinom H/N (hemaglutinin-nevraminidaza). Po proteolitičnem razcepu proteina F v dve molekuli (F1 in F2) le-ta katalizira zlitje virusnega plašča s celično steno, tako da v celico vstopi le nukleokapsida, proteini virusnega plašča pa se zlijejo s celično steno. Paramyxovirusi se razmnožujejo v citoplazmi celice. Po vstopu virusne RNA v celico poteka prepisovanje. Virusni genom ima samo en promotor za transkriptazo. Glede na to, da so posamezni geni med seboj ločeni z medgenskim nukleotidnim zaporedjem (angl. *intercistronic nucleotide sequence*, regija ICS), poteka sinteza mRNA pulzirajoče. Prepisovanje se začne na 3' koncu. Ker polimeraza ne poteka neprekinjeno po celotnem genomu hkrati, ampak se zaradi pogostega prekinjanja prepisovanja na medgenskih prostorih vrača na 3' konec, se prepiše največ mRNA tistih genov, ki so bližje 3' koncu. Tako dobimo največ mRNA za gen N in najmanj za gen L, ki je na 5' koncu. Virusne mRNA se pripnejo na ribosome, v katerih poteka sinteza proteinov. Nastale virusne beljakovine se fosforilizirajo in glikolizirajo, pridobijo pravilno prostorsko obliko in potujejo v tiste dele celice, v katerih pride do sestavljanja novih virusov. Proteina F in HN potujeta do endoplazmatskega retikuluma (ER) in se vrineta v membrano ER. V obliki formiranih mešičkov ti kompleksi potujejo do citoplazemske membrane celice in se z njo spojijo. Proteini, ki tvorijo nukleokapsido (L, N in P), obdajo genom. Novonastala nukleokapsida se transportira do citoplazmatske membrane, v kateri se veže s proteini, ki sestavljajo plašč virusa (HN, M in F). Razmnoževalni cikel se zaključi znotraj 10



ur. Pridruži se jim še protein M. Glikolizacija poteka pod vplivom celičnih glikoziltransferaz. Posledica akumulacije nastalega virusnega kompleksa N/P je prekritje start/stop signala med posameznimi geni na genomu. Posledica tega je, da polimeraza preskoči ta signal in na ta način se genom prepíše v celoti. Virusna replikaza sintetizira komplementarno cRNA, ki je matrica za izdelovanje novih molekul genomske RNA. Virusne mRNA pa preusmerijo celično presnovo v gradnjo sestavin za nove viruse. Virus izstopa iz celice tako, da se virusna nukleokapsida uvede v del citoplazemske membrane, bogate s proteini F, HN in M, le ta se izboči in tako vzbrsti nov virus. Posledica replikacije virusa v celici je hkrati tudi liza celične stene ali zlitje celične stene v več celic, tako da posledično nastanejo gigantske celice z več jedri, tudi do 50 jeder v eni celici. Te celice imenujemo sincicijske celice. Sincicije in intracitoplazmatske inkluzije lahko opazujemo pod svetlobnim mikroskopom, če okužene celice obarvamo s histološkim barvanjem. Pomnoževanje poteka v citoplazmi, pri tem nastajajo značilne intracitoplazmatske inkluzije.

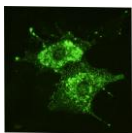


Slika 73: Prikaz replikacije virusov iz družine *Paramyxoviridae*. (1) vezava virusa s proteinom HA na celične glikoproteine, (2) fuzija virusnega plašča s celično membrano, (3) vstop nukleokapside v celično citoplazmo, (4) transkriptaza prepíše virusno -RNA v +RNA, (5) prepis posameznih genov v proteine, (6) sinteza proteinov na ribosomih endoplazmatskega retikuluma (7), sinteza virusnega genoma, (8) fosforilacija proteinov plašča v GA, (9) vezava proteinov plašča na celično membrano, (10), izgrajevanje nukleokapside, (12) zorenje virusa v postopku brstenja.

Rod *Avulavirus*

Vrsta: Virus atipične kokoške kuge (angl. *Newcastle disease virus*)

V rod avulavirus spada virus atipične kokoške kuge (AKK) in 8 vrst paramiksovirusov perutnine. Paramiksovirusi perutnine (angl. *avian paramyxovirus*, APMV) so virusi z ovojnico, zato so občutljivi na različne fizikalno-kemijske dejavnike, kot so visoka temperatura, žarčenje (dnevna



svetloba in svetloba UV), visok in nizek pH, oksidacijski procesi in različne kemikalije, med drugim na lipidna topila, neonske detergente in formaldehide. Skupna značilnost vseh 9 vrst je virusna vijačnosomerna kapsida in struktura genoma. APMV ostanejo dalj časa infektivni v vlažnem okolju in okolju, bogatim s proteini. Vsebina iztrebkov in ostala nesnaga v okolju virusu podaljša preživetje. Virusi AKK lahko ostanejo infektivni v gnoju tudi 16 dni pri temperaturi (T) od 8,8 do 26,6 °C, 71 dni v iztrebkih in okrog 50 dni na jajčni lupini pri temperaturi od 20 do 30 °C, 192 dni v piščančjem puhu pri temperaturi od 20 do 30 °C in 22 dni v zemlji pri temperaturi okrog 20 °C in 100-odstotni relativni vlagi. Ugotovili so tudi, da med kompostiranjem 3-dnevna inkubacija na 40 °C ali več viruse uspešno uniči.

Vrsta APMV-1 povzroča tako imenovano bolezen Newcastle. Bolezen nosi ime po angleškem mestu New castle, kjer so bolezen prvič opisali. Na osnovi uporabe monoklonalnih protiteles proti različnim epitopom virusnih proteinov so vrsto APMV-1 razvrstili v 14 antigenih skupin. Danes pa različne izolate na osnovi razlik v genu za protein F razvrščajo v različne genetske skupine. Med njimi nastopajo tudi razlike v virulenci. Značilnost te bolezni je visoka stopnja obolevnosti, do 90-odstotna smrtnost in izredna kužnost. Glede na patogenost delimo različne seve na viscerotropne, nevrotropne, mezogene, lentogene in asimptomatske. Virulentnost izolata se določa z biološkim poskusom na piščancih. Viscerotropni in nevrotropni sevi povzročajo izredno visoko stopnjo smrtnosti, medtem ko lentogeni in asimptomatski le blage enteritise in neopazno respiratorno infekcijo. Virulenca AKK se razlikuje v odvisnosti od gostitelja. Piščanci so zelo občutljivi na okužbo z AKK. Po drugi strani so lahko race okužene s sevi, ki so za piščance virulentni, a se pri racah ne kažejo klinični znaki bolezni ali pa so le-ti blagi. Patogenost vrst APMV od 2 do 9 je za perutnino nižja v primerjavi z virusom AKK.

Primarno pomnoževanje virusa AKK poteka v celicah sluznice gornjega respiratornega trakta in prebavil. Po okužbi se virus v fazi viremije hitro razširi na ostale notranje organe, kot sta kostni mozeg in vranica, ter tako po krvi doseže centralni živčni sistem. Vidne patoanatomske spremembe se kažejo v številnih petehialnih krvavitvah po traheji, ezofagusu in limfatičnih organih. Virulenca posameznih izolatov povzročitelja je zelo različna, manj virulentni so serotipi od 2 do 9. Izolati, uvrščeni v serotip 1, povzročajo atipično kokošjo kugo.

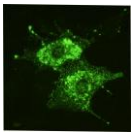
Maternalna protitelesa zaščitijo piščance pred boleznijo do starosti 4 tednov. Cirkulirajoča protitelesa skupine IgG ne zaščitijo kokoši popolno pred respiratorno obliko obolenja, zelo pomembno vlogo pri zaščiti pa imajo lokalna protitelesa IgA. Perutnino lahko preventivno zaščitimo s cepljenjem. Za določanje zaščite po cepljenju se uporablja test inhibicije hemaglutinacije.

Določanje patogenosti izolata

Patogenost določenega izolata APMV-1 določamo z biološkim poskusom. Prvi način je določanje časa zamrtja embrijev po aplikaciji vzorca, ali poskus intracerebralne aplikacije izolata dan starim piščancem (določitev intracerebralnega indeksa patogenosti, ICPI). Najpomembnejši je ICPI, ki ga določamo tako, da 10 piščancem intracerebralno vbrizgamo 50 µl razredčenega virusa. Piščance opazujemo 8 dni in dnevno ocenimo njihovo zdravstveno stanje (0 = normalen, 1 = bolan, 2 = poginjen). ICPI je povprečje ocen na vsakega piščanca v spremljanem obdobju (OIE, 2008a).

Diagnostika

Končno diagnozo lahko postavimo le z laboratorijskimi preiskavami. Virus lahko izoliramo iz vzorcev vranice, možganov ali pljuč. Izolacijo virusa lahko opravimo na 9–11 dni starih kokošjih embrijih. Vzorec inokuliramo v alantoisno votlino. Inokulirana jajca inkubiramo do pogina odnosno najmanj 6 dni. V primeru negativnega rezultata opravimo še eno pasažo. Prisotnost virusa v alantoisni vsebini določamo s hemaglutinacijskim testom. Izolate s pozitivnim rezultatom v hemaglutinacijskem testu še determiniramo s testom inhibicije hemaglutinacije, pri katerem uporabimo specifičen serum proti serotipu 1. Patogenost izolatov določamo z intranazalno



inokulacijo izolata enodnevnim piščancem, zatem določamo stopnjo smrtnosti piščancev v poskusu. Virus lahko izoliramo tudi na celični kulturi piščančjega izvora.

Zelo uporabna diagnostična metoda je tudi test RT-PCR. V postopku RT-PCR najprej izoliramo virusno RNA in določen odsek virusne RNA prepíšemo v komplementarno DNA, ki ga nato pomnožimo. Običajno pomnožujemo odsek genoma, ki kodira protein F. Z določanjem aminokislinskega zaporedja lahko predvidimo tudi patogenost določenega izolata, saj je poznano, da se pri patogenih sevih virusa APMV-1 na antigenskem mestu 113 in 116 proteina F nahaja aminokislina arginin, na mestu 117 pa fenilalanin.

Okužbo lahko dokazujemo tudi z indirektnimi metodami. Za to uporabljamo serološke metode, običajno test inhibicije hemaglutinacije ali test ELISA. V krvi kokoši lahko že 5. do 6. dan po infekciji ugotovimo prisotnost protiteles proti virusu AKK.

Virus prenašajo tudi različne divje ptice in golobi in s tem predstavljajo nevaren rezervoar bolezni za domače vrste perutnine. Bolezen se najpogosteje prenaša s kontaktom, aerosolom ali okuženo vodo, možen pa je tudi transovarialen prenos preko jajc. Cepljenje perutnine preko pitne vode ali z aerosolom je v proizvodnji zelo razširjen preventivni ukrep. Živali pridobijo zaščito v enem tednu po vakcinaciji. V primeru pojava bolezni se v praksi uporabijo restriktivni ukrepi zatiranja: neškodljivo uničenje poginjenih in bolnih živali, temu sledi razkuževanje hlevov in dvorišča. Pri nas v intenzivni perutninski proizvodnji vakcinirajo vso perutnino zlasti zaradi nevarnosti vnosa virusa preko divjih ptic in kokoši ekstenzivne reje.

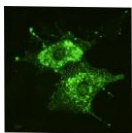
V Sloveniji je virus prisoten zato izvajajo redno cepljenje perutnine v industrijski proizvodnji proti virusu AKK.

Rod: Respirivirus

Vrsta: Virus goveje parainfluence 3 (angl. *Bovine parainfluenza 3 virus, PI-3*)

Virus goveje parainfluence 3 spada v rod *Respirivirus*. Okužba z virusom parainfluence 3 (PI-3) je razširjena po vsem svetu, saj je ponekod do 80 % populacije govedu prekužene s tem virusom. Povzroča respiratorna obolenja pri govedu in s tem povezane velike ekonomske izgube, zlasti v pitaliških govedu. Vstopno mesto virusa PI₃ so običajno respiratorne poti živali. Celice sluznice predstavljajo receptorsko mesto virusa PI₃. Virus se razmnožuje v epitelnih celicah respiratornega trakta. Pomnoževanje virusa povzroči destrukcijo resic, hiperplazijo in nekrozo. Inkubacija, čas od okužbe pa do pojava kliničnih znakov, traja od 3 do 7 dni. Pojavi se povišana telesna temperatura, neješčnost, serozni izcedek iz nosu in kašelj. Običajno se obolenju pridružijo sekundarne bakterijske okužbe, kar se izraža v obliki težkih pljučnic in posledičnih poginih. Znotraj črede se okužba širi kapljično, tako da oboli visok odstotek živali. Prebolele živali razvijejo močno humoralno zaščito. Zlasti protitelesa proti virusnim proteinom, kot je hemaglutinin in nevrominidaza, imajo pomembno vlogo pri zaščiti živali pred ponovno infekcijo. V imunološkem smislu je zelo pomembna lokalna imunost na sluznicah – prisotnost specifičnih protiteles razreda IgA. Kljub temu živali po nekaj mesecih ponovno postanejo dovzetne za okužbo.

Prisotnost virusa lahko dokažemo v vzorcih, dobljenimi v akutni fazi bolezni. Z nosnim ali laringotrahealnim brisom dobimo vzorec, v katerem dokazujemo prisotnost virusa PI-3 z metodo direktnega imunofluorescenčnega (IF) testa ali pa opravimo test izolacije virusa na celični kulturi. Virus lahko uspešno gojimo na celicah govejega izvora, kot so trahealne celice goveda. Za izvedbo testa IF potrebujemo okužene celice respiratornega trakta, v katerih določamo prisotnost virusa. Prekuženost črede z virusom PI₃ določamo s serološkimi metodami, na primer s testom inhibicije hemaglutinacije.



Obolenje lahko omilimo s pravočasnim preventivnim cepljenjem. Okužbe s PI-3 so prisotne tudi v Sloveniji v 70 % rej govedi. Prizadeta so zlati teleta.

Vrsta: Virus parainfluenza 2 pri psih (angl. *Canine parainfluenza 2*)

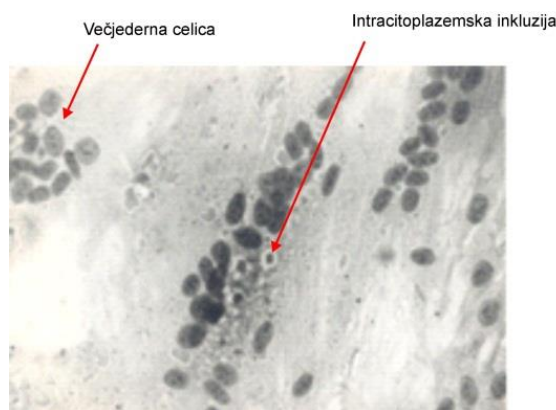
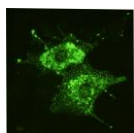
Pasji virus PI-2 je zelo razširjen med populacijo psov, povzroča pa obolenja respiratornih organov. Virus je uvrščen v rod *Morbilivirus*. Obolenje se kaže v obliki kašlja, nosnega izcedka in povišane telesne temperature. Potek bolezni je odvisen od sekundarnih infekcij. Virus je tako kot drugi iz družine *Paramyxoviridae* občutljiv na maščobna topila, kot so eter in kloroform, je termolabilen in občutljiv na spremembe pH. Aglutinira eritrocite morskega prašička, podgane, psa, mačke, ovce in človeka, krvne skupine O. Receptorji za vezavo virusa se nahajajo na različnih celicah, razmnožujejo se v celicah respiratornih organov, urogenitalnega trakta in žolčnika, ne razmnožuje pa se v makrofagih.

Prisotnost virusa lahko dokažemo v vzorcih respiratornega trakta z imunofluorescenčnimi metodami ali izolacijo virusa na celični kulturi. Vzorce (bris respiratornih poti, vzorec krvi) je treba odvzeti na začetku pojava kliničnih znakov bolezni.

Rod: *Pneumovirus*

Vrsta: Goveji respiratorni sincicialni virus (GRSV) (angl. *Bovine respiratory syncycial virus, BRSV*)

Respiratorni sincicialni virus so uvrstili v rod *Pneumovirus*. Poznanih je več vrst respiratornih sincicialnih virusov in so vrstno specifični: goveji, kozji, ovčji, humani RSV. Virusi so si med seboj antigensko sorodni, prisotna je navzkrižna nevtralizacija, vendar na primer govedo klinično ne oboli zaradi okužbe z ovčjim RSV in obratno. Velikost virusa je od 80 do 350 nm, kot ostali virusi iz družine *Paramyxoviridae* ima tudi RSV lipoproteinsko ovojnico, površina pa je posuta z glikoproteinskimi betiči in filamenti. Virusni genom kodira 11 proteinov v naslednjem zaporedju: 3' NS1, NS2, N, P, M – SH, G, F, M2-1/M2-2 – L 5'. Štirje proteini (N, P, L in M2) tvorijo nukleokapsido, ki je helikalne simetrije. Lipoproteinski plašč je iz treh transmembranih proteinov, F, G in SH. Virus nima hemaglutinacijskih lastnosti. Za vezavo virusa na celico gostiteljico je odgovoren protein G. Genom RSV predstavlja enojna, negativno orientirana veriga RNA, ki se prepiše v 11 mRNA. Vsaka mRNA se začne s 3' promotorjem, sestavljenim iz 10 nukleotidov, in se konča s 5' koncem, sestavljenim iz 12 nukleotidov. Posamezni geni so med seboj povezani z medgenskimi regijami, ki imajo različno dolžino. Protitelesa proti proteinu F nevtralizirajo vse seve RSV. Študije z monoklonalnimi protitelesi kažejo, da virus RSV lahko razdelimo v dva različna serotipa, A in B. Antigenska mesta proteina F so zelo enotna, manjšo enotnost zasledimo pri proteinu G, zato v imunoloških diagnostičnih tehnikah uporabljamo protitelesa proti proteinu F, s katerimi lahko dokazujemo vse seve RSV. RSV lahko gojimo na različnih celičnih kulturah. Zanj je značilno, da tvori obsežne sincicije – večjdrne celice, ki se tvorijo zaradi lize celične stene pri prehodu virusa iz celice v celico. Posledica tega mehanizma prehoda virusa iz celice v celico je pomnoževanje virusa kljub prisotnosti specifičnih protiteles.



Slika 74: GRSV z rastjo na celični kulturi tvori sincicije in inkluzije.

Goveji RSV je močno razširjen, velik odstotek odraslih živali je prekužen. Obolenje se v taki populaciji kaže zlasti pri mladih živalih, teletih, v obliki respiratornih obolenj; kašelj, dispnea, bronhopnevmonije. Okužba prizadene predvsem respiratorni trakt. Nastop viremije je odvisen od imunske sposobnosti organizma. Prenos virusa po krvnem obtoku z okuženimi makrofagi in monociti nima večjega vpliva na razvoj bolezni. Bolna žival virus širi v času obolenja, perzistentna oblika bolezni ni poznana.

Virus je mogoče dokazati že od 6 do 10 ur po infekciji, tvorba sincicijev je evidentna že 20 ur po infekciji. Prisotnost virusa dokazujemo v epitelih celicah respiratornih organov z imunofluorescenčnim ali imunoperoksidaznim testom. V diagnostiki običajno uporabljamo označena monoklonalna protitelesa proti proteinu F. Vzorec odvajamo z nosnim brisom ali pljučnim izpirkom. Na ta način pridobljene celice respiratornega trakta fiksiramo na predmetno stekelce in opravimo test IF. Virus lahko tudi najprej namnožimo na celični kulturi in ga determiniramo s testom IF. Zelo uporabna je metoda RT-PCR, pri kateri pomnožujemo ohranjen odsek gena za protein L. Dokaz prisotnosti virusa v zaključni fazi bolezni s to metodo ni več mogoč, ker *in vivo* specifična protitelesa prekrivajo virusne receptorje. Za spremljanje bolezni uporabljamo tudi serološke metode, test ELISA ali seroneutralizacijski test, s katerim dokazujemo specifična protitelesa. Virus je mogoče gojiti na celičnih kulturah različnih živalskih vrst. Prisotnost virusa pa dokazujemo v epitelih celicah respiratornega trakta, ki jih dobimo z nosnim ali laringotrahealnim brisom.

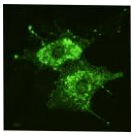
Z uporabo cepiv je mogoče omiliti klinične znake bolezni, ne moremo je pa izkoreniniti. V zaščiti je zelo pomembna lokalna imunost, zato uspešnejšo zaščito dosežemo z uporabo atenuiranih vakcin (živ, oslavljen virus), ki jo apliciramo intranazalno. Intranazalna aplikacija zagotavlja močno tvorbo protiteles skupine IgA, ki imajo najpomembnejšo vlogo pri lokalni zaščiti pred pojavom bolezni. Intramuskularna aplikacija cepiva sproži močan imunski odgovor s tvorbo cirkulirajočih protiteles skupine IgG, kar pa v primeru infekcije RSV običajno daje slabo zaščito pred reinfekcijo.

Rod: *Morbillivirus*

Vrsta: Virus pasje kuge (angl. *Canine distemper virus*)

Pasja kuga je zelo kontagiozna bolezen psov. Razširjena je po vsem svetu. Za pasjo kugo obolevajo vse vrste živali iz družine *Canidae* (psi, volkovi, lisice) in *Mustelidae* (dihurji). Subklinično je razširjena tudi pri mačkah. Patogena je tudi za morske kite. Izolate na osnovi razlik v nukleotidnem zaporedju gena za P in H protein delimo v evropske in ameriške genotipe.

Virus vsebuje 6 strukturnih proteinov, trije (N, P in L) izgrajujejo nukleokapsido, v plašču se nahajata protein H in F ter protein M, ki povezuje nukleokapsido s plaščem viriona. Virus je



občutljiv na topila, kot sta kloroform in eter, 0,05-odstotni formalin ga inaktivira v 4 urah, 0,05-odstotni betapropiolaceton, različni oksidanti in hipokloridna razkužila učinkovito inaktivirajo virus. Na osnovi filogenetske analize gena za protein M so izolate razvrstili v 8 različnih genetskih skupin.

Virus je mogoče kultivirati na celicah pasjega izvora. Posledica razmnoževanja virusa v celicah je formiranje sincicijev in intracitoplazmatske inkluzije. Inficiran pes izloča virus s sekreti in ekskreti. Po vstopu se virus najprej namnoži v celicah sluznic in limfatičnega tkiva. Virus se razmnožuje tudi v limfocitih in se na ta način prenaša po organizmu. Sedmi dan po infekciji lahko virus izoliramo iz vseh limfatičnih organov in limfocitov. Od imunske sposobnosti živali je odvisno, ali bo bolezen potekala v akutni, perakutni ali perzistentni obliki. Zelo pogosto se bolezen zaradi encefalomyelitisov izrazi v živčni obliki. Okužba pogosto poteka subklinično. Imunski odgovor je odvisen od virulence virusa in gostitelja. Nevtralizacijska protitelesa lahko dokažemo po 10 dneh po infekciji.

Pasjo kugo lahko potrdimo z dokazom virusnega antigena. V akutni fazi lahko virus dokažemo v limfocitih ali limfatičnih organih, kasneje pa je izolacija virusa na celični kulturi zaradi prisotnosti protiteles mogoča le iz vzorca možganov ali sluznice sečnice. Izolacija virusa je zahtevna. Najuspešneje se razmnožuje v primarnih celičnih kulturah ali levkocitih neimunega psa. Za izolacijo se uporabljajo tudi celične linije pasjega izvora. Virus povzroča citopatski efekt in formira sincicije (večjedrne celice) ter intracitoplazmatske inkluzije. Zaradi hitrega nastopa specifičnih protiteles je diagnostika s klasičnimi metodami težavna, uporabnejša je metoda RT-PCR, s katero lahko v urinu ali krvnem vzorcu bolnega psa dokažemo prisotnost virusne RNA. Preventivno cepljenje proti pasji kugi je edini način preprečevanja obolenja. Atenuirane žive vaccine, ki vsebujejo nepatogene seve virusa pasje kuge, dajejo zadovoljivo zaščito. Mladi psi dobijo zaščito od prekuženih ali cepljenih mater, vendar ko nivo protiteles običajno po enem mesecu pade, je treba mlade pse cepiti.

Vrsta: Rhinotraheitis puranov

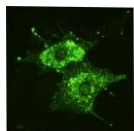
Virus rhinotraheitisa puranov povzroča respiratorna obolenja pri puranih pa tudi pri kokoših. Pri puranih lahko povzroči do 90-odstotno smrtnost obolelih. Diagnostika temelji na dokazovanju protiteles proti virusu rhinotraheitisa puranov.

Vrsta: Kuga drobnice (angl. *Peste de petits ruminants virus*)

Virus *Peste de pestis ruminants virus* je uvrščen v rod *Morbilivirus*. Virus povzroča izredno kontagiozno obolenje, ki prizadene predvsem drobnico, z znaki pljučnice, enteritisa, erozij po sluznicah ustne votline in s smrtjo. Bolezen je prisotna med Saharo in ekvatorjem v Afriki, na Bližnjem vzhodu in Indiji. Za laboratorijsko diagnostiko so na voljo testi ELISA za dokaz virusa in specifičnih protiteles proti virusu PPRV kot tudi test RT-PCR in qRT-PCR. Virus lahko tudi uspešno gojimo na celičnih kulturah. Pred okužbami je živali mogoče zaščititi s preventivnim cepljenjem. Bolezen v Evropi ni bila nikoli potrjena.

Vrsta: Virus goveje kuge (angl. *Rinderpest virus*)

Virus goveje kuge so uvrstili v rod *Morbilivirus*. Goveja kuga spada v skupino izredno nevarnih kužnih bolezni, saj je v skladu z mednarodnimi predpisi prepovedan promet z govejo živino iz držav, v katerih se pojavlja ta bolezen. V Evropi so jo izkoreninili že v 20. stoletju. Od leta 2011 dalje velja goveja kuga za izkoreninjeno bolezen. Zboli govedo, ovce, koze in divji prežvekovalci. Značilnost goveje kuge je akutno febrilno stanje živali. Smrtnost je zelo visoka, v nezaščiteni populaciji do 90-odstotna. Virus goveje kuge ni posebno stabilen, je občutljiv na visoko temperaturo. Poznan je le en serotip. Antigensko je zelo soroden virusu pasje kuge. Za razliko od virusov iz poddružine *Paramyxovirinae* nima hemaglutinacijskih lastnosti. Virusni genom kodira 6 strukturnih proteinov in



tri nestrukturne proteine, imenovane P, C in V. Na 3' koncu genoma se nahaja leder RNA z zaporedjem 55 baznih parov. Genom se zaključi z repnim RNA koncem, ki ga predstavlja zaporedje 37 baznih parov. Med vsakim genom se nahaja stop/start signal, ki ga predstavlja trinukleotidna sekvenca GAA. Genom virusa goveje kuge izgrajuje zaporedje 15.882 nukleotidov. Nukleotidno zaporedje genoma je že poznano in opisano pri različnih izolatih.

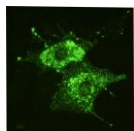
Bolezen se z živali na žival prenaša posredno ali neposredno s kontaktom, aerosolom in vetrom. Velike količine virusa se nahajajo v slini, urinu in fecesu bolne živali. Oboleva tako govedo kot ovce in koze. Virus se najprej namnoži v celicah tonzil ter v mandibularnih in faringealnih bezgavkah. V fazi viremije je virus prisoten v vseh organih. Zaradi limfotropnih lastnosti virusa se pojavi limfopenija in posledično odpoved imunskega sistema.

Virus goveje kuge lahko dokazujemo v vzorcu krvi ali vzorcu notranjih organov – bezgavke, vranica, tonzile, jetra. Za dokaz virusnega antigena potrebujemo vzorec krvi, ki mu dodamo antikoagulant. Prisotnost virusnega antigena lahko dokažemo z imunodifuzijskim testom, imunofluorescenčnim ali imunoperoksidaznim testom, prisotnost virusnega genoma pa z metodo RT-PCR. Prisotnost protiteles proti virusu goveje kuge dokazujemo s testom ELISA in seronevtralizacijskim testom.

Goveja kuga je prva bolezen, ki jo je na svetu uspelo izkoreniniti v vseh državah sveta. Mednarodna organizacija za zdravje živali je leta 2011 proglasila, da je goveja kuga izkoreninjena.

Dodatni študijski viri:

- Barlic-Maganja D, Krapež U, Mankoc S, Toplak I, Rojs OZ. Fusion and matrix protein gene sequence analysis of paramyxoviruses of type 1(PMV-1) isolated from pigeons in Slovenia. *Virus Genes*. 2005 Dec;31(3):265-73.
- Cattoli G, Susta L, Terregino C, Brown C. Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *J Vet Diagn Invest* 2011; 23(4): 637–56.
- Fratnik Steyer, A. Neposredno dokazovanje ptičjih paramiksovirusov tipa 1. Direct detection of avian paramyxoviruses type 1. Doktorska disertacija. Doctoral thesis. Ljubljana: [A. Fratnik Steyer], 2010. XIV, 167.
- Krapež U, Slavec B, Barlič-Maganja D, Rojs OZ. Molecular analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Slovenia between 1990 and 2005: a retrospective study. *Virus Genes*. 2010 Dec;41(3):414-6. doi: 10.1007/s11262-010-0528-x. Epub 2010 Sep 16.
- Martella V, Elia G, Buonavoglia C. Canine distemper virus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2008; 38(4): 787–97.
- Morens DM, Taubenberger JK. Historical thoughts on influenza viral ecosystems, or behold a pale horse, dead dogs, failing fowl, and sick swine. *Influenza Other Respi Viruses* 2010; 4(6): 327–37.



12

RHABDOVIRIDAE

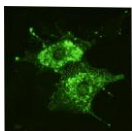
Skupna morfološka značilnost virusov, uvrščenih v družino *Rhabdoviridae*, je paličasta oblika virusa z enim ošiljenim in drugim ravnim koncem. V to družino spadajo povzročitelji nekaterih pomembnih bolezni v veterinarski medicini, kot so virus stekline, virus vezikularnega stomatitisa, virus goveje groznice in nekateri povzročitelji virusnih bolezni rib, kot so povzročitelj virusne hemoragične septikemije postrvi in virus kužne hematopoetske nekroze postrvi.

Splošne lastnosti in klasifikacija rabdovirusov

Družina *Rhabdoviridae* je uvrščena v red *Mononegavirales* – v to skupino spadajo virusi z RNA nukleinsko kislino, ki je enovijačna in negativno orientirana. V družino *Rhabdoviridae* je uvrščenih nad 175 različnih virusov vretenčarjev, artropodov in rastlin. Obravnavali bomo za veterinarsko medicino pomembne vrste virusov, uvrščene v naslednje rodove: *Lyssavirus*, *Novirhabdovirus* in *Vesiculovirus* ter *Ephemerovirus*.

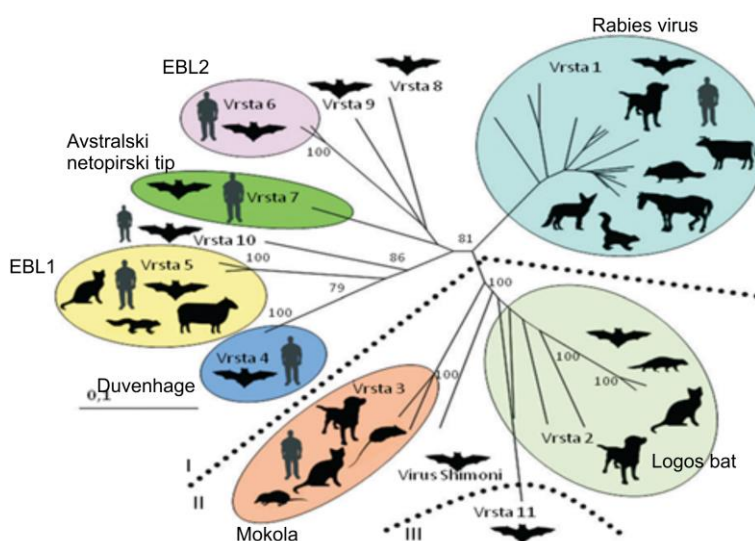
Tako imajo vse vrste, uvrščene v rod *Novirhabdovirus*, med genoma G in L lociran dodatni gen NV, njihova nukleotidna zaporedja pa so značilna in se razlikujejo od drugih rodov. Gen NV kodira nestrukturni protein. Za razliko od ostalih rabdovirusov, rabdovirusi pri ribah povzročajo okužbe in obolenja pri znatno nižjih temperaturah (12 °C–15 °C), kar je posledica prilagajanja na hladnejše vodno okolje.

Rod/Vrsta	Gostitelji
CYTHORHABDOVIRUS	
EPHEMEROVIRUS	
LYSSAVIRUS	
<i>Aravan virus</i>	netopirji
<i>Australian bat lyssavirus</i>	netopirji, človek
<i>Duvenhage virus</i>	netopirji, človek
<i>European bat lyssavirus 1</i>	netopirji, človek, ovca, jazbec, lisica
<i>European bat lyssavirus 2</i>	netopirji, človek
<i>Irkut virus</i>	netopirji
<i>Lagos bat virus</i>	netopirji, jazbec, lisica, pes
<i>Khujand virus</i>	netopirji
<i>Mokola virus</i>	pes, mačka, človek, glodavci
<i>Rabies virus</i>	sesalci
<i>Shimoni bat virus</i>	netopirji
<i>West Caucasian bat virus</i>	netopirji
NOVIRHABDOVIRUS	
<i>Infectious haemathopoietic necrosis virus</i>	šarenka, losos
<i>Viral haemorrhagic septicemia virus</i>	šarenka, losos
NUCLEORHABDOVIRUS	



VESICULOVIRUS	
<i>Vesicular stomatitis New Jersey virus</i>	
<i>Vesicular stomatitis Indiana virus</i>	
<i>Vesicular stomatitis Alagoas virus</i>	
<i>Spring viremia of carp virus</i>	Krapovske vrste rib
EPHEMOVIRUS	
<i>Bovine ephemeral fever virus</i>	govedo, bivoli

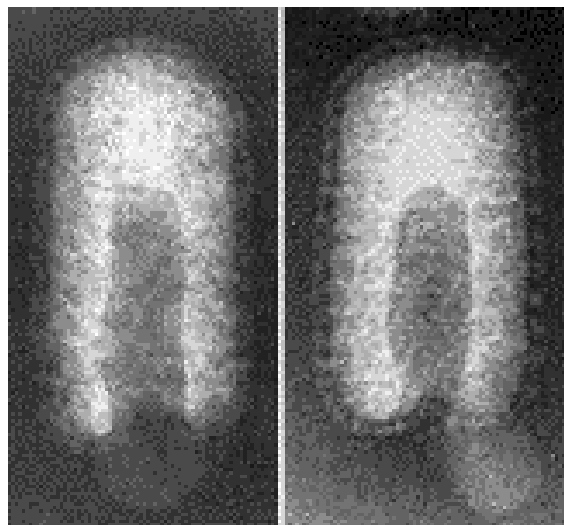
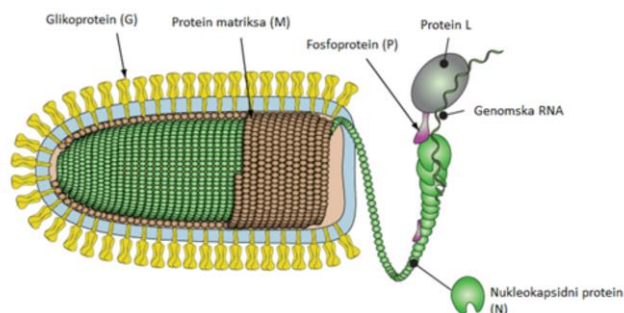
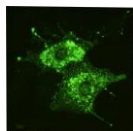
Preglednica 10: Klasifikacija virusov znotraj družine *Rhabdoviridae*.



Slika 75: Sorodstveni odnosi med vrstami znotraj rodu *Lyssavirus* s prikazom vrst pri katerih je bila posamezna vrsta potrjena.

Struktura rabdovirusov

Morfologijo virusa stekline je prvi opisal Matsumoto leta 1962. Na osnovi elektronsko mikroskopske analize je ugotovil osnovne karakteristike virusa. Skupna značilnost virusov iz te družine, ki povzročajo infekcije tako pri vretenčarjih kot nevretenčarjih ter rastlinah, je paličasta oblika viriona z ošiljenim koncem, velikosti od 100 nm do 430 nm v dolžino in 45 nm do 100 nm v premeru. Površina viriona je pokrita z betiči, velikosti od 5 do 10 nm ter premera do 3 nm. Iz posnetka virusa z elektronskim mikroskopom je razvidno, da je virus paličaste oblike z ošiljenim koncem. Pogosto najdemo tudi nekompletne virusne partikle, ki se v strukturi genoma razlikujejo od 20 % do 50 %. Zaradi nastalih delecij taki partikli niso infektivni.



Slika 76: Shematski prikaz zgradbe rabdovirusa.

Povzeto po:

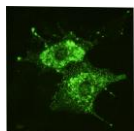
http://expasy.org/viralzone/all_by_species/76.htm

Slika 77: Elektronsko mikroskopski posnetek virusa stekline, 400.000-kratna povečava.

V bistvu je virus zgrajen iz dveh strukturnih komponent: nukleokapside in plašča, zgrajenega iz lipoproteinske ovojnice, ki se tesno prilega nukleokapsidi. Nukleokapsida je spiralno zvita, cilindrične oblike s premerom do 50 nm. Nukleokapsido predstavlja ribonukleinska kislina (RNA) in strukturna proteina z oznakami N (nukleoprotein) in L (polimerazni protein), ostali strukturni proteini z oznakami P (angl. *phosphoprotein*), M (angl. *matrix protein*), G (angl. *glycoprotein*) se nahajajo v plašču virusa. Molekularna teža virusa je od 300 do 1000 x 10⁶ daltona. Virusni delec kemično sestavljajo: 3 % ribonukleinska kislina (RNA), 74 % beljakovine, 20 % lipidi in 3 % ogljikovi hidrati.

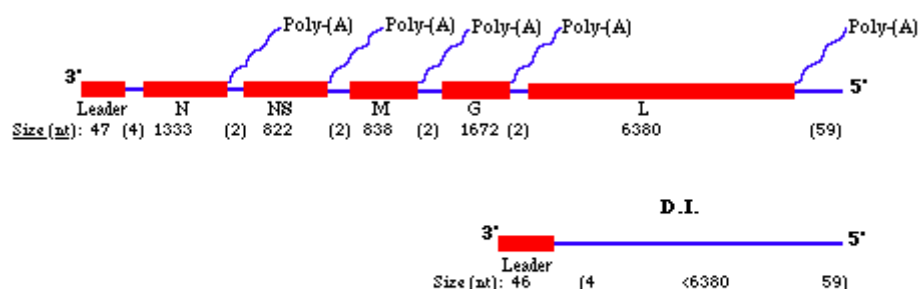
Genom rabdovirusov

Genom virusa stekline sestavlja linearna enovijačna negativno polarna molekula RNA. Sestavlja ga 5 ali 6 genov za strukturne proteine v zaporedju 5' N-P-M-G-(X)-L 3'. Gen X je prisoten pri rabdovirusih rib, rod *Novirhabdoviridae*. Med posameznimi geni so kratke intergenske regije dinukleotidov ali pentanukleotidov. Med vsakim bralnim okvirjem se nahaja intergensko nekodirajoče zaporedje, z ohranjenim zaporedjem (stop kodon), ki mu sledi sedem adenzinskih ostankov in so prisotna na koncu vsakega kodirajočega genskega odseka genoma. Sledi kodon ATG, ki predstavlja startni kodon za začetek translacije gena za posamezni protein. Stop/start kodon se nahaja med genoma N in P, med P in M ter med M in G. Intergenska regija med genoma G in L je pri serotipu virusa stekline 1 dolga 423 nukleotidov in pri virusu mokola 504 nukleotide. Ta regija je dovolj dolga, da bi lahko kodirala protein, vendar nima odprtega bralnega okvirja (angl. *open reading frame*, ORF), zato jo imenujemo psevdogen psi (ψ). Regija psevdogena Ψ je najbolj variabilna regija genoma. S pomočjo te regije lahko sledimo evoluciji virusa stekline. Nekodirajoča 3' in 5' konca vijačnice RNA, ki ju imenujemo »leader« in »trailer« sekvenca, sta komplementarna, kar najverjetneje pomeni zaščito virusne RNA pred nastankom različnih strukturnih elementov, kot



so lasnice in interne zanke, ki onemogočajo funkcijo polimeraze RNA in posledično prepisovanje gena. Leader RNA (sekvenca na 3' koncu) nastopa kot promotor, ki ga prepozna virusna RNA transkriptaza (protein L) ali kompleks RNA polimeraze (protein L in P).

Glede na funkcijo sestavljajo genom trije segmenti: translokacijski, antigenski in transmembrani. Translokacijski segment je vključen v nastajanje beljakovin, vezan na endoplazmatski retikulum. Transmembrani segment je odgovoren za vezavo sladkorjev v procesu potovanja beljakovine skozi Golgijev aparat do citoplazmatske membrane.

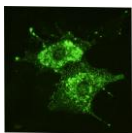


Slika 78: Shematski prikaz genoma rabdovirusov.

Virusni proteini

Rabdovirusi vsebujejo pet ali šest strukturnih proteinov, označenih kot glikoprotein G, nukleoprotein N, fosfoprotein P (označen tudi z NS), matriks protein M in RNA polimeraza protein L. Za rabdoviruse je značilno, da so genetsko zelo variabilni in so mutacije zelo pogost pojav.

Nukleokapsidni protein (N) je v okuženih celicah z rabdovirusi prisoten v najvišji koncentraciji. Je prvi virusni protein, ki se sintetizira v okuženi celici. V virionu je prisoten v fosforilirani obliki. Gen N kodira protein s 413 aminokislinami. Na svojih amino- in karboksilnih domenah je močno hidrofilen, hidrofobna regija pa se nahaja v srednji tretjini proteina. Karboksiterminalni konec virusnega proteina N je vključen v vezavo proteina N na virusno RNA. Protein N igra ključno vlogo regulacije virusne transkripcije in replikacije. Ta protein je tudi glavna antigenska tarča za limfocite T. Funkcija proteina N je zaščita genoma, ki tvori kapsido viriona. Med različnimi genotipi ima najbolj ohranjeno aminokislinsko sestavo. Razlog za tako veliko ohranjenost proteina, še posebej med posameznimi regijami proteina N, so ključne funkcije proteina. Protein N ščiti genom pred delovanjem ribonukleaz. Sodeluje pa tudi pri formiranju virusa v fazi njegovega razmnoževanja. Protein N se hitro porabi za tvorbo homolognih (N – N) in heterolognih (N – P) kompleksov pri vezavi v RNA v kompleks RNP. Preden se N veže v kompleks z RNA, na njem potekajo specifične konformacijske spremembe, pri katerih pride tudi do fosforilacije na serinu 389. Fosforilacija proteina N poteka le pri virusu stekline, medtem ko za druge rhabdoviruse ni značilna. Rekombinanten protein N virusa stekline so začeli proizvajati v celicah insektov. Ugotovili so, da je protein N okrog molekule RNA oblikoval strukturo v obliki obroča. Proteinske enote N so postavljene vsakih 9–11 nukleotidov okrog RNA, kar je dovolj za obvarovanje RNA pred ribonukleazno aktivnostjo. Pri genomu, ki kodira protein N, je pri različnih izolatih virusa stekline, serotipa 1 ugotovljena 88 do 99-odstotna homolognost. Enako velja tudi za zaporedje aminokislin. Zaradi nizke stopnje divergence proteina N se protitelesa proti proteinu N pogosto uporabljajo za



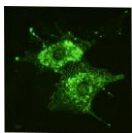
potrebe diagnostike. Zaradi velike enotnosti tega proteina tako zajamemo vse izolate virusa stekline in ni bojazni, da bi dobili lažno negativne rezultate.

Protein G je med najbolj proučenimi in nastopa kot antigen, na katerega se vežejo nevtralizacijska protitelesa. Protein G je sestavljen iz 505 aminokislin, omogoča interakcijo virusa z receptorjem in vstop virusa v tarčno celico. Prvih 19 aminokislin predstavlja signalni peptid (SP), ki omogoča prenos nativnega proteina skozi membrano zrnatega endoplazmatskega retikuluma (ER) v Golgijev aparat (GA), kjer se signalni protein iz glikoproteina G odcepi. Prepoznajo ga limfociti in tako sproži nastanek nevtralizacijskih protiteles. Po vstopu virusa v celico se protein G pri nizkem pH zlije z endosomalno membrano. Protein G je tudi mesto vezave nevtralizacijskih protiteles. Nukleotidno zaporedje gena za protein G je že poznano pri mnogih izolatih. Serotipizacija virusa stekline je prav tako vezana na protein G. Variacije aminokislinskega zaporedja v tej regiji so v povezavi s patogenostjo in imunološkimi lastnostmi posameznih izolatov. Homolognost aminokislinskega zaporedja med posameznimi izolati je 90-odstotna. Ugotovljeno je, da je virulenca, nevrovirulentnost virusa, prav tako vezana na protein G. Nevtralizacijska protitelesa imajo svoja vezišča na antigenskem mestu proteina G. Na glikoproteinu G je vsaj 6 antigenskih mest za vezavo protiteles, ki se nahajajo med aminokislinami 1-439. Mutacije na glikoproteinu lahko vplivajo na virulenco virusa. Izguba nevrovirulentnosti je vezana na točkovne mutacije na genu za protein G, zaradi katerih lahko pride do zamenjave aminokislina. Virusne variante virusa stekline, ki imajo glutamin (Glu), izoleucin (Ile), glicin (Gly), metionin (Met) ali serin (Ser) namesto Arg-333, predstavljajo seve, ki so manj patogeni ali pa so celo nevtrulentni za odrasle imunokompetentne miši. Že zamenjava ene same aminokislina lahko vpliva na širjenje virusa iz celice v celico kot tudi na širjenje virusa do centralnega živčnega sistema. Vakcinalni sev Flury, ki nima nevrotropnih lastnosti, ima aminokislino arginin na mestu 333 zamenjano z glutaminom (Glu). Znotraj proteina G se nahajajo še oligosaharidne vezi in maščobne mulekule. Glikoprotein G je vključen tudi v primeru trans sinaptične širitve virusa.

Fosfoprotein (protein P, sinonim: protein M1) je zgrajen iz 297 aminokislin. Njegova vloga je v tvorbi matrice RNA. Sekvence proteinov P različnih sevov kažejo na veliko podobnost, celo do 94-odstotno identičnost na aminokislinskem nivoju. Fosfoprotein predstavlja skupaj s proteinom N ključno komponento RNA polimeraznega kompleksa v virusu in deluje kot regulatorni protein pri virusni replikaciji. Sestavlja ga 297 aminokislin, ki so visoko ohranjene (več kot 97 %) med *lyssavirusi* genotipa 1. Protein P deluje tudi kot blokator proteina N, ker zavira njegovo polimerizacijo. Skupaj s proteinom L tvori RNA polimerazni kompleks, ki katalizira pomnoževanje virusnega genoma. V osnovi pa deluje protein P kot stabilizator proteina L in omogoča vezavo polimeraznega kompleksa na molekulo RNA. Pojavlja se v dveh oblikah: hipofosforiliran in hiperfosforiliran, ki različno potujeta v SDS-poliakrilnem gelu. Najbolj ohranjena regija v proteinu P se nahaja na sredini sekvence med aminokislino 139 in 170.

Protein L kodira gen z največ nukleotidi, sestavljen je iz 6348 baznih parov, ki kodirajo 2127 aminokislin. Gen za kodiranje proteina L predstavlja 54 % genoma virusa stekline. Rabdovirusni protein L je večfunkcionalni encim, odgovoren za polimerizacijo virusne RNA, za začetek transkripcije, replikacije in za potek enkapsidacije (vrinjanje genoma v kapsido). Aktivnost transkriptaze je vezana na protein L. Je katalitična enota polimeraznega kompleksa. Skupaj z nekatalitičnim kofaktorjem P sodelujeta pri večini encimskih reakcij v procesu transkripcije in replikacije. Tri osnovne aktivnosti, ki jih opravlja protein L, omogočajo vezavo in uporabo molekule ATP.

Protein M (angl. *matrix protein*) povezuje ribonukleokapsido z virusno membrano. V strukturi virusa nastopa kot povezovalna molekula plašča viriona z nukleokapsido. Njegova vloga je izražena v procesu transkripcije in replikacije virusnega genoma. Je najmanjši protein v virionu virusa stekline,



sestavljen iz 202 aminokislin (25 kDa). Protein M sodeluje pri regulaciji transkripcije RNA, pri kondenzaciji helične sredice RNP, pri povezovanju z dvoslojno membrano in je vključen v citopatogenezo virusno inficirane celice. Približno 1200–1500 kopij proteina M se veže na sredico RNP virusa stekline. Istočasno veže virusno sredico na membrano citoplazme, na kateri se začne sproščanje virusnih delcev iz gostiteljeve celice. Protein M daje virionu karakteristično strukturo oblike puškega naboja. Sodeluje tudi pri eksocitozi virionov iz celice, hkrati pa je skupaj s proteinom G potreben tudi za učinkovito sestavljanje virusnih delcev. Interakcija transmembranskih izrastkov proteina G in virusnega kompleksa RNP–M je nujno potrebna za nastanek infektivnih virusnih delcev.

Kemična sestava rabdovirusov

Analize kemične sestave virionov rabdovirid kažejo, da vsebujejo 74 % proteinov, 20 % lipidov 3 % karbohidratov in 3 % RNA. Virus hitro inaktivira visoka temperatura (v eni uri pri 30 °C) in ultravioletni žarki. Občutljiv je na maščobna topila.

Pomnoževanje virusa stekline

Za vse nesegmentirane negativno orientirane enovijačne viruse RNA je značilen enoten osnovni mehanizem replikacije: Negativno orientirana RNA se najprej prepíše v monocistronsko pozitivno orientirano RNA. Prepisani genom v celoti služi kot matrica za tvorbo novih negativno orientiranih molekul RNA. Pomnoževanje virusa je sestavljeno iz različnih stopenj, ki si sledijo: pritrjevanje na celico, vstopanje v celico, sproščanje virusne nukleinske kisline, sinteza virusnih beljakovin in pomnoževanje virusne nukleinske kisline, sestavljanje novih virusnih partiklov in izstopanje iz celice.

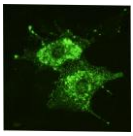
Vezava

Pomnoževanje virusa se praktično začne z vezavo virusnih partiklov na celico gostiteljico. Betiči na površini viriona, to so molekule proteina G, predstavljajo vezno mesto za receptorska mesta na površini celice. Virusi lahko vstopijo v celico šele, ko se pred tem s posebnimi beljakovinskimi ligandi, ki so na površini virusov, pritrdijo na specifične beljakovinske receptorje na membrani celic. Kot ligand pri virusu stekline nastopa protein G, ki je sestavni del virusne ovojnice. Mišične in živčne celice nastopajo kot tarčne celice. Ligandi se vežejo na acetilholinske receptorje in druge receptorje, ki vsebujejo fosforno kislino, zlasti nevronski receptorji z oznako CD56. Receptorji CD56 sodijo v družino imunoglobulinskih receptorjev, ki se nahajajo na nevronih, astrocitih, mieloblastih, aktiviranih limfocitih T in celicah ubijalkah. Odstranitev virusnih proteinov G s proteolitičnimi encimi onemogoči adsorbcijo. Vezava je tudi odvisna od medija pH, optimalna je pri 6,5 do 6,0. Vezava virusov je neodvisna od spremembe temperature in energije, poteka v prisotnosti ionov, ki zmanjšujejo elektrostatični naboj.

Vstopanje

Virus vstopa v celico gostiteljico najprej po principu endocitoze in fuzije, ki sledi pritrditvi virusa na celico gostiteljico. Najprej pride do fuzije virusnega plašča s celično membrano. Potek fuzije je odvisen od okolice pH, za fuzijo je potrebna energija. Citoplazemska membrana se uviha v notranjost celice in obda virusno nukleokapsido, nastane mešiček, ki se oddvoji od membrane in se sprost v citoplazmo. V en mešiček se vključi pet ali več virusnih delcev. V citoplazmi se mešiček zlije z lizosomom. V lizosomu se zaradi prisotnosti lizosomalnih encimov kapsida razgradi, govorimo o slačenju virusa.

Prepisovanje



Rhabdovirusi vsebujejo nesegmentiran negativno orientiran genom RNA, kar pomeni, da virusna RNA ni sposobna direktne prevedbe v virusne proteine, ampak je predhodno potreben prepis in tvorba pozitivne komplementarne RNA. To stopnjo pretvorbe zagotavlja virusna od RNA odvisna polimeraza RNA (protein L). Po vstopu in proteolizi nukleokapside se virusni negativno orientiran genom najprej ob aktiviranju virusne polimeraze RNA prepíše v pet monocistronskih RNA (mRNA), ki služijo za sintezo petih virusnih proteinov, nato se ob prisotnosti proteina N prepíše v celotno verigo mRNA, ki služi kot matrica za tvorbo novih negativnih molekul RNA. Obstaja le eno promotorsko mesto na 3' koncu virusnega genoma, sekvenca 3'-UUGU-5' na 3' koncu, ki predstavlja signal za prepis. Polimeraza se veže na tem mestu na genomsko RNA in se pomika po virusni RNA, kjer ob vsakem novem genu naleti na stop/start signal. Le določeno število molekul polimeraze preskoči ta mesta in nadaljuje prepisovanje. Posledica tega mehanizma, ki se imenuje pojemajoče prepisovanje, je, da se prepíše več mRNA z genov, ki so bližje 3' koncu genoma. Tako nastane večja količina strukturnih proteinov proteina N kot proteina L. Na ta način se pomnoži zaporedje genov, ki je N>P>M>G>L. V primarnem pomnoževanju še ni sinteze proteinov. Z nastankom monocistronske mRNA in sinteze proteina L nastane RNA odvisna polimeraza RNA (transkriptaza), ki regulira prepisovanje matrične mRNA v novonastale molekule RNA. Prepisovanje regulira protein M, P in L. Vse stopnje prepisovanja se odvijajo v citoplazmi celice.

Pomnoževanje proteinov

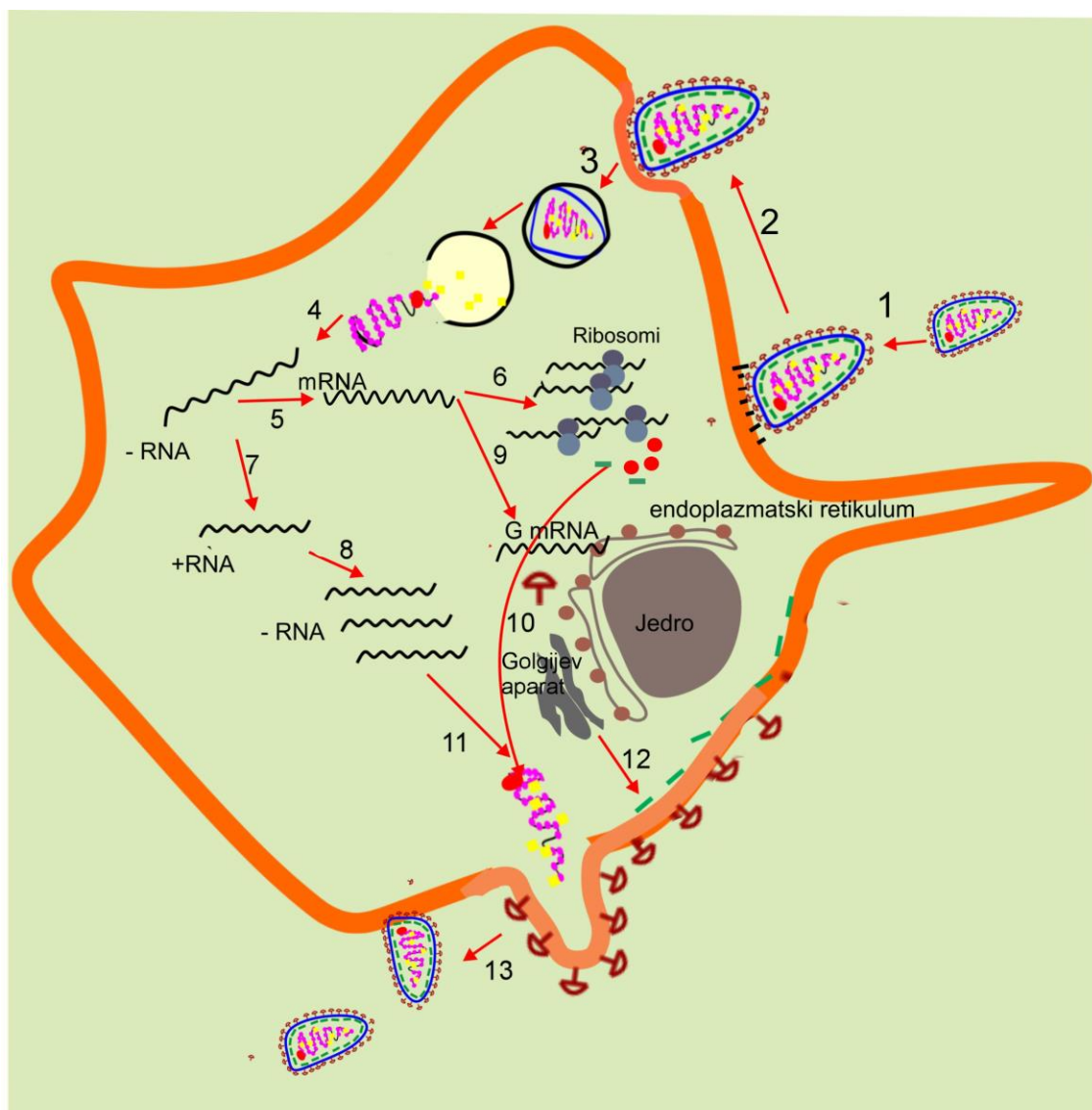
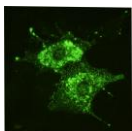
Sinteza proteinov se začne šele, ko se sporočilne RNA za posamezni protein vežejo na citoplazemske poliribosome in se prevedejo v posamezne beljakovine. Značilnost pozitivno orientirane molekule RNA je v koncu 5', ki se zaključi z zaporedjem do 10 baz adenana (adenilirani konec ali poli A konec), kar daje stabilnost RNA. mRNA za protein G se izjemoma ne prevaja na prostih ribosomih, ampak na ribosomih vezanih na endoplazmatski retikulum. Molekule proteina se nato vrinejo v membrane endoplazmatskega retikuluma, protein G, potuje skozi Golgijev aparat, formira se mehurček in se prevede do celične citoplazmatske membrane. Na protein G se vežejo glikozidi, preden se inkorporira v celično membrano. Glikolizacija poteka pod vplivom celičnih glikoziltransferaz. Po združitvi s citoplazemsko membrano se na molekule proteina G pripne še protein M. Novosintetiziran protein N je promotor za sintezo negativno orientirane RNA. Virusna replikaza sintetizira pozitivno polarno RNA, ki je matrica za nove molekule genomske RNA.

Pomnoževanje genoma

Posledica povišane koncentracije proteina N je blokada transkripcijskih mest na virusni RNA in s tem zaustavitev transkripcije virusne RNA v posamezne fragmente mRNA. Polimerazni kompleks prepíše virusno RNA v celoti, nastane enotna cRNA (antigenom), ki služi kot matrica za nastanek novih virusnih molekul RNA.

Sestavljanje virusa

V poliribosomih proizvedeni proteini N, M in L se združijo in oblikujejo kapsomere. Protein N se takoj veže na novonastale virusne molekule RNA in s tem zaščiti virusni genom pred restrikcijskimi encimi in razpadom virusne RNA. Kapsomere tvorijo kapsido, ki obda virusni genom in ga na ta način zaščiti. Virus se sestavlja v citoplazmi. Mesta sestavljanja virusa so vidna pod mikroskopom in jih imenujemo vključki ali inkluzije. To so beljakovinske strukture, sestavljene iz večjega števila nukleokapsid. Brstenje virusov se začne tako, da proteini G izpodrinejo celične proteine iz citoplazemske membrane. Na citoplazemsko membrano se pripne še protein M in nukleokapsida. Celična membrana se izboči in za seboj povleče še nukleokapsido. Lipidi, ki jih najdemo v virusnem plašču, so tako celičnega izvora. Na koncu se virion odščipne in se sprosti v okolico. Virus izstopa iz celice po principu brstenja.

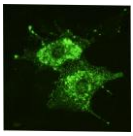


Slika 79: Prikaz pomnoževanja virusa: (1) Vezava virusa na celično steno, (2) vstopanje virusa s procesom vodene endocitoze in pinocitoze formiranje endosoma (3), formiranje mešička, (4) slačenje virusa in sproščanje virusnega genoma iz kapside, (5) prepis posameznih genov v mRNA, (6) translacija na prostih ribosomih, (7) prepis celotnega genoma iz –RNA v +RNA, (8) sinteza genoma, (9) sinteza proteinov ovojnice na ribosomih endoplazmatskega retikuluma, (10) kondenzacija proteinov kapside, (11) uvajanje virusnega genoma v kapsido, (12) glikolizacija ovojničnih proteinov v Golgijevem aparatu in potovanje do celične membrane, (13) brstenje in sproščanje zrelih virusov iz celice

Virusi, uvrščeni v rod *Lyssavirus*

Vrsta: Virus stekline (angl. Rabies virus)

V rod *Lyssavirus* je uvrščenih 12 različnih vrst virusov. Vse vrste povzročajo bolezen, imenovano steklina. V zadnjem času je ugotovljeno, da so tudi netopirji pogosto rezervoar virusa stekline. Vse



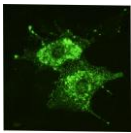
vrste so si serološko sorodne, ne pa v tolikšni meri, da bi dajale popolno navzkrižno imunsko zaščito, od vrste 1 v imunološkem smislu še najbolj odstopata vrsti 2 in 3. Virus stekline, vrsta 1, je razširjen po vseh celinah z izjemo Avstralije, pri nas primarno med populacijo lisic. V Evropi sta bili ugotovljeni še dve vrsti, vrsta 5 in 6 znotraj rodu *Lyssavirus*, in sicer *European bat lyssavirus 1* (EBL 1) in *European bat lyssavirus 2* (EBL 2). Vrsto logos bat so najpogosteje izolirali v Nigeriji in Centralni afriški republiki, vrsto mokola virus so ravno tako ugotovili pri različnih domačih in divjih živalih ter človeku v različnih državah Afrike, vrsta *duvenhage virus* je bila najprej ugotovljena pri človeku v Južni Afriki, kasneje pa so ga našli tudi pri netopirjih v Evropi. Avstralski netopirski virus stekline so najprej ugotovili leta 1996 pri človeku, nato še pri netopirjih. Vrste Aravan, Khujand, Shimoni in Zahodno kavkaška vrsta so bile ugotovljene pri insektojedih netopirjih. Vakcinalni virus stekline, serotip 1, ima slabše zaščitne učinke pred infekcijo z ostalimi serotipi. Skupna značilnost vseh izolatov je, da so vsi genotipi virusa stekline patogeni za sesalce, bolezen pa se konča s smrtjo.

Najpogostejši prenos bolezni je z ugrizom bolne živali ali s kontaktom preko sluznic, poškodbe na koži. Opisan je tudi primer prenosa z aerosolom v laboratoriju in tudi primeri prenosa bolezni s človeka na človeka v primeru transplantacije roženice.

Epizootiologija stekline

Steklina je razširjena praktično povsod po svetu z izjemo nekaj otokov, kot so Velika Britanija, Japonska, Nova Zelandija, Antarktika in Havaji. S programom eradikacije je bila izkoreninjena v Veliki Britaniji in na Japonskem, vendar v teh dveh primerih ni bilo silvatične oblike stekline, osnovni prenašalci virusa so bili psi. Silvatična oblika stekline je bila do zdaj izkoreninjena v Švici, Franciji, na Danskem, Nizozemskem, Finskem, v Italiji, Avstriji in na Češkem ter v veliki meri v Nemčiji. V svetu za steklino še vedno letno umre nad 50.000 ljudi, pougrizne terapije je bilo deležno nad 10 milijonov ljudi letno. Najpomembnejši prenašalci bolezni na človeka so še vedno psi, pogoste so tudi divje živali in netopirji. V evropskem prostoru je steklina najpogosteje ugotovljena pri divjih živalih, zlasti pri rdeči lisici (*Vulpes vulpes*) Mesojede živali (zveri) so najpomembnejši rezervoar in vir okužbe. Rastlinojede živali so v verigi prenosa bolezni v bistvu nepomembne, ker se pri njih bolezen konča s smrtjo, prenos na druge živali pa je zelo redek. Na človeka se bolezen prenese prvenstveno z direktnim kontaktom s steklo živaljo, kot na primer z ugrizom, zelo redko pa tudi na druge načine (mleko, urin, solze). V svetu so vir okužbe divjih in domačih živali ter človeka različne vrste živali. V centralni Evropi je to zagotovo lisica (*Vulpes vulpes*), v severnih predelih pa polarna lisica (*Alopex lagopus*), na področju Azije in Afrike so to rakunski pes (*Nyctereutes procyonides*), volk (*Canis vulpus*), šakal (*Canis aureus*), divji psi (*Coun alpinus*), mungo (*Herpestes edwardsi*), v Ameriki so rakuni (*Procyon lotor*), dihurji (*Mephitis mephitis*), lisice in različne vrste netopirjev, kot na primer vampirski netopir (*Desmodus rotundus*) kot tudi insektojedi netopirji. Urbano obliko stekline, razširjeno tudi med domačimi mesojedimi živalmi, srečamo v afriških državah, državah Azije (Indija, Pakistan) in tudi v Turčiji. V epidemiološkem smislu poznamo tako imenovano urbano in silvatično obliko stekline. Pri urbani obliki stekline je najpomembnejši prenašalec in rezervoar virusa običajno pes. V večini evropskih držav so urbano obliko stekline iztrebili s preventivno vsakoletno vakcinalno psov, ki se prakticira še danes. Silvatična oblika stekline se je v Evropi kot epizootija pojavila po drugi svetovni vojni. Najprej je bila ugotovljena na Poljskem (leta 1939) in se je s hitrostjo od 20 do 60 km letno nezadržno širila proti zahodu in jugu. Postopoma se je razširila po vseh srednje in južno evropskih državah in v letu 1972 dosegla meje naše države.

Predvidevamo, da je v Evropi lisica ključni vir ohranjanja stekline v naravi, zato tudi ima zatiranje stekline pri lisici tolikšen pomen. Države Evropske unije so leta 1986 zaradi ogrožanja zdravja človeka, ekonomskih izgub in težav pri transportu z živalmi sprejele odločitev o skupnem zatiranju te bolezni. Pojavlja se tudi problem »odprtega trga«, ko želijo države, ki so si pridobile status proste stekline, ta status tudi obdržati in samo vprašanje časa je, kdaj bo EU sprejela drugačna pravila v



zvezi s steklino. S peroralno vakcinacijo lisic je v letu 2011 začela tudi sosednja Hrvaška in ostale države nekdanje Jugoslavije.

Navkljub dolgoletnemu zatiranju te bolezni in možnostim uporabe preventivnih posegov je bolezen še vedno razširjena praktično po vsem svetu. Endemično se pojavlja le v nekaterih geografsko osamljenih regijah. Velik zdravstveni problem predstavlja steklina v državah, v katerih je razširjena med populacijo psov, kot to zasledimo v azijskih državah. Po poročilih organizacije WHO vsako leto za steklino v Bangladešu umre 2000 ljudi, 4500 na Kitajskem, 6500 v Pakistanu in v Indiji nad 30.000 ljudi. V letu 1996 so steklino ugotovili celo v Avstraliji, ki je veljala za prosto te bolezni. V tem primeru je infekcijo in smrt človeka povzročil nov virus, ki so ga uvrstili v rod *Lyssavirus*. Genotipsko se nekoliko razlikuje od zdaj ugotovljenih virusov v rodu *Lyssavirus*.

Občutljivost virusa:

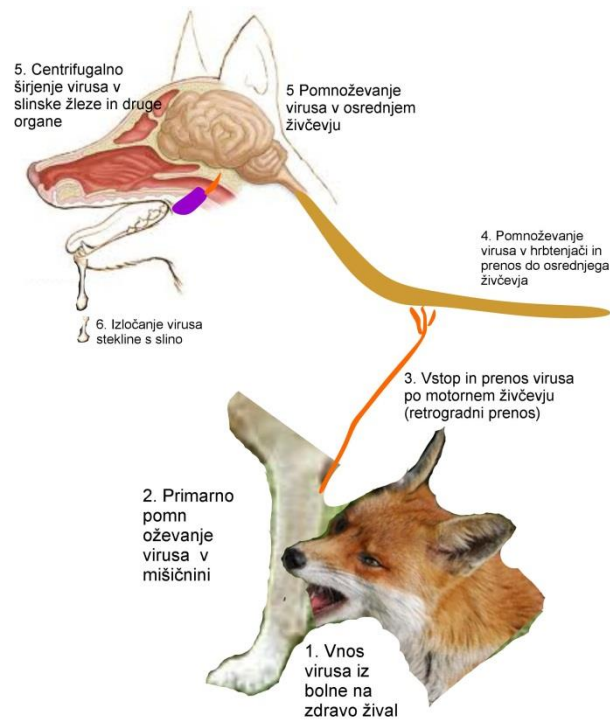
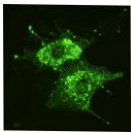
Virusi so znotraj celice obstojni podobno kot celica. Obstojnost zmanjšujejo številne fizikalne in kemične spremembe okolja, najpogostejši vplivi so toplota, sevanja, spremembe pH, svetloba in sušenje. Med kemičnimi sredstvi so to detergenti, topila, oksidanti, encimi in ioni soli. Rabdovirusi rib so izredno občutljivi na višje temperature, njegova patogenost se poveča v hladni vodi. Zaščitno na virus pa deluje prisotnost proteinov v mediju. Virus ostaja infektiven pri 4 °C do 1 meseca, zamrznjen pri –20 °C pa nekaj mesecev. Pri temperaturi nad 20 °C propade v 24 urah.

Patogeneza stekline

V kolikem času bo žival zbolela za steklino, je v veliki meri odvisno od mesta ugriza. Najpogostejši prenos bolezni je z ugrizom, ker se v slini bolne živali nahaja velika količina virusa. Vhodno mesto virusa so periferni živčni končiči, virus se veže na acetilholinske receptorje – nevrotransmitter acetilholina, do katerega lahko pride direktno ali pa se virus najprej namnoži v mišičnih celicah. Virus periferni živčni sistem invadira preko senzornih ali motornih končičev. Virus se veže tudi na druge receptorje, kot so fosfolipidi. Virus se razmnožuje v aksomih, prestopi sinapse in tako potuje znotraj aksomov do centralnega živčnega sistema. Najintenzivneje se namnoži v celicah nevroblastoma možganov, poškoduje korteks možganov. Posledica je nemir, depresija, koma in smrt obolelega. Iz možganske skorje virusni genom potuje centrifugalno iz centralnega živčnega sistema po perifernem živčevju do različnih organov: do pankreasa in slinske žleze, oči, kože. V celicah živčnega sistema se virusni partikli izgrajujejo na intracitoplazmatski membrani, medtem ko se v celicah slinske žleze na površini lumna mukoznih celic v veliki količini izločajo s slino. Patohistološko so ugotovljene le manjše spremembe z rahlimi vnetnimi spremembami brez velikih citopatoloških poškodb.

Proteini virusa stekline so zelo imunogeni. Po okužbi je prisoten intenziven humoralni in celični imunski odgovor. Imunska zaščita nastopa in je učinkovita le dokler virus ne vstopi v živčni sistem.

Poznano je, da je patogenost virusa vezana na strukturo proteina G. S študijami patogeneze je dokazano, da se virus stekline z mutacijami na antigenskem mestu 333 ni zmožen širiti iz celice v celico v kulturi nevroblastoma celic. Ciklus replikacije patogenih sevov je do 8-krat hitrejši kot pri nepatogenih sevih. Fuzija celic in tvorba sincicijev je pomemben faktor v patogenezi, nevirulentni sevi ne tvorijo sincicijev v celicah nevroblastoma. Dokazali so, da se virus stekline v trigeminalnih ganglijah nahaja že po 18 urah po aplikaciji, kar dokazuje, da se virus lahko veže na živčne končiče že takoj, brez predhodne namnožitve v mišičnih celicah.



Slika 80: Patogeneza virusa stekline.

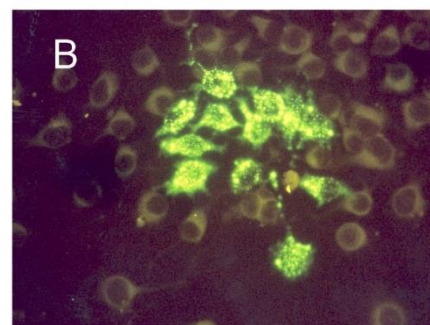
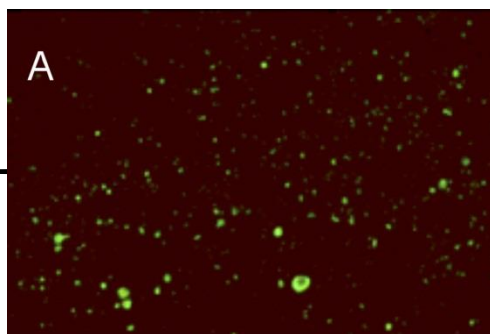
Diagnostika stekline:

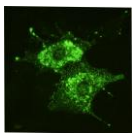
Na osnovi klinične slike se na bolezen lahko le posumi, ne more pa se postaviti dokončne diagnoze. Končno diagnozo lahko postavimo le na osnovi laboratorijskih analiz. Problem postavitve diagnoze je predvsem v primeru ugriza človeka, saj se je treba odločiti za pougrizni tretma, če je prišlo do kontakta s steklo živaljo. Kot preiskovani material se uporablja vzorec možganov, lahko tudi kornealni odtisek, biopsat kože ali slina.

Dokaz virusnega antigena:

Direktni imunofluorescenčni test (DIF)

Princip tehnike testa DIF: Pripravimo odtisek preiskovanega tkiva (Amonov rog, možganska baza) na predmetnem stekelcu, ga fiksiramo, dodamo konjugat, ki vsebuje protitelesa proti virusu stekline, inkubiramo 1 uro pri 37 °C, da pride do vezave antigen – protitelo, spiramo, da odstranimo nevezan konjugat, ki vsebuje označena protitelesa proti nukleoproteinu virusa stekline. Preparat preiščemo pod fluorescentnim mikroskopom. Rezultat je pozitiven, če se na virusne partikle preiskovanega materiala specifično veže konjugat. Prednost te metode je v specifičnosti. Za preiskavo je uporaben tudi nekoliko starejši vzorec – virus je lahko že inaktiviran.



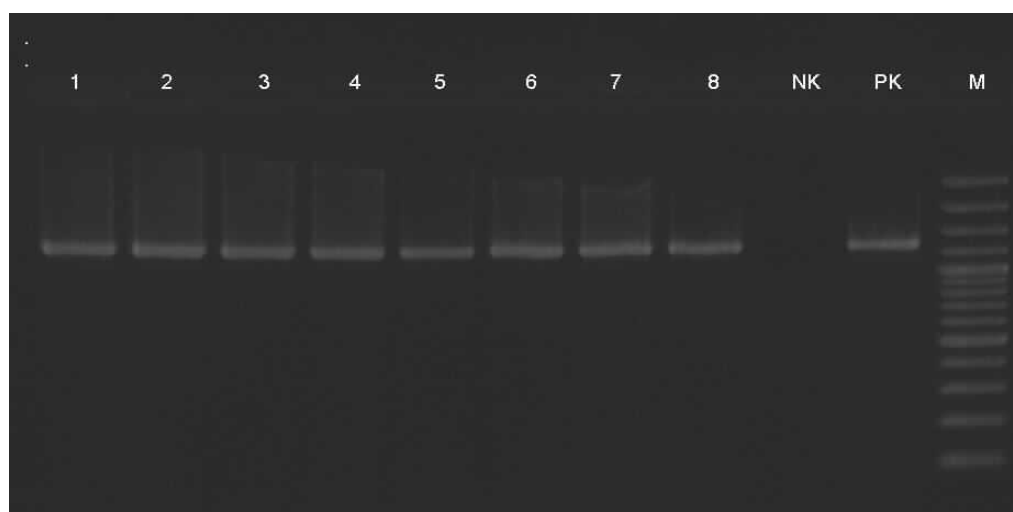


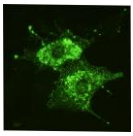
Slika 81: Pozitiven rezultat direktnega imunofluorescenčnega testa. Slika A: odtisek možganskega tkiva, slika B: virus stekline, pomnožen na celični kulturi mišjih celic nevroblastoma. Mesta, na katera se veže specifičen konjugat proti virusu stekline, so obarvana zeleno.

Izolacija virusa na celični kulturi: Pripravimo suspenzijo preiskovanega materiala (vzorec možganskega tkiva), mu dodamo visoke doze antibiotika in ga inokuliramo na sloj celic (mišje celice nevroblastoma). Po 30-minutni adsorpciji inokulum odstranimo in dodamo gojišče za celično kulturo. Po od 24 do 48 urni inkubaciji celični sloj fiksiramo in s testom IF celice preiščemo na prisotnost virusnih partiklov, ki jih najdemo v citoplazmi celic.

Biološki poskus na miškah: Vzorec v količini 0,5 ml inokuliramo 24 ur starim miškam. Zaradi izravnavne pritiska je treba izbrati mlade miši, ki imajo še mehke lobanjske kosti. Miši gojimo in jih dnevno opazujemo na morebiten pojav kliničnih znakov in pogin. V primeru pogina ugotavljamo prisotnost virusa stekline v tkivu možganov miši v poskusu. Sicer pa miši gojimo do 28 dne.

Metoda RT-PCT se je izkazala za zelo občutljivo in zanesljivo tehniko tudi v diagnostiki stekline. V primerjavi s testom izolacije virusa na celični kulturi je s tem testom mogoče potrditi prisotnost virusa v že razpadajočem vzorcu. To je pomembno zlasti pri diagnostiki stekline pri poginjenih, divjih živalih, ker kadaver v naravi zelo hitro razpada. Metoda je tudi primerna za preiskavo slin, kar s testom IF brez predhodne pomnožitve virusa na celični kulturi ne moremo opraviti. Zaradi majhne stopnje divergence gena za protein N v diagnostične namene običajno pomnožujemo mesto v genomu, ki kodira protein N. Iz preiskovanega vzorca je potrebno najprej izolirati RNA. Pri tem se uporabljajo membrane s slikatnimi geli, ki selektivno vežejo RNA v vzorcu. Ker imajo rabdovirusi RNA genom je potrebno virusni genom prepisati v komplementarno molekulo DNA. V enostopenjskem postopku v reakcijsko mešanico dodamo tako encim reverzno transkriptazo, kot polimerazo. V reakcijsko mešanico dodamo še izbrane začetne oligonukleotide ustrezne pubre in mešanice dNTP-jev. Pomnoževanje določenega odseka s poznano dolžino poteče v termopomnoževalniku. PCR produkte označimo z DNA označevalcem in prenesemo na agarozni gel, enako tudi pozitivni in negativni kontrolni vzorec in marker. V električnem polju molekule DNA potujejo glede na velikost z različno hitrostjo. Glede na razporeditev molekul v markerju in v primerjavi s pozitivnim in negativnim vzorcem nato določimo dolžino pomnoženega produkta in s tem tudi rezultat preiskave.





Slika 82: Prikaz velikosti produktov RT-PCR; pomnoževanje 1313 bp regije, ki kodira nukleoprotein. (z dovoljenjem dr. Danijele Rihtarič). Legenda: 1-8 = oznake vzorcev, pozitiven rezultat, NK = negativna kontrola, PK = pozitivna kontrola, M = marker

Serologija stekline:

Pod tem terminom razumemo metode dokazovanja specifičnih protiteles proti virusu stekline. Ker je steklina smrtna bolezen, serologija v diagnostiki nima večje vrednosti razen v kontroli uspešnosti vakcinacije. Pse, ki so prišli v stik s steklo živaljo, je treba preiskati na prisotnost cepnih protiteles. Predpisi Evropske unije zahtevajo, da je na psih, mačkah in belih dihurjih preden vstopijo iz tretjih držav v Evropsko unijo opravljen serološki test, s katerim določamo nivo cepnih protiteles proti steklini v serumu živali. V ta namen uporabljamo test FAVN (angl. *fluorescent antibody virus neutralisation*). Test temelji na principu seronevtralizacijskega testa. Glede na to, da virus ne povzroča citopatskega efekta na celičnih kulturah, rast oziroma blokado rasti virusa dokazujemo z metodo direktne imunofluorescence. V primeru prisotnosti protiteles proti virusu stekline v serumu preiskovane živali le-ta zavrejo rast virusa na celični kulturi. Titer (količino) protiteles določimo v testu tako, da pripravimo zaporedna redčenja preiskovanega seruma in tem razredčinam dodamo še virus stekline. Po enourni inkubaciji dodamo tej mešanici še celično kulturo. Končni titer protiteles določimo na podlagi blokade rasti virusa. Po definiciji je končni titer tista razredčina seruma, ki še blokira rast virusa.

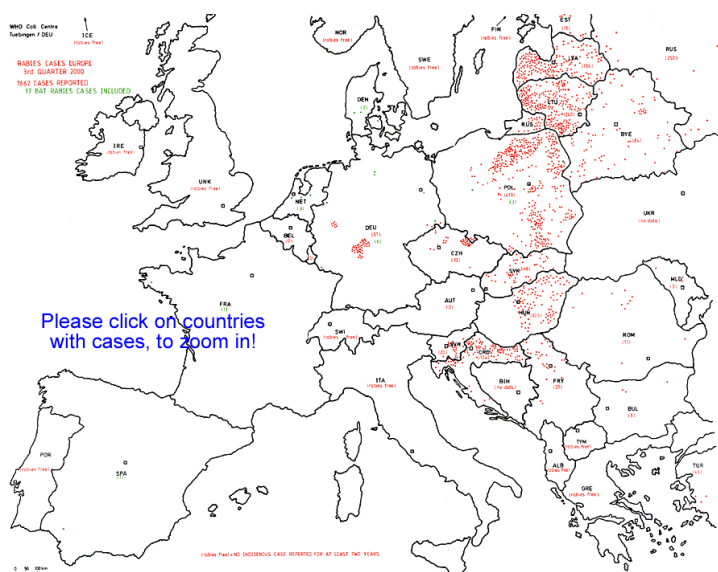
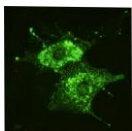
Razširjenost stekline:

Običajen prenos infekta je z ugrizom bolne živali ali s kontaktom preko slin, v kateri se nahaja, največ virusa. Opisan je tudi aerosolni prenos. Ta je pogost zlasti v jatah okuženih netopirjev.

Glede na razširjenost stekline govorimo o urbani in silvatični obliki stekline. Če je razširjena med domačimi živalmi, govorimo o urbanem tipu stekline, če se pojavlja v populaciji divjih živali, govorimo o silvatični obliki stekline. V zahodni in srednji Evropi je glavni prenašalec in rezervoar stekline lisca (*Vulpes vulpes*).

V Sloveniji se s silvatično obliko stekline srečujemo že vse od leta 1973 dalje, medtem ko smo urbano obliko zaradi vsakoletne vakcinacije psov zatrli. Stekline proste so naslednje evropske države: Velika Britanija, Francija, Švica, Italija, Španija, Portugalska, Finska, Švedska, posamezne primere stekline ugotavljajo še v Nemčiji, Avstriji, Belgiji, na Danskem in Nizozemskem. V fazi izkoreninjanja so Poljska, Češka, Madžarska, Slovenija.

V državah Azije, Latinske Amerike in Afrike je steklina močno razširjena tudi med domačimi živalmi. Poleg lisice se kot najvažnejši prenašalci in rezervoar stekline pojavljajo tudi dihurji, kojoti, rakuni, netopirji. V ZDA kot tudi v severni Evropi predstavlja velik problem netopirska oblika stekline. Prenašalci so insektivorni netopirji (*Eptesicus serotinus*), medtem ko so v Južni Ameriki problem vampirski netopirji (*Desmodus rotundus*). Leta 1996 je bil netopirski tip stekline odkrit tudi v Avstraliji, ki je vedno veljala za stekline prosta dežela.



Slika 83: Ugotovljeni primeri stekline v Evropi leta 2000. Države EU izvajajo peroralno vakcinacijo lisic proti steklini.

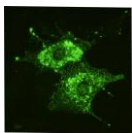
Preventiva stekline:

Vakcine: Za parenteralno uporabo vakcine na domačih živalih se smejo v Sloveniji uporabljati le inaktivirana cepiva. Cepiva pridobivajo tako, da virus namnožijo na celični kulturi, običajno na celični liniji BHK21 (hrčkove ledvice), nato pa virus inaktivirajo z betapropiolaktonom, ga prečistijo in dodajo adjuvanse, ki spodbudijo imunski odgovor.

Za peroralno vakcinacijo divjih živali (lisic) pa se uporabljajo živa, atenuirana cepiva. V Sloveniji je registrirano cepivo Fuchsoral, ki vsebuje živ virus SAD B19, in cepivo Lysvulpen, ki vsebuje virusni sev SAD Bern. Oba virusna seva originalno izhajata iz virusa stekline, ki je bil leta 1935 izoliran v ZDA (Street–Alabama–Dufferin, SAD) iz možganov poginjenega psa. S številnimi pasažami na celicah BHK je virus postal apatogen za domače živali. Vakcinalni virusni sev je imunogen tudi v primeru peroralne aplikacije. Osnovna lastnost vakcinalnega virusa je ta, da zaradi spremembe epitopov na proteinu G za acetilholinske receptorje nima nevrotropnih lastnosti. Nevrotropizem virusa je vezan na protein G, odnosno na ohranjanje arginina (ali lizina) na antigenskem mestu 333. V primeru delecije na tem mestu virus izgubi nevrotropne lastnosti, ker ne prepozna receptorja na nevronu. Številni vakcinalni sevi so mutirani na antigenskem mestu 333. Virus se namnoži v celicah sluznice ustne odprtine in povzroči imunski odgovor vakcinirane živali. Po navodilu organizacije WHO se za stekline prosta regija smatra območje v premeru 80 km, v katerem pri kontroli 8 lisic na 100 km letno v zaporedju dveh let ni bil ugotovljen primer stekline.

Steklina in njeno zatiranje v Sloveniji

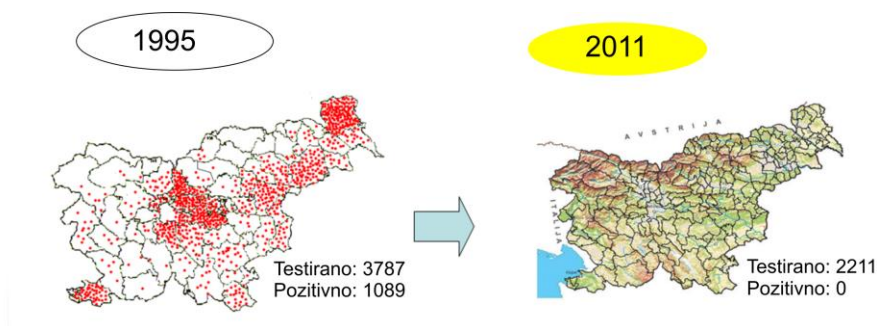
V Sloveniji smo prve stekle živali registrirali leta 1973, in sicer v Prekmurju. Bolezen se je širila proti jugozahodu. Za to epizootijo je značilno, da se je bolezen razširila do reke Mure, a je ni prešla (4.). Glavni val stekline je Slovenijo dosegel v letu 1979. Meje države je prešel v zgornjesavski dolini in na področju Koroške. V letu 1980 smo prve primere stekline ugotovili v okolici Ljubljane, v letu 1981 pa je val stekline že dosegel južne meje države. Tako imamo od leta 1980 praktično v vsej



Sloveniji prisotno steklino med divjimi živalmi, posamezne primere pa registriramo tudi med domačimi, necepljenimi živalmi.

Širjenje stekline med populacijo psov preprečujemo z vsakoletnim preventivnim cepljenjem psov starejših od 4 mesecev.

Glede na izkušnje iz zahodne Evrope smo se tudi v Sloveniji odločili za zatiranje stekline med divjimi živalmi z metodo cepljenja lisic. Z letali dvakrat letno izmetavamo vabe, ki vsebujejo živ atenuiran virus stekline. Žival, ki zaužije tako vabo, se imunizira. Na ta način preprečimo širjenje virusa iz bolne na zdravo nezaščiteno žival.



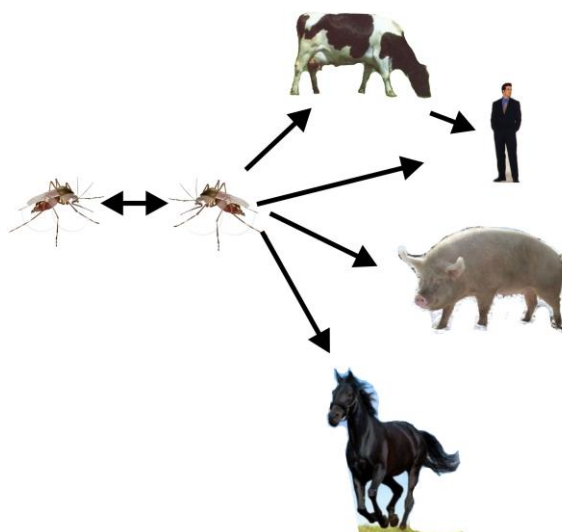
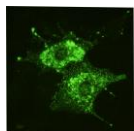
Slika 84: Prikaz števila ugotovljenih primerov stekline ob začetku izvajanje peroralne vakcinacije lisic in v letu 1995 in primerjalno v letu 2011.

Rod Vesiculovirus

Vrste: Vezikularni stomatitis (angl. *Vesicular stomatitis*), *New Jersey virus*, *Vesicular stomatitis Indiana virus* in *Vesicular stomatitis Alagoas virus*

Viruse so uvrstili v rod *Vesiculovirus*. Od ostalih rodov se razlikuje v antigenski zgradbi kot tudi v nukleotidnem zaporedju genoma. Med posameznimi geni se pojavlja značilna 3'-AUACUUUUUUU-5' regija, ki je skupna vsem virusom, uvrščenim v rod *Vesiculovirus*. Bolezen je klinično zelo podobna slinavki in parkljevki, razširjena pa je v Ameriki. Povzroča velike ekonomske izgube. Virus vstopi v organizem preko sluznic ali manjših abrazij kože, bolezen prenašajo insekti (*Lutzomyia sp.*) in tudi muhe (*Musca domestica*). Nastanejo vezikule podobne kot pri slinavki in parkljevki. Poznane so tri vrste virusa, ki povzročajo obolenje z enakimi simptomi: Indiana in New Jersey prisotna v centralni in južni Ameriki in Alagoas virus prisoten v južni Afriki. Znotraj tipa Indiana so še trije podtipi. Za vezikularnim stomatitisom oboleva govedo, prašiči in kopitarji in človek. Vezikularni stomatitis je zoonoza, oboleva tudi človek.

Bolezen lahko dokažemo z različnimi virološkimi metodami, kot so izolacija virusa na celični kulturi in njegova determinacija z imunoperoksidaznim ali imunofluorescenčnim testom ali metodo RT-PCR.



Slika 85: Prikaz prenosa virusa vezikularnega stomatitisa iz ene vrste na drugo

Bolezen je razširjena zlasti v tropskem pasu amerike (Kolumbija, Ekvador, Mehika, Venezuela) pa tudi v ZDA, Kanadi, Braziliji in Argentini. Ker so klinični znaki podobni slinavki in parkljevki, posumimo na vezikularni stomatitis zlasti takrat, ko obolevajo tudi konji. Diagnostika temelji na tehniki metode RT-PCR in izolaciji virusa na celični kulturi. Prisotnost protiteles proti temu virusu nam potrdi, da imamo opravka z okuženo živaljo. Bolezen v Evropi ni razširjena. Če se uvozijo parkljarji in konji iz Amerike, jih moramo preveriti na prisotnost protiteles proti virusom vezikularnega stomatitisa. V področjih, kjer je bolezen prisotna, je živali mogoče zaščititi s cepljenjem.

Rod Ephemerovirus

Vrsta: Virus goveje groznice (angl. *Bovine ephemeral fever virus*)

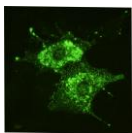
Virus goveje groznice prenašajo insekti. Razširjen je v Afriki, Avstraliji in Aziji. Okužba je vezana na prenos z insekti. Dovzetno je govedo in bivoli. Bolezen se kaže v močno povišani telesni temperaturi, ki ji sledijo apatija, neješčnost ter padec mlečnosti in prirasta. Obolevnost znotraj črede je tudi do 100-odstotna vendar je smrtnost nizka, običajno pogine 1 % obolelih živali. Po okužbi nastopi dolgotrajna protitelesna zaščita, dovzetne so mlade živali.

Rabdovirusi prisotni pri ribah

Vrsta: Virus hemoragične septikemije postrvi (VHS)

Virusno hemoragično septikemijo postrvi povzroča virus VHS. V starejši literaturi je imenovan tudi Egtved virus po danskem kraju Egtvedu. Uvrščamo ga v rod *Novirhabdovirus*. Virusi tega rodu se od virusov ostalih rodov razlikujejo po genu X, ki ni prisoten pri drugih rodovih. Na osnovi filogenetske analize gena za protein L in G so izolate razvrstili v 4 genetske skupine.

Občutljivost virusa: inaktivacija virusa nastopi v 5 minutah v 3-odstotnem formalinu ali 2-odstotnem NaOH, klor, 500 ppm, pri temperaturi vode 10 °C je obstojen 14 dni, pri 20 °C pa 10 ur.



Patogeneza

Ena izmed najbolj dojemljivih vrst rib za virus VHS je šarenka (*Salmo Gairdneri*), nekoliko manj je občutljiva potočnica (*Salmo trutta*), nekatere vrste rib pa so na virus odpornejše. Pomemben vpliv na patogenost ima tudi temperatura vode; klinični znaki bolezni se pojavljajo zlasti pri temperaturi med 5 in 10 °C. Pri šarenki se bolezen kaže s karakterističnimi hemoragijami, ki jih najdemo po vseh notranjih organih, plavutih in miškulaturi. Koža je potemnjena, prisoten je exoftalmus in nenormalno plavanje, in sicer plavanje v krogu.

Histopatološko ugotovimo degeneracijo hematopoetskih organov, ledvic in vranic, kasneje pa nekroze, majhne hemoragije v miščinini, levkopenija, nekroza pankreasa, jeter in ledvic.

Minimalna inkubacijska doba je od 4 do 10 dni pri 10 °C, sicer pa inkubacija lahko traja do enega leta. Smrtnost močno upade, ko temperatura vode doseže 15 °C. Na infekcijo VHS so najbolj občutljive enoletnice, manj pa odrasle ribe. Število in jakost hemoragij je močno povezana z jakostjo kliničnih znakov in smrtnostjo.

Znaki bolezni so bili opisana že leta 1938 (Nemčija). Opisana je bila kužna bolezen oteklih ledvic in degeneriranih jeter. Podobne opise najdemo tudi v Franciji, kjer so govorili o hepatorenalnem sindromu pri postrvih. Virus je bil prvič izoliran leta 1962 na Danskem v kraju Egtved, bolezen so poimenovali VHS, povzročitelj virus Egtved. Najprej je bila bolezen poznana samo v Evropi, vendar se je z intenzivnim transportom tako mrtvih rib kot iker razširila tudi v Ameriko.

VHS je razširjena po vseh državah EU razen v Veliki Britaniji in na Danskem. Običajno se bolezen klinično pojavi, ko temperatura vode pade pod 15 °C. Tako se epidemije pojavijo navadno konec jeseni in pozimi. Bolezen se pojavi pri vseh starostnih kategorijah rib, vendar generalno s starostjo občutljivost na bolezen upada. Smrtnost je ob izbruhu bolezni do 80-odstotna in celo več. Visok odstotek poginov je prisoten zlasti ob vnosu z VHS pozitivnih rib v neokuženo jato. Infekt se prenaša s kontaktom (okužene in inaparentno okužene ribe) in z ovarialno tekočino.

Klinična slika: visok dnevni pogin, moribundne leno plavajo, temna pigmentacija, anemija škrg s hemoragijami, exoftalmus. Patoanatomsko najdemo hemoragije po visceralnih organih, plavutih, miškulaturi, s hiperemijo jeter in ledvic.

Laboratorijska diagnostika: izolacija virusa na celičnih kulturah EPC (*Epitelioma papulosum cyprini*), virus ima citopatogene lastnosti. Uporabna je metoda RT-PCR, s katero pomnožujemo ohranjen gen za protein L.

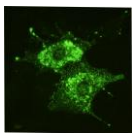
Virus je prisoten tudi v Sloveniji. Slovenija je bila prosta te bolezni vse do leta 2008.

Vrsta: Virus kužne hematopoetske nekroze postrvi (angl. *Infection haematopoetic necrosis virus*)

Virus IHN je uvrščen v rod *Novirhabdovirus*. Razširjen je tudi v Sloveniji. Zlasti v zimskih mesecih povzroča velike ekonomske škode v vzreji šarenke. Smrtnost rib je tudi do 50-odstotna. Diagnostika temelji na izolaciji in identifikaciji virusa na celični kulturi.

S sekvenčno analizo variabilne regije znotraj glikoproteinskega gena G (regija mig-G) so virusne izolate razdelili na 3 glavne genske skupine, ki jih označujemo U (angl. *upper* – zgornji), M (angl. *middle* – srednji) in L (angl. *lower* – spodnji) in sovpadajo z geografsko distribucijo izolatov virusa IHN v Severni Ameriki. Virusne izolate, uvrščene v gensko skupino M, so v večini dokazali pri šarenki tudi v Evropi.

Virus IHN je zelo raznolik. Posamezne seve je med seboj mogoče razlikovati zaradi razlik v zgradbi strukturnih proteinov. Uvrščanje različnih izolatov pa temelji na osnovi genetskih razlik v genu za

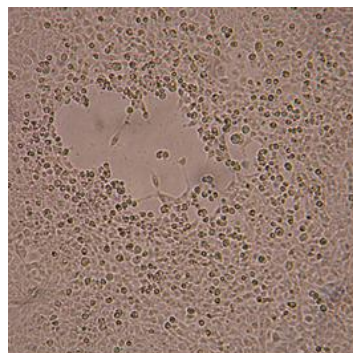
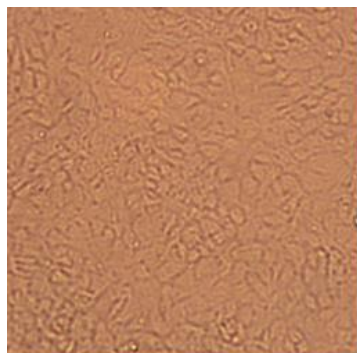


timidinkinazo in gena za glikoprotein G.

Za virusom IHN obolevajo postrvske vrste rib, zlasti mladice šarenke in pacifiškega lososa. Bolezen se je prvič pojavila prav pri lososu v Ameriki in se je od tam razširila v Evropo. Od leta 1987, ko je bila v Evropi prvič ugotovljena, se je po Evropi naglo razširila. Virus je zelo razširjen tudi v Sloveniji. Ob prisotnosti virusa IHN v ribogojnicah za vzrejo šarenke smo virus potrdili tudi pri potočni postrvi v odprtih vodah.

Virus IHN se pojavlja pri nižjih temperaturah in pri mlajših ribah. Obolevnost in smrtnost rib pri tej bolezni je odvisna od starosti rib, temperature vode in od virulentnosti virusa. Pri temperaturi vode med 10 in 12 °C. Ko zbolijo zarod z mešičkom, je smrtnost lahko tudi med 80 in 100-odstotna. S starostjo obolelih rib pa smrtnost pada, tako da je pri enoletnicah le okrog 10-odstotna. Preživele ribe v visokem odstotku ostajajo dosmrtni nosilci virusa. Klinično se virus IHN kaže v spremenjenem vedenjskem vzorcu; ribe se oddaljijo od jate, so apatične, potemnele, pojavi se tudi eno- ali obojestranski eksoftalmus. Pri sekciji ugotovimo petehialne krvavitve na potrebušnici in mezenteriju, ribjem mehurju, meningah in po perikardu. Degenerativne spremembe so opazne zlasti na ledvicah, trebušni slinavki in prebavnem traktu.

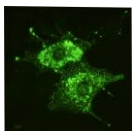
Diagnostika temelji na dokazu virusa z metodo izolacije virusa na celični kulturi ali dokazom virusne nukleinske kisline z metodo RT-PCR. V primeru testiranja plemenskih jat predstavlja preferenčni vzorec ovarialna tekočina ob drstitvi. Manj pogosto vzorčimo semensko tekočino, ker so vzorci spermalne tekočine v postopku izolacije virusa na celični kulturi manj ustrezni in so v njih virus IHN redkeje dokazali. V fazi izbruha bolezni, ob prisotnosti kliničnih znakov, odvzamemo za laboratorijsko preiskavo notranje organe bolne ribe (ledvice, vranico, jetra) in možgane. Laboratorijska diagnostika prisotnosti okužbe z virusom IHNV med odsotnostjo bolezni (v obdobju, ko je temperatura vode nad 15 °C) je pogosto neuspešna. Bolezen je v Sloveniji prisotna. Okužba se prenaša posredno in s kontaktom pa tudi vertikalno preko iker.



Slika 86: Celična kultura EPC (*Epitheloma papulosum cyprini*) in citopatski efekt (CPE) kot posledica rasti virusa IHN (z dovoljenjem dr. Aleksandre Grilc, doktorat).

Vrsta: Virus pomladanske viremije krapov (angl. *Spring viraemia of carp virus, SVCV*)

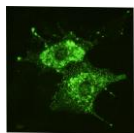
Virus pomladanske viremije krapov je zelo razširjen med krapovci v Evropi. Klinično se bolezen pojavi v ribogojnicah, ko se temperatura vode dvigne nad 18 °C. Pred večjimi ekonomskimi izgubami se lahko ubranimo z uporabo cepiv proti virusu SVCV. V diagnostiki uporabljamo metodo



RT-PCR in test izolacije virusa na celični kulturi, izolat pa determiniramo z imunoperoksidaznim testom.

Dodatni študijski viri:

- Cliquet F, Aubert M. Elimination of terrestrial rabies in Western European countries. *Dev Biol (Basel)* 2004; 119: 185–204.
- Grilc Fajfar A. Uporabnost nekaterih viroloških metod v diagnostiki infektivne hematopoetske nekroze postrvi (IHN) ter molekularna opredelitev slovenskih izolatov virusa IHN: doktorska disertacija. Ljubljana: UL Veterinarska fakulteta, 2011: 186 str.
- Hostnik P, Toplak I, Barlic-Maganja D, Grom J, Bidovec A. Control of rabies in Slovenia. *J Wildl Dis* 2006; 42(2): 459–65
- Rihtarič D, Hostnik P, Grom J, Toplak I. Molecular epidemiology of the rabies virus in Slovenia 1994–2010. *Vet Microbiol.* 2011; 152(1/2): 181–6.
-



VIRUSI Z NEGATIVNO ORIENTIRANIM SEGMENTIRANIM RNA GENOMOM

13

ORTHOMYXOVIRIDAE

Družino Orthomyxoviridae sestavlja pet rodov, in sicer rod *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C* in rod *Thogotovirus* in *Isavirus*. Za njih so značilni pogosti preskoki iz ene živalske vrste v drugo. Virusni genom predstavljajo segmenti molekule RNA. Število segmentov virusnega genoma se med seboj razlikuje, rodova *Influenzavirus A* in *B* imata po 8 segmentov, *Influenzavirus C* ima 7 in *Thogotovirus* po 6 segmentov. Vrste virusov iz rodu influenza A so primarno patogene za živali in človeka, vrste iz rodu B in C pa primarno krožijo znotraj populacije ljudi. Rezervoar mnogih vrst iz rodu A so ptice, kjer se virus pogosto razmnožuje tudi v epitelnih celicah prebavnega trakta. Tako da predstavlja feces ptic pogosto viru okužbe za sesalce.

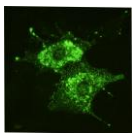
Klasifikacija in osnovne lastnosti ortomiksovirusov

Virusi, uvrščeni v družino *Orthomyxoviridae*, imajo lipoproteinski plašč, ki ga pridobijo pri izstopanju iz gostiteljske celice. Genom predstavlja segmentirana negativno orientirana enovijačna molekula RNA (komplementarna mRNA). Virusna RNA predstavlja matrice za nastanek virusnih mRNA in je tudi matrica za sintezo antigenoma (cRNA). V to družino spadajo virusi, ki povzročajo različne tipe influence (gripe) pri različnih vrstah živali in ljudi. Virusi, uvrščeni v rod *Influenzavirus A*, okužujejo različne sesalce in ptice kot tudi človeka. V sistemu klasifikacije izolatov imata pomembno vlogo proteina hemaglutinin (H) in nevrominidaza (N). Dokončna klasifikacija temelji na nivoju razlik genov za omenjena proteina.

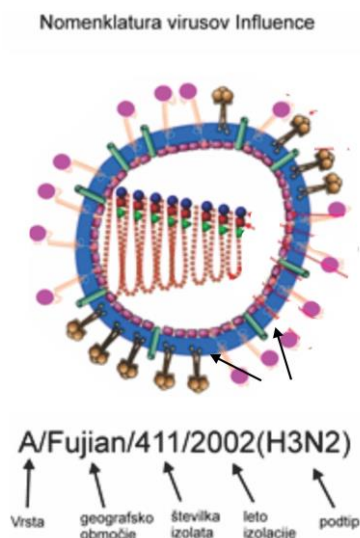
Glede na to, da virusi, uvrščeni v rod *Influenzavirus A*, vsebujejo gene H kot tudi N, je pri določanju virulentnosti posameznega izolata pomembna kombinacija prisotnosti posameznih genov. Pripadnike *Influenza A* so izolirali iz različnih vrst ptic, sesalcev in človeka. Klasifikacijo izolatov znotraj te vrste opravljajo na osnovi razlik v hemaglutinu (H) in nevrominidazi (N). Do zdaj je poznanih 16 tipov H in 9 tipov N. Označujemo jih s črko in številko (H1–H16 in N1–N9). Poznano je, da so patogeni izolati, ki vsebujejo kombinacijo H7N7, H3N8, prisotni pri konjih, virusi s kombinacijami H1N1 in H3N2 so močno patogeni za prašiče, tipi H1N1, H2N2, H3N2 in H5N1 so poznano patogeni tudi za človeka, za perutnino pa H5N2, H7N1 in H5N1.

Virusi, uvrščeni v rod *Influenzavirus B*, so patogeni le za človeka in so antigensko enotni, virusi, uvrščeni v rod *Influenzavirus C*, so patogeni za človeka in prašiče, razvojni krog virusov iz rodu *Thogovirus* in *Isavirus* pa je vezan na klope in niso patogeni za domače živali.

ROD	Vrsta	Gostitelji
<i>INFLUENZAVIRUS A</i>	<i>Influenza A virus</i>	ptice, sesalci, človek
<i>INFLUENZAVIRUS B</i>	<i>Influenza B virus</i>	človek
<i>INFLUENZAVIRUS C</i>	<i>Influenza C virus</i>	človek, prašiči
<i>ISAVIRUS</i>	<i>Infection salmon anemiavirus</i>	salmonidi
<i>THOGOTOVIRUS</i>	<i>Thogovirus</i>	



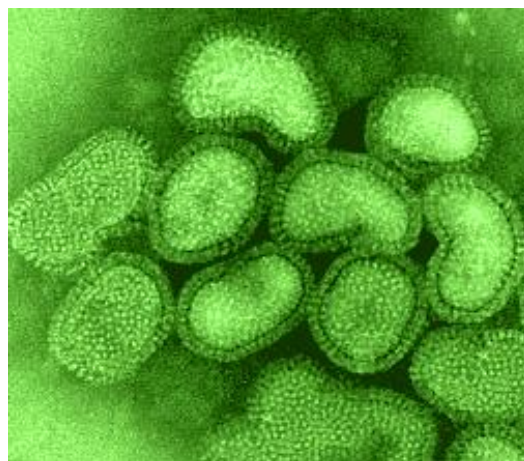
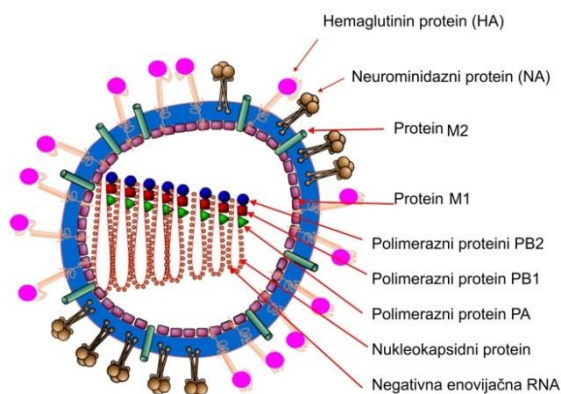
Preglednica 11: Posamezni rodovi znotraj družine *Orthomyxoviridae*.

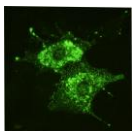


Slika 87: Označevanje posameznih izolatov virusa influence

Virusi, uvrščeni v družino *Orthomyxoviridae*, so pleomorfne oblike, velikosti od 80 do 120 nm. Na površini virusa se nahaja 500 virusnih izrastkov (transmembrani proteini), velikosti 10–14 nm. Te predstavljata protein hemaglutinin (H), ki se nahaja v obliki trimerne molekule, in nevrominidazni protein (N), ki je v obliki tetramerne formacije. Virus je sestavljen iz 70 % proteinov, 20 % lipidov 5–8 % sladkorjev in 1 % RNA. Virus vsebuje lipoproteinski plašč. Virusi, uvrščeni v rod *Influenzavirus C*, imajo peplomere samo ene vrste. Posamezne rodove je mogoče razlikovati na osnovi antigenskih razlik virusa, zlasti nukleokapsidnega (NP) in matrix (M) proteina. Enovijačna segmentirana negativno orientirana molekula RNA ima dve funkciji; nastopa kot matrica za sintezo mRNA in kot matrica za sintezo antigenomske verige. Virus sestavljajo 80 % proteini, 20 % lipidi, sladkorji do 8%, RNA pa predstavlja 1% strukture virusa. Pod elektronskim mikroskopom izolate influence A in B ni mogoče ločevati, medtem ko imajo izolati skupine C morfološko različne peplomere – v obliki gobe.

Virusi influence so občutljivi na visoke temperature – temperatura 56 °C ga inaktivira v 30 minutah, Občutljivi so tudi na nizek pH (< pH 3) in lipidna topila. Posamezni rodovi se med seboj razlikujejo glede na razlike v nukleoproteinu in tudi med njimi ni navzkrižnih seroloških reakcij.





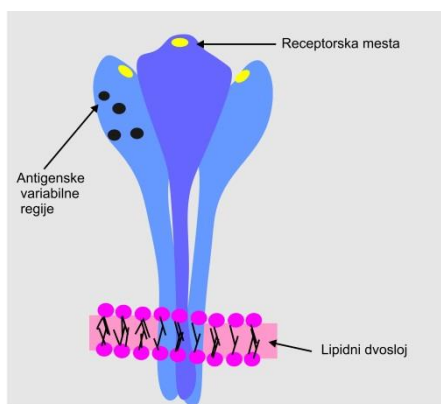
Slika 88: Shematski prikaz ortomiksovirusov.

Slika 88: *Virus influenza*, povzeto po <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/flu colo3.gif>.

Virusni proteini:

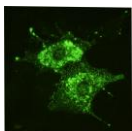
Polimerazni protein kodirajo trije segmenti virusne RNA, imenovani PB1, PB2 in PA. Proteini P se sintetizirajo v citoplazmi celice, nato se transportirajo v jedro.

Hemagglutinin (HA); ta protein je dobil to ime zaradi afinitet do vezave na površino eritrocitov. Hemagglutinin je glikoliziran protein, ki sestoji iz 562 do 566 aminokislin in se nahaja v virusni ovojnici. Njegova vloga je v vezavi virusnih partiklov na površino celice. Vključen je v proces penetracije virusa v notranjost celice, je močno imunogen. Sproži tvorbo protiteles proti proteinu HA, ta pa inaktivirajo virus. Navzkrižna reakcija med posameznimi podtipi je minimalna. Protein kodira četrti segment virusne RNA in se sintezira na endoplazmatskem retikulumu celice. Po sintezi se protein modificira, nanj se vežejo molekule oligosaharidov. Na osnovi razlik v proteinu HA je poznanih 15 različnih subtipov virusa influenza A. Hemagglutinin aktivirajo encimi, kot so tripsin, ali peptidaze z razcepitvijo v dve molekuli H1 in H2. Nizek pH povzroči ireverzibilne konformacijske spremembe proteina.



Slika 90: Shema receptorskih mest na HA proteinu. HA protein je trimer z receptorskimi mesti za sialično kislino z antigenскими mesti za nevtralizirajoča protitelesa

Nevrominidazni (NA) protein je sestavni del virusnega plašča. Njegova vloga je v odstranjevanju sialične kisline iz glikoproteinskih receptorjev na citoplazmatski membrani celice, kar omogoča izstopanje novonastalih virusnih delcev. Druga pomembna vloga proteina NA je omogočanje prehoda virusa influence skozi sloj sluzi na sluznici respiratornega trakta in na ta način omogoča virusu dostop do ciljnih celic. Protein NA štrli iz površine virusa v gobasti obliki. Inhibitorji nevrominidaze preprečujejo širjenje virusa iz celice v celico. Gre za transmembrani protein. Nevrominidaza je derivat nevraminske kisline, ki ima sialolično encimsko aktivnost. Protein NA predstavlja važen antigen virusa, na osnovi česar se izvaja klasifikacija izolatov. Kodira ga 6. segment genoma.



Matriks protein (protein M) poznani sta dve molekuli matriks proteina, imenovani M1 in M2 protein. Oba proteina kodira 7. segment genoma. Protein M1 je vezan na protein HA in NA, M2 je integralni ovojnični protein in je vezan tudi na nukleokapsido. Protein M1 je zelo enoten znotraj različnih izolatov. Vključen je v replikacijo virusa, omogoča namreč izstopanje novonastalih nukleokapsid iz jedra celice. Protein M povezuje intracitoplazmatske repe proteina H in N. Sodeluje pri enkapsidaciji virusne nukleokapside v plašč viriona. Protein M2 ima vlogo ionskega kanala, ki omogoča vstop ionov v virion med izstopanjem nukleokapside iz ovojnice. Ionski kanali so visoko specifični za ione H^+ , ki so nujni v procesu razmnoževanja virusa.

Nukleoprotein (NP) obdaja virusno RNA, je fosforiliran, kodira ga 5. segment virusne RNA. Po sintezi v citoplazmi se transportira v jedro celice. Njegova funkcija je v regulaciji pomnoževanja virusne RNA. Hkrati je zelo imunogen protein in močan aktivator limfocitov T. Izolati s 560 aminokislinami na NP proteinu so uvrščeni v rod *Influenza A*, virusi iz sode *Influenza virus C* pa imajo NP protein iz 565 aminokislin.

Polimerazni proteini: PB1= od RNA odvisna polimeraza RNA, PB2 = virusna endonukleaza in PA = podenota polimeraznega kompleksa

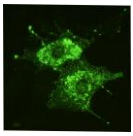
Nestrukturni proteini; te proteine lahko najdemo le v okuženi celici. NS1 je fosfoprotein in NS2 se nahaja v jedru inficirane celice, njegova funkcija pa je v sproščanju novonastale nukleokapside iz jedra inficirane celice. NS1 ima zelo ohranjene regije. Nestrukturna proteina se ne nahajata v virusu, ampak v inficirani celici. Protein NS1 ima pomembno vlogo pri blokiranju celičnega odgovora na tvorbo interferona.

Genom ortomiksovirusov

Genom je zgrajen iz od 6 do 8 segmentov linearnih negativno orientiranih molekul RNA. Virusi, uvrščeni v rod *Influenzavirus C*, imajo genom s 7 segmenti, virusi uvrščeni v rod *Thogotovirus* pa 6 segmentov. Dolžina posameznega segmenta je od 700 do 2350 nukleotidov. Izolate lahko v posamezne rodove razvrščamo tudi na podlagi razlik v zaporedju začetnih in končnih nukleotidov. Na primer virusne RNA pri virusih rodu *Influenzavirus A* imajo ohranjeno začetno in končno zaporedje. Prvi trije segmenti kodirajo polimerazne proteine. Prvi segment genoma kodira protein PB2, segment 2 kodira protein PB1, tretji segment pa kodira protein PA. Ti trije proteini tvorijo kompleks odgovoren za pomnoževanje virusne RNA. Segment 4 kodira protein HA, ki se sintetizira na ribosomih, vezanih na membrano ER, nato se vrine v lumen endoplazmatskega retikuluma. Segment 5 kodira protein NP, ki predstavlja glavni strukturni protein, katerega glavna vloga je vezava polimeraze na virusne segmente RNA. P protein je specifičen za posamezen rod in se razlikuje med rodovi A, B in C.

Segment 6 kodira polipeptid NA. Nevrominidaza je protein ovojnice. Njegova vloga je blokada sialične kisline iz glikoproteinskih receptorjev na citoplazmatski membrani celice, kar omogoča izstop virusa iz celice. Ta protein je tudi pomemben antigen za ugotavljanje razlik med posameznimi izolati virusa influence.

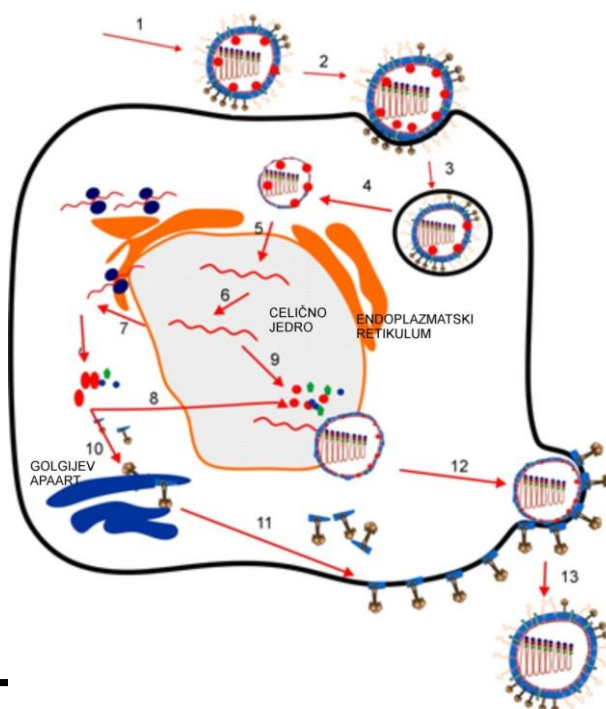
Segment 7 kodira dva proteina, in sicer matriks protein M1 in M2. Protein M1 se nahaja v ovojnici virusa in ga je količinsko največ med proteini, tudi protein M2 je sestavni del ovojnice. Protein M1 je znotraj posameznega rodu izredno ohranjen in je vključen v proces izstopanja nukleokapside iz jedra celice. Protein M2 ima vlogo ionskih kanalov, ki omogočajo vstop ionov in s tem regulacijo pH v Golgijevem aparatu celice. Osmi segment kodira tudi nestrukturni protein NS1 in strukturni protein NS2. Za NS2 se je domnevalo, da se pojavi le v fazi replikacije virusa, dejansko pa je vezan na

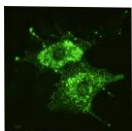


protein M1. Protein NS2 ima sekvenco NES (angl. *nuclear export signal*), ki ima važno vlogo v procesu izstopanja nukleokapside iz jedra celice.

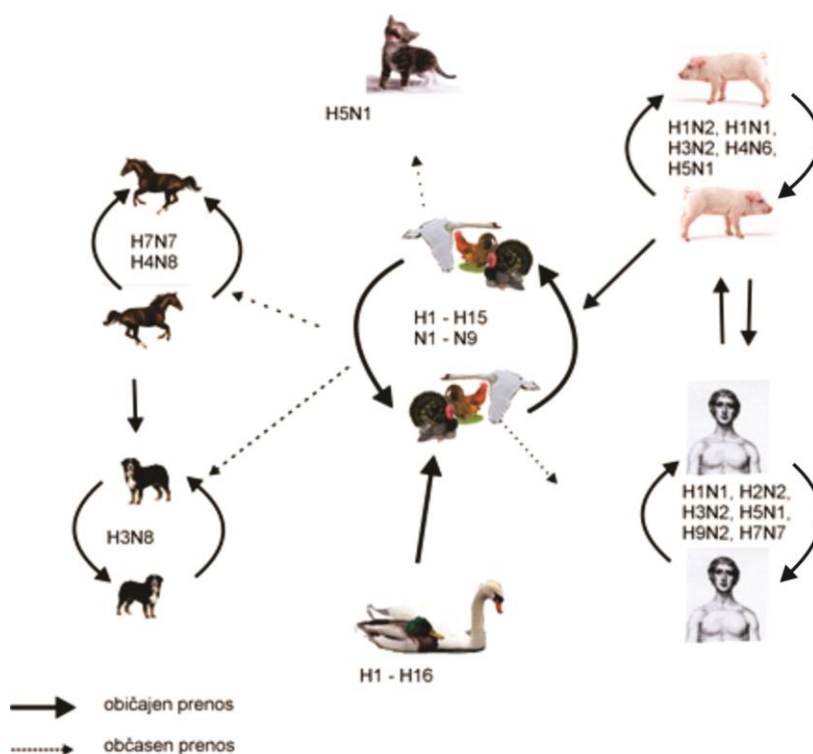
Pomnoževanje ortomiksovirusov

Virus influence se veže na molekule sialične kisline (N-acetyl neuraminic acid) in vstopi v celico po principu endocitoze. V endosomu znižanje vrednosti pH (iz pH 7 na pH 5) povzroči konfiguracyjsko spremembo proteina HA, sledi razcep na molekuli HA1 in HA2. Molekula HA2 se spoji z membrano endosoma, kar omogoča izstop nukleokapside v celično citoplazmo, ki se transportira v perinuklearno področje celice, od koder vstopi v jedro celice. Vstop v jedro celice omogoča protein M1, ki je sestavni del nukleokapside. Proces razmnoževanja virusa začne s primarno sintezo virusnih mRNA ob aktivaciji polimeraznega kompleksa PB1, PB2 in PB3 in endonukleazno cepitvijo 5' konca. Ob vključitvi celične polimeraze poteka prepis iz virusne RNA v mRNA, nato pa se prepiše še celotna RNA, nastane pozitivno orientirana RNA, ki služi kot matrica za novonastale virusne RNA. Sinteza virusne RNA poteka v dveh fazah. Najprej se sintetizira matrična RNA v celotni dolžini, nato poteka sinteza novih kopij virusne RNA. Podvojevanje virusne RNA regulirajo nestrukturni proteini. Virusne mRNA potujejo v citoplazmo, kjer se na prostih ribosomih prevedejo v polimerazne proteine. PB1, PB2, PA in NP katalizirajo sintezo cRNA. Proteini virusne ovojnice (HA, NA in M2) se sintetizirajo v drugi fazi v ribosomih, vezanih na membrano endoplazmatskega retikuluma, in potujejo na celično membrano, kjer tudi ostajajo. PB1 nastopa tudi kot katalizator sinteze virusne RNA. V jedru poteka prepisovanje in replikacije virusne RNA ob sodelovanju virusne polimeraze. Virusna RNA nastopa v dveh funkcijah: v vlogi matrice za sintezo mRNA in je hkrati osnova za prepis v komplementarno pozitivno orientirano RNA. Polimerazni proteini se vračajo v jedro celice, kjer se vključijo v replikacijo virusa in sekundarno sintezo mRNA. Rezultat tega je tvorba novih virusnih RNA. Tudi proteina M1 in NS2 se vračata v jedro celice in sodelujeta pri izstopanju novonastalih nukleokapsid iz jedra. Novosintetiziran protein M1 vstopi v jedro celice, nanj se veže virusna RNA, ki jo nato transportira iz jedra v citoplazmo do mesta sestavljanja virusa. Proteini virusnega plašča se vrinejo v citoplazmatsko membrano, pride do brstenja in vrivanja nukleokapside v mešiček in zorenja novih virusnih partiklov. Zaradi sinteze virusnih proteinov in prekinitve sinteze celičnih proteinov ter sinteze novih virusnih partiklov prihaja do citolize celice znotraj 20–40 ur po infekciji.





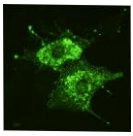
Slika 91: Shematski prikaz replikacije virusov iz družine *Orthomyxoviridae*. (1.) Vezava virusa na molekule sialične kisline na površini celice, (2.) Endocitoza, (3) fuzija z endosomalno membrano, (5) sprostitvev ribonukleoproteinov (5) prehod vgenomskih segmentov v jedro celice, (6) prepis genoma v mRNA molekule, (7) tsinteza virusnih regulatornih beljakovin, (8) potovanje regulatornih in nukleokapsidnih proteinov v jedro celice, (9) prepis virusne –RNA v komplementarno cRNA in sinteza genomskih segmentov, (10) glikolizacija ovojničnih proteinov, (11) vezava ovojničnih proteinov na celično membrano, (12) izstopanje nukleokapside in jedra celice in njen transport do celične membrane, (13) brstenje in dzorevanje virusa.



Slika 92: Najpogostejša pota širjenja različnih vrst virusov iz rodu *influenzavirus A*. Rezervoar virusov tega rodu so praviloma vodne ptice.

Vrsta: Virus influence konj (angl. *Equine influenza virus*)

Pri konjih se najpogosteje pojavljata dva patogena seva, ki sta uvrščena v rod *Influenza A*, in sicer sev H7N7, H3N8. Kopitarji se običajno okužijo po respiratorni poti. Virus se najprej namnoži v epitelnih celicah gornjih dihalnih poti. Obolenje se izraža v povišani telesni temperaturi, z respiratornimi simptomi, kot so kašelj, in vnetju gornjih dihalnih poti. Obolenje se pojavlja pri vseh kopitarjih. Naravna infekcija se običajno začne z vdihavanjem aerosola, ki vsebuje virus influence.



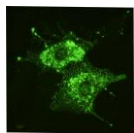
Resice na celicah respiratornega epitelijskega tkiva in mukopolisaharidi sluzi mehanično ovirajo vezavo virusa na površino celice. Pomembno vlogo pri zaščiti igrajo specifična protitelesa skupine IgA. Proces infekcije se začne s cepitvijo virusnega proteina HA s celičnimi proteazami na molekuli H1 in H2, s tem se protein HA aktivira in se lahko veže na celične receptorje – sialoglikoproteine, ki se nahajajo na površini epitelnih celic respiratornega trakta. Poškodba epitelnih celic zaradi razmnoževanja virusa vodi v hiperemijo, edem, nekrozo in luščenje. Zaradi eksudata v dihalnih poteh se zmanjša zaščita resastega epitelijskega tkiva, vodi tudi v zmanjšanje alveolarnih makrofagov in sekundarnih bakterijskih okužb. Infekcija z virusom influence aktivira nespecifični imunski odgovor, pride do sinteze interleukina 6 in interferona. Citokin 6 stimulira rast in diferenciacijo limfocitov B in T. Okužene celice predstavijo virusne antigene limfocitom T in B, kar vodi do aktivacije limfocitov B in tvorbe protiteles skupine IgA in IgG. Citotoksični limfociti T lizirajo inficirane celice. Protitelesa IgA imajo najpomembnejšo vlogo zaščite sluznic ter pri preprečevanju in širjenju okužbe. Virusni proteini HA in NA sta zelo imunogena. Nevtralizacija virusa deluje na osnovi vezave specifičnih protiteles na mesto cepljenja prokurzorja HA0, kar prepreči cepljenje na molekuli HA1 in HA2. Posledica tega je onemogočanje fuzije celične membrane z virusom. In na ta način prepreči vstop virusa v celico. Vloga protiteles proti proteinu NA je v preprečevanju izstopa virusa iz celice.

Influenca kopitarjev je akutna, kontagiozna bolezen, ki se kaže s katralnim sindromom. Inkubacija traja od 24 ur do 5 dni. Sledi ji nagel porast telesne temperature, pojavljata se tahikardija in tahipneja. Sluznice so hiperemične, pojavi se nosni izcedek in kašelj, pojavijo se znaki iztegnjene glave. V času viremije lahko prihaja do miokarditisa. Najpogostejše komplikacije so sekundarne infekcije z bakterijami, kot so *Streptococcus equi* in mikoplazme. Za laboratorijsko diagnostiko je pomemben pravočasen odvzem vzorcev. Bolne živali izločajo virus od enega do desetega dne po infekciji. Najprimernejši vzorci so brisi respiratornih poti, odvzeti znotraj 48 ur po pojavi kliničnih znakov bolezni. Nazofaringealne brise ali trahealne izpirke damo v transportni medij in ga v najkrajšem času hranjenega pri temperaturi blizu +4°C dostavimo v laboratorij. Virus influence lahko razmnožimo v kokošjih embrijih. Prisotnost virusa v alantoisni tekočini lahko preverimo s hemaglutinacijskim testom. Prisotnost virusa v inficiranih epitelnih celicah, odvzetih z nosnim brisom, lahko dokažemo z imunofluorescenčnim testom ali s testom RT-PCR. Najboljše ciljno mesto za molekularno diagnosticiranje je gen za protein M, ki je zelo ohranjen. Okužbo lahko potrdimo tudi s serološkimi metodami; dokazom specifičnih protiteles proti virusu influence s testom ELISA ali testom inhibicije hemaglutinacije.

Influenca konj je prisotna tudi v Sloveniji. Obolenja se preprečujejo s preventivnim cepljenjem konj proti virusu influence. Cepiva vsebujejo tip H7N7 in tip H3N8. Uporabljajo se inaktivirana in atenuirana cepiva.

Vrste: Virus influence prašičev

V populaciji prašičev najpogostejše krožita dva patogena seva virusa influence A, in sicer H3N2 in H1N1. Humani tipi virusa se pogosto pojavljajo tudi pri prašičih, zlasti tipa H3N2 in H1N2. Pri prašičih poteka obolenje običajno v milejši obliki. Bolne živali si v od 3 do 6 dneh običajno opomorejo. Virusni sevi prašičev so patogeni tudi za človeka. V primeru koinfekcije z različnimi tipi virusa prihaja do zamenjav virusnih segmentov, tako se pojavljajo novi tipi virusa, ki imajo segmente od humanih, prašičjih in aviarnih tipov, od tod tudi taka heterogenost sevov in različna stopnja patogenosti. S takimi rekombinacijami dobimo sev, ki ima na primer gene HA, NA in PB1 od virusa humanega izvora, gene NP, M in NS prašičjega ter PB2 in PA aviarnega izvora, kar imenujemo antigenski premik. Prašič se lahko okuži z različnimi tipi, ki so prilagojeni na druge vrste, lahko tudi z aviarnim tipom H5N1. Influenca pri prašičih se običajno pojavlja sezonsko, z znaki povišane telesne temperature, oteženim dihanjem, nosnim izcedkom in kašljem. Živali običajno po 6 do 10



dneh ozdravijo.

Vrsta: Virus aviarne influence

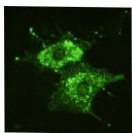
Povzročitelje aviarne influence delimo glede na patogenost v dve skupini, in sicer: Zelo patogena aviarna influenza (angl. *highly pathogenic avian influenza*, HPAI), ki povzroča visoko obolevnost in smrtnost (do 100-odstotno), in nizko patogena aviarna influenza (angl. *low pathogenic avian influenza*, LPAI), ki povzroča blaga obolenja. Podtipi virusa influence A določata površinska antigena hemaglutinin (H) in nevrominidaza (N). Do zdaj je poznanih 15 H in 9 N podtipov, ki se pojavljajo v različnih kombinacijah.

Poznani so visoko patogeni sevi H7N7, H5N1 in H5N9. Poznano je tudi, da je virusni sev H5N1 patogen tudi za človeka, kar pri ostalih sevih perutnine do zdaj še ni bilo dokazano. Različni izolati so patogeni tako za domačo kot divjo perjad. Patogenost posameznih izolatov je odvisna od konformacije proteina HA in njegove cepitve in s tem aktivacije proteina. Pomnoževanje virusa pri perutnini ne poteka samo v respiratornem, ampak tudi v prebavnem traktu. V primeru okužbe z virulentnimi sevi so prisotne limfoidne in visceralne nekroze, pankreatitis, miocarditis in encefalitis. Virus, tako kot drugi virusi influence A in B, preživi daljše obdobje v tkivih, iztrebku in tudi v vodi. Pri temperaturi 56 °C preživi 3 ure, pri temperaturi 60 °C pa 30 minut, uniči ga kislo okolje. Inaktivirajo ga kemična sredstva, kot so oksidativna sredstva, natrijev karbonat in sulfat, maščobna topila, razkužila jodnih pripravkov, kvarterne amonijeve spojine, glutaraldehid in formalin.

Bolezen aviarna influenza (ptičja gripa) je bila najprej opisana v Italiji leta 1878, kasneje pa so ta virus uvrstili v skupino virusov influence A. Naravni rezervoar so vodne ptice, običajno pri njih poteka okužba brez simptomov.

Če ti sevi preidejo na kokoši ali purane in je v taki jati prisotnih več ciklusov okužbe, se ti sevi lahko adaptirajo na domačo perutnino in pridobijo na virulenci. Serijske mutacije lahko povzročijo, da se iz nepatogenega seva razvije patogen sev. Visoko patogeni sevi povzročajo tudi do 100-odstotno smrtnost. Veljalo je, da aviarni sevi niso patogeni za sesalce. Vrstna dovzetnost je odvisna od strukture proteina HA in receptorjev sialične kisline na ciliarnem epitelu sluznic. Antigenski preskok označujemo, ko gre za spremembo antigenских determinant znotraj same replikacije virusa. To se dogaja ob sočasni infekciji celice z dvema različnima tipoma virusa. Segmenti genoma pri hibridnem potomcu so različni od obeh staršev in s tem tudi gre za spremembo patogenosti virusa. Taki novi sevi nastajajo z resortiranjem segmentov genoma med različnimi sevi. Znotraj populacije ptic krožijo različni tipi virusov influence, ki so različno patogeni za posamezne vrste. Visoko patogene oblike ptičje gripe, patogene za domačo perutnino, povzročajo vrste virusov iz skupine virusov vrste A, podtipov H5 in H7. Ti tipi se ohranjajo tudi pri divjih pticah. Patogenost posameznega izolata je odvisna od strukture cepitvenega konca proteina HA. Ta regija je pomembna pri cepitvi proteina HA1 in HA2, kar je nujno za vstop virusa v celico. Aktivnost cepitvenega mesta in s tem občutljivost na izvencelične proteaze je odvisna od aminokislinskega zaporedja te regije. Pogoste mutacije v tej regiji imajo bistven vpliv na spremembo patogenosti določenega izolata. K sreči je rojevanje visoko patogenih tipov na terenu redek pojav. Izid okužbe je odvisen od seva virusa in vrste gostitelja.

Simptomi, ki nastanejo po okužbi z nizko patogenimi sevi, so lahko zelo diskretni. V primeru okužbe perutnine z visoko patogenimi sevi se simptomi z mortaliteto blizu 100 % pojavijo že znotraj 48 ur. Virus AI je endotelotropni virus, kar vodi do nekoordiniranega sproščanja citokinov, kar vodi do multiorganskega propadanja. Pri živalih z daljšim potekom bolezni prevladujejo nevrološki simptomi. Številna perutnina poginja brez predhodnih znakov, zato se pogosto posumi na zastrupitev. Vidni so edemi glave, cinoza grebena, pojavi se driska, prekine se nesnost. Pojavijo se



petehialne krvavitve po sluznicah. Nekatere zlasti divje ptice so povsem odporne na visoko patogene seve za perutnino in so rezervoar virusa v naravi.

V diferencialni diagnostiki HPAI je potrebno biti pozoren na nekatere bolezni s podobnimi simptomi, ki jih spremlja visoka mortaliteta ter hemostaza podbradka in grebena: infektivni laringotraheitis (kokoši), račja kuga, kokošja kuga, akutne zastrupitve, akutna kolera kokoši (*Pasteurellosis*) in druge septikemične bolezni, bakterijski celulitis podbradka in grebena.

Za virološko preiskavo odvezamemo bris kloake in brise orofarinksa in jih do laboratorija transportiramo v transportnem gojišču, ki smo mu dodali visoke doze antibiotikov. Vzorce držimo na hladnem. Če transport traja več kot 24 ur, jih hranimo na suhem ledu. Ob sekciji odvezamemo vzorec možganov, pljuč vranice in črevesja. Za serološke preiskave potrebujemo vzorce krvi, odvzete živi perutnini.

Vzorce testiramo z metodo RT-PCR in nadaljujemo z izolacijo virusa na oplojenih kokošjih embrijih. V pozitivnem primeru izolat tipiziramo. Vzorec apliciramo v horioalantoisno votlino. Če je prisoten visoko patogeni sev, embriji odmrejo v roku 48 ur po inokulaciji. S pomočjo testov inhibicije hemaglutinacije lahko posamezen izolat tipiziramo, za kar potrebujemo podtip specifične antiserume. Hitrejši način postavitve diagnoze je z uporabo molekularnih metod, s pomočjo reverzne transkriptivne reakcije verižne transkriptaze (RT-PCR), s katero pomnožujemo odsek gena za protein M ali gen za protein NP. Izolat tipiziramo s sekvenčno analizo.

Virus influence je razširjen po vsem svetu in tudi v Sloveniji. Ukrepi ob pojavu bolezni so odvisni od stopnje patogenosti virusa. Rezervoar virusa so zlasti vodne ptice. Zaradi potencialno uničujočih ekonomskih posledic, ki jih lahko povzroči, je uzakonjeno, da je HPAI po vsem svetu pod pozornim opazovanjem. Bolezen se obvezno prijavlja. V EU je prepovedano profilaktično cepljenje proti ptičji gripi, ker zaradi hitrega spreminjanja virusa ni na voljo ustreznih cepiv. Če pride do izbruha ptičje gripe, se postavijo cone obvladovanja in nadzora bolezni okrog izbruha s premerom, ki je različen v posameznih državah (v EU je to 3 in 10-kilometrski premer). Uspešno eradikacijo visoko patogene aviarnе influence na Nizozemskem leta 2003 in v Kanadi leta 2004 so dosegli z ustvaritvijo buffer cone, široke od 1 do več kilometrov, okrog okuženih poslopij. S tem so popolno zajeli vso perutnino. Ob tem je bilo uničeno 30 milijonov kerutnine.

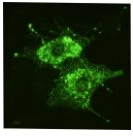
Vrsta: Virus influence psov (angl. *Canine influenza virus*)

Influenca psov najpogosteje povzroča vrst Influenca A virus, serotip H3N8, so pa psi občutljivi tudi na sev H5N1 in H3N2. Klinična znamenja so podobna respiratornim pasjim kompleksom. Virus povzroča nekrotične spremembe na gornjem in spodnjem respiratornem traktu.

Rod: Isavirus

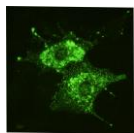
Vrsta: Kužna anemija lososov (angl. *Infectious salmon anemia virus (ISA)*)

ISA virus je patogen za lososse (*Salmo salar*), povzroča do 100% pogim, ostale salmonidne vrste rib ne obolevajo, so pa nosilec in rezervoar virusa.



Dodatni študijski viri:

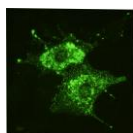
- Van Reeth K. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet Res* 2007;38(2): 243–60.
- Zorman - Rojs O, Krapež U, Račnik J, Dovč A, Barlič - Maganja D. Okužbe z virusi aviarne influence. *Vet Nov* 2005; 31(9/10): 243–9.

**VIRUSI Z DVOJNOVIJAČNIM RNA GENOMOM****14****REOVIRIDAE****Splošne lastnosti in klasifikacija reovirusov**

Družino *Reoviridae* sestavlja petnajst rodov, v katere so uvrščeni virusi sesalcev, ptic, rib kot tudi rastlin. Izraz *reo* izhaja iz kratice, ki jo sestavljajo začetne črke angleških besed *respiratory*, *enteric* in *orphan*, saj so bili prvi virusi te družine najdeni v respiratornem in prebavnem traktu živali in človeka. Družino *Reoviridae* sestavljata dve poddružini s petnajstimi rodovi. Za veterinarsko medicino sta pomembna zlasti rodova *Orbivirus* in *Rotavirus*. V poddružino *Spinareovirinae* spadajo zlasti vrste, ki se pojavljajo pri rastlinah, insektih in plazilcih. V to družino so uvrščeni virusi z genomom, ki ga gradi segmentirana dvojnovijska molekula RNA. Virusi v rodu *Orthoreovirus* in *Orbivirus* imajo genom z desetimi segmenti, rotavirusi imajo 11, coltivirusi pa 12 segmentni genom. Predstavnike te družine najdemo pri različnih vrstah živali, in sicer pri sesalcih, ribah, plazilcih in insektih ter rastlinah. Nekatere vrste prenašajo tudi insekti. V rod *Orbivirus* sta uvrščena virus bolezni modrega jezika (BTV) in virus konjske kuge, v rod *Rotavirus* pa vrste, ki pri mnogih živalskih vrstah povzročajo enteritise. Rod *Aquareoviruses* sestavljajo vrste, ugotovljene pri ribah in školjkah. Tudi ta skupina virusov s segmentiranim genomom je zelo heterogena. Ker imajo virusi, uvrščeni v to družino, segmentiran genom, prihaja med replikacijo virusa do pogostih sprememb, ki so posledica shifta (izmenjava segmentov genoma med različnimi serotipi virusa) ali drifta (mutacija na posameznem genu), podobno kot pri virusu influence. Posamezne vrste so zelo raznolike. Znotraj posamezne vrste virusa je poznanih večje število različnih tipov. V rod *Orbivirus* so uvrščene vrste, za katere je značilen vektorski prenos preko insektov. V ta rod spada virus bolezni modrikastega jezika s 25 serološko in antigensko različnimi tipi virusa. Tudi virus afriške konjske kuge se pojavlja v 9 različicah. Genetske razlike in podobnosti med posameznimi tipi lahko določimo z analizo nukleotidnega zaporedja genoma virusnega izolata.

Virusi, uvrščeni v rod *Rotavirus*, so prisotni pri vseh vrstah živali. Za nas je pomembna zlasti vrsta rotavirus A, ki povzroča zlasti enteritise pri človeku, govedu, prašičih, konjih, perutnini in ljubiteljskih živalih. Vrsta rotavirus B je patogena za človeka, govedo in prašiče, vrsta C za človeka, prašiče in govedo, vrsta D za ptice in E za prašiče. Vrsto A sestavlja 15 genotipov, ugotovljenih na osnovi razlik gena za protein VP4. Klasifikacijo virusa v posamezne genotipe lahko opravimo na osnovi uporabe različnih monoklonalnih protiteles proti epitopom kapsidnih proteinov VP4 in VP7, na osnovi separacije genomskih segmentov z elektroforezo na agaroznem gelu.

Poddružina/rod	Vrsta	Gostitelj
SEDOREOVIRINAE		Raki
<i>Cardoreovirus</i>		
<i>Mimoreovirus</i>		
<i>Orbivirus</i>	African horse sickness virus	Kopitarji, insekti kot vrktor
	Bluetongue virus	Parklarji, insekti kot vektor
	Epizootic hemorrhagic disease virus	jeleni
	Equine encephalosis virus	konji
<i>Phytoreovirus</i>		rastline



<i>Rotavirus</i>	Rotavirus A	
	Rotavirus B	
	Rotavirus C	
	Rotavirus D	
	Rotavirus E	
<i>Seadornavirus</i>		Sesalci, žuželke
SPINAREOVIRINAE		
<i>Aquareovirus</i>		ribe
<i>Coltivirus</i>		sesalci
<i>Cypovirus</i>		žuželke
<i>Indoreovirus</i>		Žuželke
<i>Orthoreovirus</i>	Avian orthovirus	ptice, plazilci

Preglednica 12: Klasifikacija virusov pomembnih za veterinarsko medicino znotraj družine *Reoviridae*.

Rod *Orbivirus*

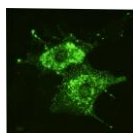
Morfologija virusa

Reovirusi so brez ovojnice, okroglaste oblike, velikosti od 68 do 70 nm. Zgrajeni so iz 9 različnih strukturnih proteinov. Kapsida je troslojna. Virusi v rodu *Orbivirus* imajo nukleokapsido, ki je ikozaedralne oblike in je iz 132 kapsomer. Kapsido sestavlja 7 strukturnih proteinov, označenih s kraticami od VP1 do VP7. V fazi replikacije se pojavljajo še trije nestrukturni proteini z oznakami NS1, NS2 in NS3. Zunanji sloj kapside sestavljata proteina VP2 (60 molekul) in VP5 (120 molekul), ki sta odgovorna za vezavo virusa na celico in vstopanje virusa v celico. To sta najbolj variabilna proteina. Serotipizacija posameznih izolatov se opravlja na osnovi razlik proteina VP2. Ta protein ima tudi hemaglutinacijske lastnosti. Notranji sloj kapside je iz proteinov VP7, VP3 in VP1. Protein VP7 je odgovoren za infekcijo celic insektov. Neposredno ob genomu virusa se nahajajo proteini VP1, VP4 in VP6, ki sodelujejo pri transkripciji in replikaciji virusa. Za filogenetsko analizo je zelo primeren segment 3 (S3), ki kodira protein VP6. Proteini VP1, VP6 in VP4 so pripeti na posamezen segment genoma in se vključijo v proces transkripcije in replikacije virusa. Protein VP3 ima funkcijo encima od RNA odvisne polimeraze RNA, VP4 ima funkcijo proteina cap, VP6 pa je encim helikaza. Protein VP 7 formira zunanji proteinski sloj virusa. Nestrukturni proteini (NS1, NS2, NS3 in NS3A) sodelujejo pri kontroli replikacije virusa BTV, maturaciji in izstopanju virusa iz okužene celice.

Struktura in funkcije posameznih proteinov

Velikost strukturnih proteinov virusa je od 25.000 do 149.000 daltona. Virus sestavlja 7 strukturnih proteinov. Velike proteinske molekule predstavljajo proteini VP2, VP3, VP5 in VP7, ki predstavljajo 94 % celotne proteinske mase virusa.

Položaj proteinov v virusu	Funkcija	Protein (gen)		
		Orthoreovirus	Rotavirus	Orbivirus
Znotraj kapside	polimeraza RNK	λ3	VP1	VP1



		$\lambda 2$	VP3	VP4
			VP2	VP6
Notranji del kapside	strukturni protein	$\lambda 1$	VP6	VP3
		$\mu 1/\mu 1$	VP6	VP7
Zunanji del kapside	strukturni proteini	$\delta 3$	VP7	VP5
		$\delta 1$	VP4	VP2
Nestrukturni proteini	funkcije encimov	μ NS	NSP1	NS1
		δ NS	NSP2	NS2
			NSP3	NS3
			NSP4	
			NSP5	

Preglednica 13: Struktura in funkcije proteinov znotraj družine *Reoviridae*.

VP2 ima obliko trimerne molekule na zunanjem sloju kapside. Njegova funkcija je vezava na celične receptorje. Ima hemaglutinacijske lastnosti. Na osnovi antigenskih razlik tega proteina lahko serotipiziramo posamezne izolate. Veže se na sialoglikoproteine, kar omogoča vezavo virusa na eritrocite. Na osnovi filogenetske analize gena za protein VP2 lahko posamezne izolate uvrščamo v serotipe.

Protein VP5 je zelo ohranjen. Nahaja se v zunanjem sloju nukleokapside in je vrinjen med molekule VP2. Ima pomembno vlogo pri penetraciji virusa v celico. Ob spremembi vrednosti pH se njegova konformacija spremeni, kar protein tudi aktivira.

Proteina VP3 in VP7 sta proteina jedra virusa s hidrofobnimi lastnostmi in formirata strukturo virusnega jedra. Virusno jedro samo po sebi ni infektivno za sesalce, je pa infektivno za insekte. V tem primeru ima protein VP7 funkcijo vezave in penetracije virusa na celico brez prisotnosti proteinov VP2 in VP5. VP7 se veže na glikozaminglikan na površini celice insektov. Kompleks VP3/VP7 ščiti virusni genom pred aktivacijo interferona I.

V virionu se nahaja le 12 kopij proteina VP1. Molekula proteina VP1 je pripeta na genom. Ima funkcijo replikaze, ki sintetizira dsRNA iz matrice virusne +RNA. Aktivnost VP1 poteka tudi pri nižjih temperaturah od telesne, tako da lahko kataliza poteka tako pri sesalcih kot insektih.

Protein VP4 ima funkcijo kape genoma, tako da stabilizira virusni segment mRNA.

Protein VP6 je aktiven pri vezavi ATP in ima funkcijo helikaze. Vključen je v sintezo dsRNA.

Nestrukturni proteini se pojavljajo v okuženi celici v fazi replikacije virusa. Proteina NS3 in NS3a sta v celicah sesalcev komaj prisotna, v večji količini pa se sintetizirata v celicah insektov.

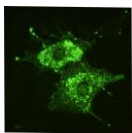
Protein NS1 je tubularne strukture in zavira propad okužene celice. Protein je zelo imunogen.

NS2 se pripne na virusno ssRNA in hidrolizira nukleotid trifosfat v monofosfat, tako da NS2 kondenzira virusne segmente ssRNA pred potekom uvajanja segmentov v kapsido.

NS3 in NS3A se vežejo na intracelularno membrano in sta prisotna tudi v citoplazmatski membrani. Vključena sta v proces izstopanja virusa iz celice, tako da povečata prepustnost celične membrane.

Občutljivost virusa

Virusi iz rodov *Orbivirus* in *Rotavirus* so zelo stabilni, obstojni so tudi pri nizkem pH ter odporni na topila lipidov. Rotavirusi so obstojni v naravnem okolju tudi več mesecev. Prav tako je obstojen virus bolezni modrikastega jezika, na primer v posušeni krvi tudi do enega leta. V tkivu ali krvi je



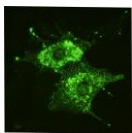
virus zelo obstojen tudi pri + 20 °C. Virus ni obstojen pri nižji vrednosti pH od 6,5. Relativno rezistenten je na žarke UV. Rezistenten je na maščobna topila, občutljiv na kisline in luge.

Zgradba genoma orbivirusov

Genom predstavlja linearna dvojnovijačna segmentirana molekula RNA. Virusni genom je sestavljen iz desetih (*Orbivirus*, *Orthoreovirus*), enajstih (rod *Rotavirus* in *Aquareovirus*) ali dvanajstih segmentov (rod *Coltivirus*, *Saedornavirus*), ki jih je mogoče po obdelavi z restrikcijskimi encimi separirati na elektroforeznem gelu. Na osnovi velikosti so posamezni segmenti razdeljeni v skupino velikih segmentov (angl. *large*, L), skupino segmentov srednje velikosti (angl. *medium*, M) in skupino majhnih segmentov (angl. *small*, S). Tako so 3 geni z oznako L, 3 z oznako M in 4 z oznako S. Terminalni konec na 5' koncu molekule predstavlja zaporedje od 8 do 34 nukleotidov, na 3' koncu pa zaporedje 6 nukleotidov. Posamezni segmenti genoma se med seboj razlikujejo po velikosti. V posameznem segmentu se nahajajo tudi geni za določene proteine. Posamezne segmente genoma označujejo s števili od 1 do 10. Gene za posamezne proteine delimo v gene za strukturne in gene za nestrukturne proteine. Nukleotidno zaporedje za posamezne gene je že poznano.

Pomnoževanje orbivirusov

Pomnoževanje virusa poteka v citoplazmi celice. Virus vstopa v celico na dva načina: ali se virusni partikel veže na celico gostiteljico in vstopi v celico kompletен virus ali pa vstopa v celico virus, ki so mu celični encimi odstranili zunanji sloj kapside, virus pa vstopi v celico po principu endocitoze. Virusni partikli se lahko delno slečejo že izven celice in kot taki lahko vstopajo v citoplazmo po principu penetracije skozi endosomalno membrano. Virus se na celico veže s proteinom VP2. Molekula je v obliki trimerne niti z odebeljenim koncem. Receptorji za ta protein so molekule sialične kisline ali molekula JAM (angl. *junction adhesin molecule*) – transmembrani protein celične stene. Izolate rodu *Orbivirus* je običajno težko razmnoževati na celičnih kulturah. Izolate je postopoma mogoče adaptirati na oplojena kokošja jajca in nekatere celične kulture, kot so BHK-21, Vero, MDBK in celične linije insektov iz družine Culicoidae. Protein VP2 nekaterih sevov, na primer BTV 20, ima tudi afiniteto vezave na eritrocite ovac. Goli virioni pa uspešno vstopajo v celice sesalcev kot tudi insektov. Virus vstopa v celico po principu endocitoze. Formira se endosom, ki obdaja virion. Tako se virion hitro po infekciji znajde v vezikuli, ki se združi z lizosomom. V lizosomu pride do razpada površinskih proteinov zaradi delovanja proteaz in katepsina, ki se nahajajo v endosomu. Z odcepitvijo proteina VP5 se osvobodi protein VP7, ki predre steno endosoma, tako da v citoplazmo vstopi le nukleokapsida brez vrhnjega proteinskega sloja. Ob proteolitičnem razpadu zunanje kapside pride do aktivacije mRNA. Virusne transkriptaze so aktivne tudi pri nižjih temperaturah kot običajno, to je pri temperaturi 28 °C. Začetno prepisovanje poteka še v formirani nukleokapsidi ob aktivaciji lastnih encimov, tako da virusna dsRNA ni nikoli izpostavljena citoplazmi. Virusna transkriptaza (protein VP1) skupaj z encimi prepiše segmente L1, M3, S4 in S3, nastane mRNA za posamezni segment genoma in ta se izrine iz virusnega jedra skozi kanale v celično citoplazmo, potuje do prostih ribosomov, v katerih se sintetizirajo zgodnji regulacijski proteini. Replikacijo genomskih segmentov katalizira polimeraza RNA (protein VP1). Ob pomoči polimeraze RNA (transkriptaze) nastanejo –RNA verige od vsake dvovijačne RNA, ki se poparijo, in s tem nastanejo genomske dsRNA. Zamenjava parov dsRNA se lahko zgodi v primeru, ko je ista celica okužena z dvema različnima serotipoma virusa BTV hkrati, kar ima pomembno vlogo v evoluciji virusa. Sledi sekundarno prepisovanje; negativno polarna vijačnica vsakega segmenta se prepiše ločeno v citoplazmi s pomočjo virusne transkriptaze in nastane mRNA, sledi translacija genov za strukturne proteine. Novonastali proteini se kondenzirajo ob jedru celice, dvojnovijačna virusna RNA se uvede v kondenzirano kapsido in nato virusni partikli potujejo do

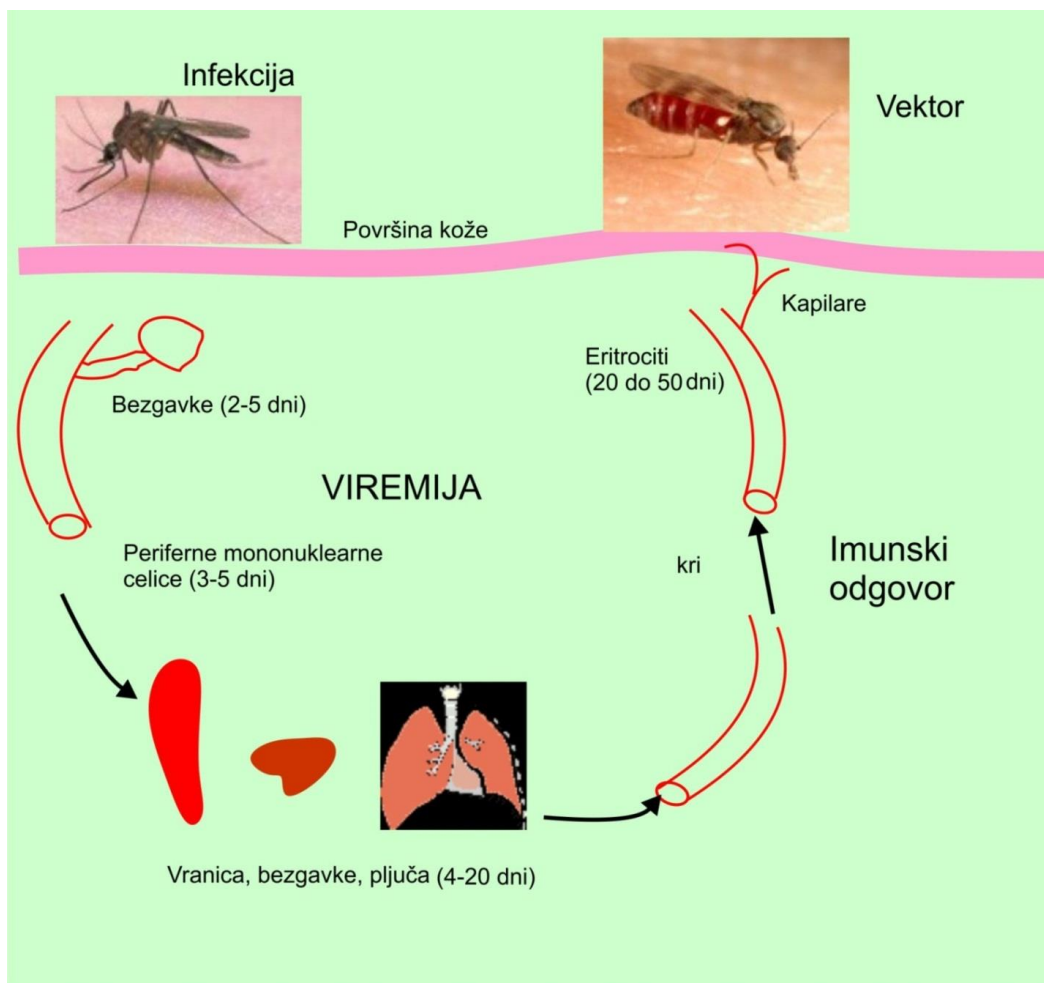
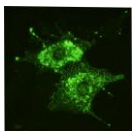


celične stene ter ob aktivnosti nestrukturnih proteinov NS3 izstopijo iz celice ob odprtju celične stene, temu sledi smrt celice.

Vrsta: Virus bolezn modrikastega jezika (angl. *Bluetongue disease virus*)

To bolezen so najprej opisali v Afriki, razširjena pa je po vseh vročih in vlažnih območjih zemlje. Prisotna je tudi v Evropi, zlasti v Italiji. V letu 2008 so ugotovili serotip BTV 8 najprej na Nizozemskem, nato se je okužba razširila v večino držav EU. Povzročitelj bolezn modrikastega jezika je virus, ki spada v družino *Reoviridae*, rod *Orbivirus*. Od ostalih virusov iz te družine se poleg razlik v genomu razlikuje tudi po velikosti; je manjši od ostalih, ima različno zunanjo zgradbo kapside, je občutljivejši na ekstremne pH in visoko temperaturo, razvoj bolezn v naravi pa je vezan na insekte. Je okroglaste oblike, v premeru meri 70 nm, nukleokapsida je iz 32 kapsomer, ki jih sestavlja 7 strukturnih proteinov. Poznanih je 25 različnih serotipov virusa. Prenos virusa z živali na žival je vezana na hematofagne artropode, predvsem iz skupine *Culicoides*. Virus se razmnožuje tako v insektih kot sesalcih. Prvi opisi virusa z morfološkimi in biokemičnimi karakteristikami so bili podani leta 1969.

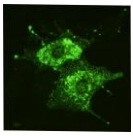
Bolezen modrikastega jezika je sezonska bolezen. Za njo primarno zbolijo drobnica in govedo ter divji prežvekovalci. Prenaša se s krvosesnimi insekti, predvsem iz rodu *Culicoides*. Dovzetni so tudi divji parkljarji. Smrtnost v populaciji ovac je tudi od 30 do 70-odstotna. Poznanih je 25 različnih serotipov virusa, ni pa kužen za človeka, zato uporaba mesa in proizvodov okuženih živali ni človeku nevarna. Med vektorje prištevamo insekte, kot so *Culicoides imicola*, *C. obsoletu*, *C. pulicaris*, *C. variipennis* in druge. Bolezen se izraža sezonsko, saj je vezana na prisotnost insektov. Govedo običajno ne razvije jasnih kliničnih znakov bolezn, so pa pomemben rezervoar virusa. Virus se prenaša z bolne živali na zdravo s pikom insektov, lahko tudi jatrogeno, s spermo okuženih bikov in ovnov kot tudi vertikalno v času gravidnosti z matere na teleta. Ugotovljenih je 27 vrst komarjev iz rodu *Culicoides*, ki lahko prenašajo virus. Ko se samica komarja nahrani s krvjo, poleže jajčeca. Razvoj komarja je odvisen od temperature in vlage okolja. Komarji so veliki od 1 do 2 mm. Živijo približno 21 dni. Komarji moškega spola se hranijo z nektarjem rastlin. Komarji so aktivni ponoči, vendar ne v času, ko je temperatura pod 10 °C in ni vlage. Najprimernejša so jesenska obdobja. Komar na dan preleti več kilometrov, odvisno od vetra. Ko se komar napije krvi okužene živali, se virus namnoži v črevesnih celicah komarja, virus prispe v slinsko žlezo, in tako se začne nov cikel. Okužba komarjev poteka tudi preko larv. Najdovzetnejša je vrsta *C. imicola* in *C. obsoletus*. Komar pri temperaturi 25 °C srka kri vsake 3 dni. Ker se virus v komarjih prenaša tudi transovarialno, lahko preživi tudi zimo. Za obolenje so dovzetnejše ovce in koze. Viremija se pojavi običajno 3–5 dan po okužbi. Obolenje se kaže v obliki povišane telesne temperature, trahipneje in letargije. Vidni so edemi podkožja, hemoragije, posebno v bezgavkah, pljučih, srcu, miškulaturi, sluznicah prebavnega trakta. Simptomi se kažejo v povišani telesni temperaturi, apatiji, nosnem izcedku, erozijah po sluznici nosu in ust, edemu ustnic in jezika z izrazito cianozo. Prisotna je tudi vnetje svitka in parkljev. Najbolj so prizadeta pljuča. Preživele živali razvijejo kronični dermatitis. Podobno kot pri slinavki in parkljevki se pojavijo vezikule in erozije po sluznicah. Prisotna je panlevkopenija, zmanjšano je zlasti število limfocitov T. Pri perzistentno inficiranih živalih se nahaja v limfocitih T.



Slika 93: Patogeneza virusa bolezni modrikastega jezika pri govedu.

Po vnosu virusa preko pika insektov v organizem poteka primarno pomnoževanje virusa v najbližjem limfatičnem tkivu. Virus se nato namnoži v endotelnih celicah in mononuklearnih fagocitih. Virus vstopi tudi v eritrocite. Najdemo ga v intracelularnih veziklih eritrocitov, vendar se v njih ne razmnožuje. V njih perzistira v času viremije, ki lahko perzistira tudi ob prisotnosti nevtralizacijskih protiteles. Virus BTV se nahaja v krvi tudi do 160 dni infekcije, ker se virus nahaja zaščiteno pred protitelesi znotraj eritrocitov. Virus v najvišjem titru dokažemo v eritrocitih in trombocitih. Prisotnost virusa v krvi je tako vezana na življenjsko dobo eritrocitov. Žival, ki se okuži pozno v jeseni, je tako lahko nosilec virusa skozi zimsko obdobje. Virus perzistira preko zime tudi v larvah insektov. Virusni proteini sprožijo sproščanje interferona, kar povzroča vnetne procese. Okužena žival odgovori s tvorbo protiteles. Nevtralizacijsko aktivnost imajo protitelesa proti proteinoma VP2 in VP5. Nevtralizacijska protitelesa, ki se pojavijo od 7 do 28 dni po okužbi, zaščitijo žival le proti homolognemu tipu virusa BTV. Okužba gravidne živali v prvi tretjini gravidnosti ima teratogeni učinek. Ni poznano, da bi bilo tele latentni klicenosec ob intrauterini okužbi, se pa rodi viremična teleta.

Pri ovcah se pojavi povišana telesna temperatura (41–42 °C), ki traja od 6 do 7 dni. Pojavi se edem; najprej pod spodnjo čeljustjo, sluznica ust postane modre barve; pojavijo se petehijalne krvavitve, erozije in uceracije. Slab prognostični znak je krvava driska. Pojavi se edem svitka na nogah, živali



šepajo, večinoma ležijo in se ne žele gibati. Za razliko od goveda so pri ovcah prizadete zlasti endotelne celice, ki reagirajo s hipertrofijo citoplazme, jedra in nekrozo. Posledica tega je eksudacija in tromboze. Virus ima pri gravidnih ovcah tudi tetratogeni učinek, transplacentarni prenos je mogoč, a je redek, tako da infekcija plodu nima pomembnejšega vpliva na širjenje bolezni. Če se plod inficira po 150 dnevu gravidnosti, se rodi viremično tele, ki pa ni perzistentno okuženo.

Inaktivirana cepiva dajejo kratkotrajno eno- do dvoletno zaščito. Po prvem cepljenju je potrebno med 14 in 21 dnevom po cepljenju aplicirati še eno dozo. Ta cepiva so varnejša. Uporabljajo se tudi rekombinantna cepiva, ki vsebujejo le antigen VP2, VP5 ali VP7. Te vakcine so pridobljene z genskim inženiringom, običajno tako, da gen za posamezni protein je vgrajen v bakulovirus. Cepljenje živali z vrstno specifičnim cepivom je edini učinkovit način preprečevanja bolezni. Na voljo so živa atenuirana in inaktivirana cepiva. Zadovoljivo zaščito dajejo tip specifična cepiva, tako da je potrebno v področjih, kjer je prisotnih več tipov virusa BTV uporabiti večvalentna cepiva (cepivo, ki vsebuje antigene proti več tipom virusa). Atenuirana cepiva dajejo dobro zaščito proti homolognemu sevu. Zadošča ena doza cepiva. Po cepljenju nekatere živali pokažejo blage klinične znake bolezni, simptomi izzvenijo v 1–2 dneh. Ni primerna za gravidne živali.

Diagnostika:

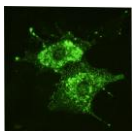
Virus lahko izoliramo iz polne krvi, odvzete v epruveto z antikoagulantom (heparin, etilendiamintetraacetat, EDTA). Take krvi ne zamrzujemo. Virus lahko izoliramo tudi iz brisov erozij na sluznicah smrčka. Virus je mogoče množiti na horioalantoični membrani oplojenega kokošnjega jajca, ali na celičnih linijah insektov, ali celični liniji BHK (angl. *baby hamster kidney*). V patohistoloških rezinah ali na okuženi celični kulturi lahko virus determiniramo z imunofluorescenčnim ali imunoperoksidaznim testom. Najprimernejša je metoda RT-PCR. S to metodo lahko virusno nukleinsko kislino dokažemo tudi pri serološko pozitivnih živalih. Za pomnoževanje se uporabljajo odseki genov, ki kodirajo proteine VP7, VP3, VP2, NS1 ali NS3. S sekveniranjem gena VP2 lahko tudi določimo serotip virusa. Pri govedu je prisotnost virusa mogoče dokazati tudi do 160 dni po infekciji. Za dokaz prisotnosti protiteles uporabljamo test ELISA. Uporabni so kompetitivni ali blok testi ELISA, pri katerih se uporablja monoklonalna protitelesa proti proteinu VP7. V jamice mikroplošče je vezan virusni protein VP7.

Serološka karakterizacija BTV

Večje število različnih serotipov virusa BTV je ugotovil že Neitz leta 1948, ko je testiral večje število izolatov iz različnih področij sveta z navzkrižno imunizacijo. Danes je poznanih 25 različnih serotipov. V diagnostiki in preventivi je zelo pomembna določitev tipa virusa, ker se na osnovi tega uporabi najustreznejše cepivo.

Razširjenost BTV

Izven Afrike je bila bolezen najprej dokazana na Cipru leta 1943. Po drugi svetovni vojni se je bolezen pojavila na Portugalskem, v Španiji, in sicer serotip 10. BTV je razširjen tudi v Aziji, Afriki in Avstraliji. Potrjena je bila tudi v Ameriki. Prisotnost BTV je vezana na vektorje, tako da se smatra, da se ti vektorji nahajajo znotraj geografskega pasu od 40 ° severno do 35 ° južne geografske širine. Leta 2006 so prvič dokazali BTV virus na Nizozemskem, od tu se je bolezen razširila v Nemčijo, Belgijo, Francijo in druge države Evrope. Potrdili so prisotnost serotip BTV 8, ki do takrat ni bil nikoli dokazan v Evropi. Do zdaj je bilo v Evropi ugotovljenih najmanj 8 različnih serotipov; serotipi 1, 2, 49 in 16 so bili ugotovljeni v Sredozemlju, serotipi 6, 8 in 11 pa v centralni Evropi. V Sloveniji te bolezni še nismo dokazali.



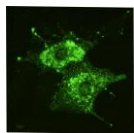
Slika 94: Prikaz področij, kjer se v Evropi pojavljajo posamezni serotipi virusa BTV

Vrsta: Virus afriške konjske kuge (angl. African horse sickness virus)

Na okužbo z virusom afriške konjske kuge so občutljivi vsi kopitarji, vendar smrtnost, tudi do 90-odstotno, povzroči le pri konjih. Opisanih je 9 različnih serotipov. Serotip je determiniran na osnovi antigenskih razlik na zunanjem proteinu VP2 in VP5. Genom virusa afriške konjske kuge (AKK) sestavlja 10 segmentov linearnih dvojnovijačnih molekul RNA. Segmenti so obdani z ikozaedralno kapsido, ki daje pod elektronskim mikroskopom dvoslojni videz. Virus je po zgradbi podoben virusu BTV. Najpomembnejši vektor v prenosu okužbe iz bolne na zdravo žival so insekti. Primarna replikacija poteka v limfatičnem tkivu, virus se raznese po krvi. Afiniteto ima zlasti do endotelnih celic krvnih žil, zaradi tega se pojavijo številne hemoragije. Viremija je pri konju prisotna od 4 do 8 dni, pri mulah in oslih pa tudi več kot en mesec. Klinično se obolenje kaže v različnih oblikah: srčna, respiratorna mešana in vročična oblika. Pri srčni obliki se poleg povišane telesne temperature pojavijo hudi edemi po glavi, okončinah, hemoragije po jeziku in kolike. Do 50-odstotkov konj pogine. Pri pljučni obliki ugotavljajo do 95-odstotno smrtnost. ugotavljajo pri pljučni obliki. Pri tej obliki se ob povišani telesni temperaturi pojavi kašelj, močno znojenje, oteženo dihanje, progresivna pljučnica in pogin. Pri mešani obliki je smrtnost do 70-odstotna. Klinično se bolezen kaže v obliki pojava edemov in hudih respiratornih simptomov. Inkubacija traja od 3 do 5 dni. Pojavi se močno povišana telesna temperatura, intenzivno znojenje in pogini.

V prenos in ohranjanje bolezni so vključene enake vrste insektov kot pri BTV, in sicer *Culicoides immitis*, *C. variipennis*, *C. obsoletus*. Virus so dokazali tudi pri nekaterih vrstah muh in pri klopah. Povzročitelj AKK se razmnožuje tudi v insektih in se prenaša transovarialno. Določen odstotek okuženih konj ostane trajni nosilec virusa. Poznan je tudi transplacentarni prenos iz okužene matere na žrebeta. Trenutno AKK ni prisotna v Evropi. Do zdaj so opisani izbruhi v Španiji, Italiji in na Cipru, vendar so bolezen izkoreninili. Bolezen se zaradi intenzivnega prometa lahko zanese v Evropo bodisi z okuženimi konji bodisi z insekti.

V diagnostiki uporabljamo metodo RT-PCR za dokaz virusnega genoma in test ELISA za dokaz specifičnih protiteles proti virusu AKK.

**Drugi orbivirusi:**

Virus enzootske hemoragične bolezni (angl. *enzootic hemorrhagic disease*) je primarno patogen za jelena. Povzroča do 100-odstotno smrtnost. Z blagimi simptomi te bolezni oboleva tudi govedo. Pojavlja se v Afriki, Izraelu in Turčiji.

Ibaraki virus: je patogen za goveda. Povzroča respiratorna obolenja. Razširjen je na Japonskem in v jugovzhodni Evropi.

Rod Rotavirus

Rotavirusi so prisotni pri vseh vrstah domačih živali. So pogojno patogeni. Ugotovili so jih v fecesu v času diareje. Klinična slika bolezni se pri vseh živalih kaže v milejši ali hujši obliki diareje, ki prizadene zlasti mlade živali. Nekateri humani sevi rotavirusov so močno sorodni rotavirusom prašičev. Razmnožujejo se v enterocitih črevesja, zaradi česar je motena resorbcija.

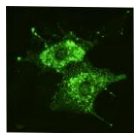
Pod elektronskim mikroskopom so videti v obliki kolesa, od tod tudi njihovo ime (lat. *rota*, kolo). Genom rotavirusov je bogat z baznimi pari A—T. Sestavlja ga 11 odsekov dvovijačne linearne RNA. Vsak odsek kodira en protein, kar pomeni, da so vsi geni monocistranski. Označevanje proteinov se v literaturi razlikuje od oznak reovirusov; tu imamo oznake VP in številka (*viral protein*). Odseki genoma se med seboj razlikujejo, največji je odsek 1. Skupna značilnost odsekov je, da se na 5' koncu nukleotidno zaporedje začne z gvanilatom, sledi nekodirajoči del, ki je zelo ohranjen, nato sledi bralni okvir, ki kodira en protein. Konča s stop kodonom. Vsak odsek se na 3' koncu konča s citidinom.

Genom kodira 11 proteinov, od tega jih je 6 strukturnih, označenih s kratico VP. Nestrukturnih proteinov je 5.

Odsek gena	Produkt gena	Lokacija proteina
1	VP1	sredica
2	VP2	sredica
3	VP3	sredica
4	VP4	zunanji sloj kapside
5	NSP1	nestrukturni protein
6	VP6	notranji sloj kapside
7	NSP2	nestrukturni protein
8	NSP3	nestrukturni protein
9	VP7	zunanji sloj kapside
10	NSP4	nestrukturni protein
11	NSP5, NSP6	nestrukturni protein

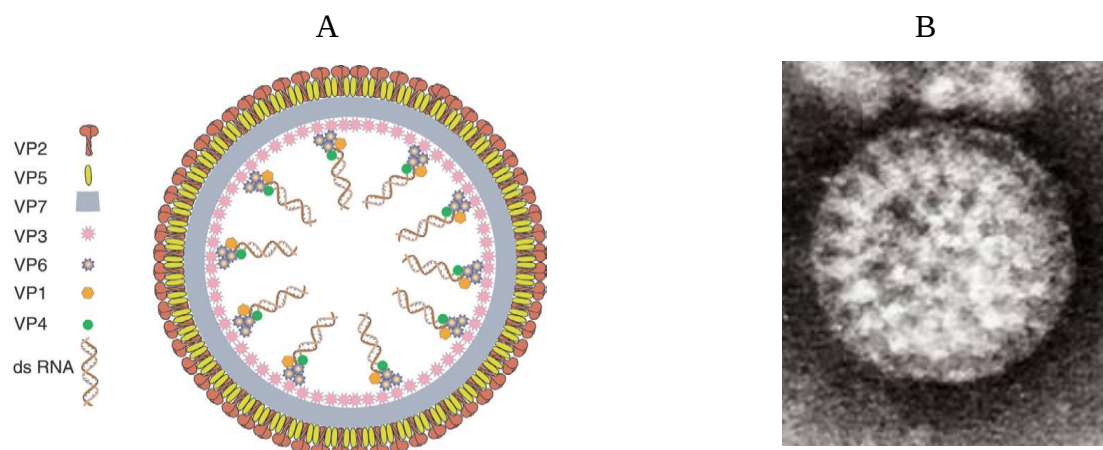
Preglednica 14: Proteini pri rotavirusih.

Protein VP1 se nahaja na notranjem delu kapside. Kapsido sestavljata še proteina VP2 in VP3. Protein VP1 ima encimsko aktivnost. Je od RNA odvisna polimeraza RNA. Aktivira se skupaj z



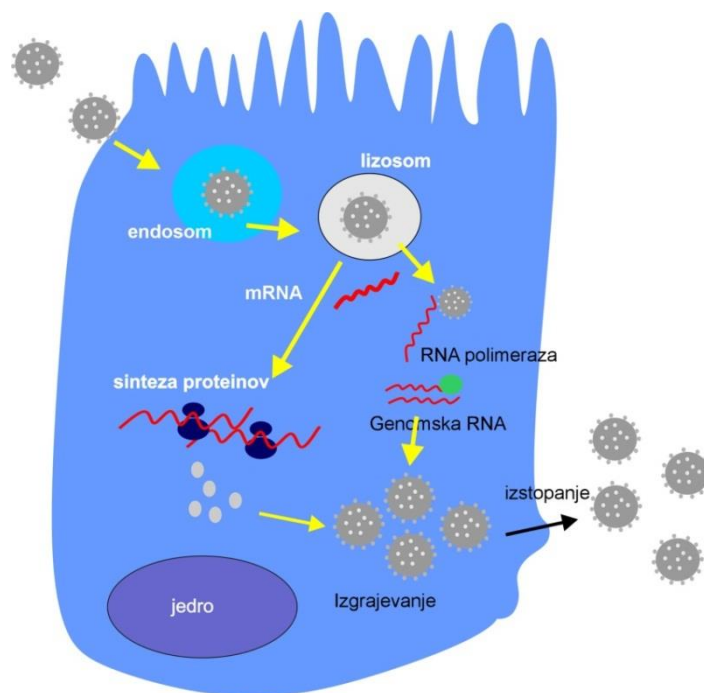
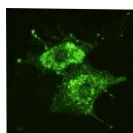
Hostnik P: Izbrana poglavja iz veterinarske medicine

VP2. Protein VP4 ima hemaglutinacijske lastnosti. Tvori peplomere, ki štrlijo izven kapside. Pomemben je kot antigen, sproži tvorbo nevtralizirajočih protiteles. Ta protein je ključen za infektivnost virusa. Tripsin ga cepi v dva produkta, in sicer VP5 in VP8, ki sta nujna za vezavo virusa na celico. Prav tako je tudi močno imunogen protein VP6. Glede na antigenske lastnosti rotavirusov delimo v 7 skupin z oznakami A, B, C, D, E, F in G. Zelo pomemben je VP7, ki se med posameznimi sevi razlikuje. Na osnovi antigenih razlik poznamo 14 serotipov. Rotavirusi so izjemno heterogeni. Največ je proteina VP6.



Slika 95: Shematski prikaz rotavirusov (A) in elektronsko mikroskopski posnetek (B)
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Rotavirus>, 24.03.2012)

Pomnoževanje rotavirusov se začne z vezavo virusa na celico. Pri tem sodelujeta proteina VP4 in VP7. Virus vstopi v celico z endocitozo. Slačenje virusa poteka z encimi v lizosomu. Po slačenju se že v endosomu aktivira od RNA odvisna polimeraza RNA (protein VP2), ki sintetizira virusno mRNA. Ta se sprosti v citoplazmo. Sintetizirana mRNA ima tudi vlogo matrice za sintezo dvovijačne RNA z virusno od RNA odvisno RNA-polimerazo. Ta sinteza genoma poteka v viroplazmi. Ob sintezi strukturnih proteinov se v citoplazmi celice nakopičijo proteini VP1, VP2 in VP3, kar imenujemo viroplazma, v katero se uvedejo segmenti virusnega genoma. Zorenje virusa poteka v endoplazmatskem retikulumu, tu pridobi ovojnico. Virus se sprosti, povzroči lizo celične stene in se s tem tudi sprosti v medceličnino.



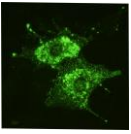
Slika 96: Pomnoževanje rotavirusov v citoplazmi enterocitov; vstop virusa v celico z endocitozo, v endosomu kapsida delno razpade, VP4 sintetizira mRNA, translacija poteka na prostih ribosomih. mRNA ima tudi vlogo matrice za genomsko dvovijačno RNA. Združevanje strukturnih proteinov in genoma poteka v viroplazmi. Nestrukturna proteina NSP4 in NSP7 se sintetizirata na ribosomih endoplazmatskega retikuluma. Virus se sprosti z lizo celice.

Rotavirusna kapsida je zgrajena iz treh proteinskih slojev. Zelo so stabilni pri pH med 3 in 9, v iztrebkih pri temperaturah do 20 °C tudi več mesecev.

Rotavirusi povzročajo enterične infekcije ljudi in živali. Rotavirusi so virusi brez ovojnice, vsebujejo kapsido in segmentiran dvojnovijačni genom RNA. Genom gradi dvojnovijačna RNA, ki je razdeljena v 11 segmentov, od katerih jih šest kodira strukturne proteine (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 in VP7) in pet nestrukturnih proteinov (NSP1-5). Trije strukturni proteini VP1-3 so vezani na genom. Na osnovi razlik proteina VP6 je rod razdeljen v 5 vrst (rotavirus A–E), znotraj posameznih vrst pa se nahaja več genotipov. Vrste od A do C lahko okužujejo človeka in živali, medtem ko so vrste od D do G našli le pri živalih. Zunanjo kapsido gradi 132 kapsomer, ki jo gradijo proteini VP4 in VP7. Nevtralizacijska protitelesa se vežejo na ta dva proteina, VP4 in VP7, na osnovi tega je tudi osnovana klasifikacija izolatov. Serotipi z oznako P so vezani na razlike v genu za protein VP4, razlike v proteinu VP7 pa označujejo s črko G. Tako znotraj vrste A poznamo 14 serotipov G in 14 serotipov z oznako P. Rotaviruse so ugotovili tako pri človeku kot pri različnih domačih živalih. Vrstna specifičnost posameznega izolata je vezana na strukturo proteina VP6. Vrsta rotavirus A se najpogosteje pojavlja pri ljudeh. Pri govedu so ugotovili 6 različnih genotipov vrste G, v 80 % so ugotovili prisotnost vrste rotavirus G tip G6 in tudi tip G4, G8, G10, G11 in G12.

Veliko humanih sevov je zelo podobnih ali enakih sevom, ugotovljenih pri prašičih, govedu in mačkah, tako da rotavirusne infekcije prištevamo med zoonoze.

Incubacijska doba ne traja dlje od 24 ur po okužbi, ki je običajno po peroralni poti. Ker se virus namnoži v epitelih celicah tankega črevesja, se obolenje kaže v obliki diareje. Prizadete so zlasti mlade živali v dobi do 8 tednov po rojstvu. Pomembno zaščitno vlogo pred infekcijo imajo protitelesa IgA, ki se razvijejo po okužbi.



Dodatni študijski vir.

- Schwartz-Cornil I, Mertens PPC, Contreras V, et al. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity, Vet Res 2008; 39(5): e 46 (16 str.)