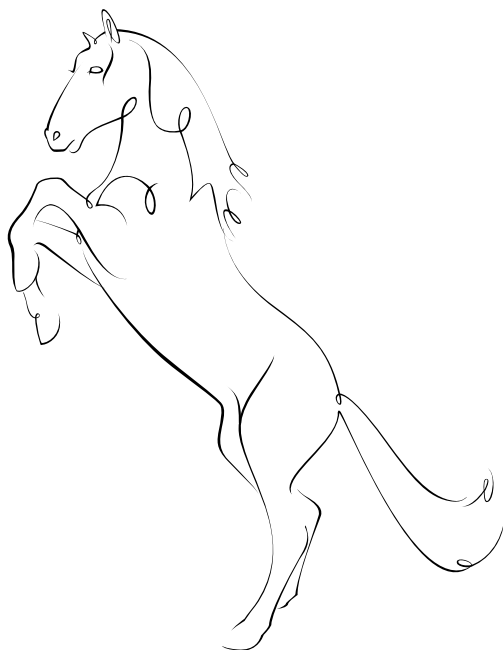


**UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ
BIOMEDICINE**

Sara Mankoč

**MOLEKULARNO-EPIDEMIOLOŠKE IN
BIOLOŠKE ZNAČILNOSTI
VIRUSOV KUŽNEGA ARTERITISA
KOPITARJEV**

Doktorska disertacija



Ljubljana, 2010

**UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ
BIOMEDICINE**

UDK 631.1.09:616.13-002:578.76:577.2:611-013.1(043.3)

Sara Mankoč, dr. vet. med.

**MOLEKULARNO-EPIDEMIOLOŠKE IN
BIOLOŠKE ZNAČILNOSTI
VIRUSOV KUŽNEGA ARTERITISA
KOPITARJEV**

Doktorska disertacija

**MOLECULAR-EPIDEMIOLOGICAL AND
BIOLOGICAL CHARACTERISTICS
OF EQUINE ARTERITIS VIRUSES**

Doctoral thesis

Ljubljana, 2010

Sara Mankoč

**MOLEKULARNO-EPIDEMIOLOŠKE IN BIOLOŠKE ZNAČILNOSTI VIRUSOV
KUŽNEGA ARTERITISA KOPITARJEV**

Doktorska disertacija je zaključek Interdisciplinarnega podiplomskega študija biomedicine, s področja veterine. Delo je bilo opravljeno v viroloških laboratorijih na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Mentorica: izr. prof. dr. Darja Barlič - Maganja
Univerza na Primorskem, Visoka šola za zdravstvo Izola

Somentor: izr. prof. dr. Peter Hostnik
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo
in parazitologijo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Jože Grom
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo
in parazitologijo

Član: prof. dr. Marjan Kosec
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Klinika za reprodukcijo
in konje

Članica: prof. dr. Tatjana Avšič Županc
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo
in imunologijo

Datum zagovora: _____

Izjavljam, da je predložena doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorandka: Sara Mankoč

KAZALO VSEBINE

Kazalo vsebine	5
Kazalo slik	12
Kazalo tabel	15
Kazalo prilog	16
Okrajšave in simboli	17
Izvleček	22
Abstract	24
1. UVOD	27
<i>1.1 RAZISKOVALNI PROBLEMI, NAMEN DELA, CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE</i>	28
1.1.1 Serološke preiskave	29
1.1.2 Molekularne preiskave	30
1.1.2.1 Dokaz virusa EAV v semenu žrebcev	30
1.1.2.2 Dokaz virusa EAV v brisih sečnice	30
1.1.3 Molekularna epidemiologija virusa EAV	30
1.1.4 Biološke značilnosti slovenskih izolatov virusa EAV	32
2 PODATKI IZ LITERATURE	34
<i>2.1 KUŽNI ARTERITIS KOPITARJEV</i>	34
<i>2.2 VIRUS KUŽNEGA ARTERITISA KOPITARJEV</i>	34
2.2.1 Taksonomska uvrstitev	34
2.2.2 Morfologija in fizikalno-kemijske značilnosti	36
2.2.3 Molekularna biologija virusa EAV	38
2.2.4 Strukturni proteini	45
2.2.5 Glavni nevtralizacijski epitopi	52

2.2.6 Evolucija kvazivrste EAV (<i>angl. quasispecies EAV</i>) in populacijska biologija virusov z RNA	53
2.2.7 Genska in antigenska variabilnost virusa EAV	58
2.2.8 Biološke značilnosti virusa EAV	62
 <i>2.3 EPIZOOTIOLOŠKE ZNAČILNOSTI VIRUSA EAV</i>	67
 2.3.1 Prenos virusa EAV	70
 <i>2.4 PATOGENEZA IN PATOMORFOLOŠKE SPREMEMBE PRI OKUŽBI Z VIRUSOM EAV</i>	72
 <i>2.5 KLINIČNA SLIKA KAK</i>	75
 <i>2.6 IMUNSKI ODZIV NA OKUŽBO Z VIRUSOM EAV</i>	76
 <i>2.7 PREPREČEVANJE ŠIRJENJA KAK</i>	78
 2.7.1 Imunoprofilaksa	79
2.7.2 Ukrepi	81
 <i>2.8 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB Z VIRUSOM EAV</i>	82
 2.8.1 Posredno dokazovanje virusa EAV s serološkimi metodami	83
2.8.2 Neposredno dokazovanje virusa EAV	84
2.8.2.1 Izolacija virusa EAV v celični kulturi	84
2.8.2.2 Dokazovanje virusa EAV z molekularnimi metodami	86
2.8.2.3 PCR v realnem času (<i>angl. real-time PCR</i>)	89
 3. MATERIALI IN METODE	99
 <i>3.1 MATERIALI</i>	99
 3.1.1 Konji	99
3.1.1.1 Serumski vzorci	99
3.1.1.2. Vzorci semena	100
3.1.1.3 Brisi sečnice	100
3.1.1.4 Moda	100
3.1.2 Celice	101

3.1.3 Virusi	101
3.1.4 Gojišča	102
3.1.4.1 Gojišče za dostavo vzorcev v virološki laboratorij	202
3.1.4.2 Gojišča za klasične virološke metode	202
3.1.4.3 Bakterijska gojišča za molekularno kloniranje	204
3.1.5 Plazmidi	105
3.1.6 Začetni oligonukleotidi in sonde	105
3.1.6.1 Dokazovanje nukleinske kisline virusa EAV	105
3.1.6.2 Genotipizacija virusa EAV	107
3.1.6.3 Sekvenciranje produktov RT-PCR	108
 3.2 METODE	 110
 3.2.1 Priprava celičnih kultur	 110
3.2.1.1 Razmnoževanje celične linije RK-13	110
3.2.1.2 Celična kultura RK-13 za izolacijo virusa EAV v celični kulturi	111
3.2.1.3 Suspenzija celic RK-13 v vzdrževalnem gojišču z 2 odstotkoma FBS za nevtralizacijski test (NT)	111
3.2.2 Namnoževanje referenčnega seva Bucyrus v celični kulturi RK-13	111
3.2.3 Dokazovanje protiteles proti virusu EAV	114
3.2.3.1 Nevtralizacijski test (NT)	114
3.2.4 Molekularne metode za dokazovanje nukleinske kisline virusa EAV v semenu	116
3.2.4.1 Izolacija celokupne RNA z reagentom TRIzol®	117
3.2.4.2 Metoda reverzne transkripcije s sledečo verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR) ali klasična metoda RT-PCR	118
3.2.4.3 »Semi-nested« PCR	119
3.2.4.4 Analiza produktov RT-PCR in produktov »semi-nested« PCR	120
3.2.4.5 RT-PCR-ELISA	121
3.2.4.6 Kloniranje in določanje nukleotidnih zaporedij za gena ORF1b in ORF7	124
3.2.4.6.1 Čiščenje produktov RT-PCR	124
3.2.4.6.2 Kloniranje produktov RT-PCR v plazmid pCR®4-TOPO®	125
3.2.4.6.3 Transformacija bakterij <i>E.coli</i> (One Shot® TOP10)	125
3.2.4.6.4 Izolacija plazmida z vstavljenim specifičnim produktom RT-PCR	126
3.2.4.6.5 Določanje nukleotidnega zaporedja	127
3.2.4.6.6 Analize nukleotidnih zaporedij	128
3.2.4.7 RT-PCR v realnem času za pomnoževanje odseka v nukleokapsidnem genu (ORF7)	131
3.2.4.7.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sonde MGB	131
3.2.4.7.2 RT-PCR v realnem času	132
3.2.4.7.3 Obdelava rezultatov	133
3.2.4.7.4 Določanje meje detekcije	134

3.2.4.7.5 Določanje učinkovitosti pomnoževanja	135
3.2.4.8 Primerjava molekularnih metod za detekcijo odseka v nukleokapsidnem genu (ORF7)	135
3.2.5 Molekularne metode za dokazovanje virusa EAV v brisih sečnice in vzorcih semena	136
3.2.5.1 Izolacija celokupne RNA	136
3.2.5.1.1 Izolacija z reagentom TRIzol®	137
3.2.5.1.2 Izolacija s kompletom NucleoSpin® RNA II	137
3.2.5.1.3 Izolacija s kompletom QIAamp® Viral RNA Mini Kit	138
3.2.5.1.4 Izolacija s kompletom MagMax™ Viral RNA Isolation Kit	140
3.2.5.2 Dokazovanje odseka v genu za nukleokapsido (ORF7)	142
3.2.5.2.1 Klasična metoda RT-PCR	142
3.2.5.2.2 RT-PCR v realnem času	143
3.2.5.3 Molekularna analiza vzorcev semena in brisov pri posameznih perzistentnih in domnevnih izločevalcih virusa EAV	145
3.2.6 Molekularna epidemiologija virusa EAV	145
3.2.6.1 Genotipizacija virusa EAV	145
3.2.6.1.1 Filogenetska analiza ORF5	147
3.2.6.1.2 Evolucija kraških sevov virusa EAV iz reje A	153
3.2.7 Določevanje bioloških značilnosti slovenskih izolatov virusa EAV	156
3.2.7.1 Rast virusa EAV v celični kulturi RK-13	156
3.2.7.1.1 Metoda izolacije virusa EAV iz semena z vzdrževalnim gojiščem	156
3.2.7.1.2 Metoda izolacije virusa EAV iz semena z gojiščem, ki vsebuje 0,75 odstotka soli CMC	159
3.2.7.1.3 Metoda izolacije virusa EAV z gojiščem, ki vsebuje 1 odstotek agaroze tipa VII	161
3.2.7.2 Kinetika rasti izolatov virusa EAV v celični kulturi RK-13	162
3.2.7.2.1 Spremljanje rasti izolatov virusa EAV	162
3.2.7.2.2 Spremljanje živosti celic RK-13	162
3.2.7.3 Dokazovanje virusa EAV v modih	164
3.2.7.4 Nevtralizacija kraškega izolata (087-02) virusa EAV	165
 4. REZULTATI	 167
 4.1 SEROLOŠKE PREISKAVE	 167
 4.1.1 Serološke preiskave zasebnih rej	 167
4.1.2. Serološke preiskave živali v reji A	170
4.1.2.1 Okvirna časovna opredelitev prve okužbe z virusom EAV pri posameznih žrebcih	175
4.1.2.2 Okvirna časovna opredelitev okužbe z virusom EAV pri plemenskih kobilah	178

4.2 MOLEKULARNE PREISKAVE	180
4.2.1 Dokaz genoma virusa EAV v semenu žrebcev	180
4.2.1.2 Vpeljava in primerjava klasičnih metod PCR	181
4.2.1.2.1 Pomnoževanje odseka v genu za polimerazo (ORF1b)	184
4.2.1.2.2 Pomnoževanje odseka v genu za nukleokapsido (ORF7)	187
4.2.1.2.3 Primerjava občutljivosti klasičnih metod RT-PCR za pomnoževanje ORF1b in ORF7	188
4.2.1.3 RT-PCR-ELISA	188
4.2.1.3.1 Hibridizacija s produkti pomnoževanja odseka v genu za polimerazo (ORF1b)	188
4.2.1.3.2 Hibridizacija s produkti pomnoževanja odseka v genu za nukleokapsido (ORF7)	190
4.2.1.4 Določanje nukleotidnih zaporedij odsekov v genih ORF1b in ORF7	190
4.2.1.4.1 Nukleotidna zaporedja odseka v genu za polimerazo (ORF1b)	190
4.2.1.4.2 Nukleotidna zaporedja odseka v genu za nukleokapsido (ORF7)	191
4.2.1.5 Analize nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij	192
4.2.1.5.1 Odsek v genu za polimerazo (ORF1b)	192
4.2.1.5.2 Odsek v genu za nukleokapsido (ORF7)	196
4.2.1.6 Ugotavljanje evolucijskih odnosov med sevi virusa EAV	199
4.2.1.6.1 Filogenetska analiza ORF1b	199
4.2.1.6.2 Filogenetska analiza ORF7	203
4.2.1.7 RT-PCR v realnem času za pomnoževanje odseka v nukleokapsidnem genu	205
4.2.1.7.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sonde MGB	205
4.2.1.7.2 Določanje nukleinske kisline virusa EAV v vzorcih semena	206
4.2.1.7.3 Meja detekcije in učinkovitost pomnoževanja odseka genoma referenčnega seva Bucyrus	208
4.2.1.8 Primerjava molekularnih metod za detekcijo odseka v ORF7	208
4.2.2 Dokaz genoma virusa EAV v brisih sečnice	210
4.2.2.1 Primerjava metod za izolacijo in dokazovanje RNA referenčnega seva Bucyrus	210
4.2.2.1.1 Klasična metoda RT-PCR	210
4.2.2.1.2 RT-PCR v realnem času	211
4.2.2.1.3 Primerjava klasične metode RT-PCR in RT-PCR v realnem času	212
4.2.2.2 Dokazovanje virusa EAV v semenu in brisih sečnice pri perzistentnih izločevalcih	212
4.2.2.3 Dokazovanje virusa EAV v semenu in brisih sečnice pri domnevnih izločevalcih	217
4.2.2.4 Sekvenciranje produktov RT-PCR	219
4.3 MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA VIRUSA EAV	220
4.3.1 Filogenetska analiza ORF5	220
4.3.2 Analiza aminokislinskih zaporedij variabilnega področja V₁ v GP₅	226
4.3.3 Evolucija kraških sevov virusa EAV iz reje A	228
4.3.3.1 Analiza nukleotidnih zaporedij ORF5	228

4.3.3.2 Analiza aminokislinskih zaporedij GP ₅	232
4.3.3.2.1 Napoved antigenskih determinant in sekundarne strukture glikoproteina GP ₅	234
4.4 BIOLOŠKE ZNAČILNOSTI SLOVENSКИH IZOLATOV VIRUSA EAV	239
4.4.1 Rast virusa EAV v celični kulturi RK-13	239
4.4.1.1 Izolacija virusa EAV iz semena	239
4.4.1.1.1 Vzorci semena žrebcev pasme lipicanec iz reje A na slovenskem Krasu	239
4.4.1.1.2 Vzorci semena žrebcev različnih pasem iz zasebnih rej	242
4.4.1.2 Testiranje vzorcev semena in serumov z nevtralizacijskim testom	242
4.4.1.3 Izolacija virusa EAV iz semena v celični kulturi RK-13 z gojiščem, ki vsebuje CMC	245
4.4.1.4 Izolacija virusa EAV v celični kulturi RK-13 z gojiščem, ki vsebuje agarozo tipa VII	250
4.4.2 Kinetika rasti izolatov virusa EAV v celični kulturi RK-13	252
4.4.2.1 Spremljanje rasti izolatov virusa EAV	252
4.4.2.2 Spremljanje živosti celic RK-13	254
4.4.3 Dokazovanje virusa EAV v modih	256
4.4.4 Nevtralizacija kraškega izolata (087-02) virusa EAV	258
5. RAZPRAVA IN SKLEPI	260
5.1 RAZPRAVA	260
5.1.1 Serološke preiskave	260
5.1.2 Molekularne preiskave	263
5.1.2.1 Dokaz virusa EAV v semenu žrebcev	263
5.1.2.2 Dokaz virusa EAV v brisih sečnice	273
5.1.3 Molekularna epidemiologija	276
5.1.4 Biološke značilnosti slovenskih izolatov virusa EAV	287
5.2 SKLEPI	296
6. POVZETEK (SUMMARY)	301
6.1 POVZETEK	301
6.2 SUMMARY	307

7. ZAHVALA	313
8. VIRI	315
9. PRILOGE	345

Kazalo slik

Slika 2-1: Sorodstveni odnosi med virusi iz reda <i>Nidovirales</i> .	35
Slika 2-2: Elektronsko mikroskopski posnetek viriona virusa EAV.	37
Slika 2-3: Model predvidene sekundarne strukture na 3' koncu genoma.	39
Slika 2-4: Splošna shema pomnoževanja genoma virusa EAV.	40
Slika 2-5: Na sliki je prikazano področje prekrivanja genov ORF1a/ORF1b z »drsnim zaporedjem« in stop kodonom ter navzdol ležeči strukturi steblo-zanka.	41
Slika 2-6: (A) Struktura sg mRNA smiselne (+) (bela) in protismiselne (-) verige RNA (črna).	42
Slika 2-7: Proteolitično procesiranje replikaznega poliproteina pp1ab.	44
Slika 2-8: Struktura DMV, ki ima notranjo in zunanjo membrano.	45
Slika 2-9: Grafična predstavitev viriona virusa EAV.	46
Slika 2-10: Shematska predstavitev trodimenzionalne strukture tetramera AB-CD.	46
Slika 2-11: Shematska predstavitev interakcij med dvema dimeroma proteinov N.	47
Slika 2-12: Heterodimer GP ₅ /M.	49
Slika 2-13: Enostaven prikaz Hammingovih sekvenčnih prostorov.	54
Slika 2-14: Predstavitev kvazivrste na zelo poenostavljen način.	45
Slika 2-15: Shematski prikaz učinka ozkega grla »bottleneck effect«.	55
Slika 2-16: Predstavitev Wrightove adaptacijske pokrajine v obliki topografske karte.	56
Slika 2-17: Razlike v morfologiji in velikosti plakov med tremi različnimi sevi virusa EAV (ATCC, KY84 in CA95).	65
Slika 2-18: Prenos virusa EAV.	72
Sliki 2-19 A in B: Histopatološke spremembe arterij mišičnega tipa pri žrebčku s KAK.	73
Slika 2-20: Shematska predstavitev prekrivanja emisijskega in absorpcijskega spektra pri FRET.	91
Slika 2-21: Potek PCR v realnem času z metodo detekcije s sondo TaqMan®.	93
Slika 2-22: Kemijska struktura CDPI ₃ .	94
Slika 2-23: Shematska predstavitev dvojne vijačnice DNA.	95
Slika 2-24: Shematski prikaz strukture sonde MGB in vezave sonde na tarčno DNA.	96
Slika 2-25: Pomnoževalni diagram v linerani obliki, ki prikazuje osnovne izraze pri PCR v realnem času.	97
Slika 3-1: Shematski prikaz prileganja začetnih oligonukleotidov in sond na genom referenčnega seva Bucyrus.	107
Slika 3-2: Plazmid pCR®4-TOPO® in njegove lastnosti.	208
Slika 3-3: Princip metode RT-PCR-ELISA.	122
Slika 3-4: Struktura tetrazolijeve soli (MTS) in njen produkt iz formazana.	163
Slika 4-1: Grafični prikaz rezultatov testiranj z NT v obdobju od leta 2002 do leta 2007.	167
Slika 4-2: Serumski vzorci žrebcev iz zasebnih rej v obdobju od leta 2002 do leta 2007.	168
Slika 4-3: Grafikon prikazuje število serološko pozitivnih plemenskih žrebcev pri posameznih pasmah.	169
Slika 4-4: Število serološko pozitivnih žrebcev po pasmah.	169
Slika 4-5: Serumski vzorci kobil iz zasebnih rej v obdobju od leta 2002 do 2007.	170
Slika 4-6: Grafični prikaz rezultatov seroloških testiranj v reji A v obdobju od leta 2002 do leta 2007.	171
Slika 4-7: Prikaz serološko pozitivnih živali in primerjava med spoloma.	172
Slika 4-8: Odstotek serološko pozitivnih živali po starostnih razredih v reji A leta 2002.	173
Slika 4-9: Odstotek serološko pozitivnih živali po starostnih razredih v reji A leta 2003.	173
Slika 4-10: Odstotek serološko pozitivnih živali po starostnih razredih v reji A leta 2004 in 2005.	174
Slika 4-11: Odstotek serološko pozitivnih živali po starostnih razredih v reji A leta 2006.	174
Slika 4-12: Odstotek serološko pozitivnih živali po starostnih razredih v reji A leta 2007.	175
Slika 4-13: Primer elektroforetske ločitve produktov pomnoževanja z RT-PCR in začetnima oligonukleotidoma EAV7/EAV8.	184
Slika 4-14: Primer elektroforetske ločitve produktov pomnoževanja z RT-PCR in začetnima oligonukleotidoma EAV11/EAV12.	185
Slika 4-15: Poravnava nukleotidnih zaporedij v odseku gena za polimerazo, kamor se prilega začetni oligonukleotid EAV8.	186

Slika 4-16: Primer elektroforetske ločitve produktov pomnoževanja z RT-PCR in začetnimi oligonukleotidi EAV7.53F/EAV7.256R in EAV7.53F/12664N.	187
Slika 4-17: Primer primerjave dveh kromatogramov nukleotidnih zaporedij slovenskega seva EAV iz vzorca semena 990-03.	191
Slika 4-18: Nukleotidno zaporedje seva SLOpol22 iz GenBank v formatu FASTA.	191
Slika 4-19: Poravnava nukleotidnih zaporedij kloniranega produkta RT-PCR, ki smo ga z začetnima oligonukleotidoma EAV7.53F in 12664N pomnožili iz vzorca semena 990-03.	192
Slika 4-20: Primerjava delnih nukleotidnih zaporedij ORF1b slovenskih sevov virusa EAV.	193
Slika 4-21: Poravnava prevedenih aminokislinskih zaporedij nsp11 in nsp12.	195
Slika 4-22: Napoved sekundarne strukture aminokislinskih sekvenc SLOpol1c (levo) in Bucyrus (desno) s programom PSIPRED v2.6.	196
Slika 4-23: Primerjava delnih nukleotidnih zaporedij ORF7 slovenskih sevov virusa EAV.	198
Slika 4-24: Grafa prikazujeta razlike med posameznimi pari nukleotidnih zaporedij, ki so nastale zaradi tranzicij in transverzij na prvem in drugem mestu v kodonih (levo) in na tretjem mestu v kodonih (desno).	199
Slika 4-25: Nekoreninjeno filogenetsko drevo (ORF1b) smo izdelali po metodi neighbor-joining (NJ).	200
Slika 4-26: Nekoreninjeno filogenetsko drevo (ORF1b) smo izdelali po metodi Fitch-Margoliash (FM).	201
Slika 4-27: Nekoreninjeno filogenetsko drevo (ORF7) smo izdelali po metodi neighbor-joining (NJ).	203
Slika 4-28: Poravnava delnih nukleotidnih zaporedij ORF7.	205
Slika 4-29: Primerjava molekularnih metod za dokazovanje razredčin nukleinske kisline referenčnega seva Bucyrus (prikazane so logaritemske vrednosti razredčin celokupne RNA od -1 do -7).	209
Slika 4-30: Elektroforetska ločitev produktov RT-PCR iz serije sedmih desetkratnih razredčin celokupne RNA (prikazane so logaritemske vrednosti razredčin od -1 do -7) v 1,8-odstotnem agaroznem gelu.	211
Slika 4-31: Standardne linearne krivulje iz rezultatov RT-PCR v realnem času, ki smo jih dobili za serijo razredčin celokupne RNA (prikazane so logaritemske vrednosti razredčin od -1 do -7), izolirane iz referenčnega seva Bucyrus s tremi metodami.	211
Slika 4-32 od A do J: Primerjava klasične metode RT-PCR in RT-PCR v realnem času za dokazovanje virusne RNA, ki smo jo iz vzorcev semena in vzorcev brisov sečnice PI izolirali z različnimi metodami za izolacijo celokupne RNA.	213
Slika 4-33: Primerjava RT-PCR v realnem času in klasične metode RT-PCR.	215
Slika 4-34: Primerjava RT-PCR v realnem času in klasične metode RT-PCR.	216
Slika 4-35 od A do C: Primerjava klasične metode RT-PCR in RT-PCR v realnem času za dokazovanje virusne RNA, ki smo jo iz vzorcev semena in vzorcev brisov sečnice domnevnih izločevalcev izolirali z različnimi metodami za izolacijo celokupne RNA.	217
Slika 4-36: Dokaz produktov RT-PCR (340 bp) v 1,8-odstotnem agaroznem gelu.	218
Slika 4-37: Dendrogram na osnovi 228 nukleotidov dolgih zaporedij odseka v ORF7 virusa EAV, S-seme in UB-bris sečnice.	219
Slika 4-38: Filogenetsko drevo odseka v ORF5 po metodi povezovanja sosedov (NJ), 1000 samovzorčenj.	223
Slika 4-39: Filogenetsko drevo odseka v ORF5 po Bayesovi metodi.	224
Slika 4-40: Drevo največjega verjetja (ML), 1000 samovzorčenj.	225
Slika 4-41: Primerjava prevedenih aminokislinskih zaporedij dela ohranjenega področja C ₁ in variabilnega področja V ₁ v GP ₅ sevov virusa EAV iz različnih genetskih skupin in neuvrščenih sevov.	227
Slika 4-42: Filogram nukleotidnih zaporedij ORF5 kraških izolatov virusa EAV.	228
Slika 4-43: Kromatogrami odseka v genu ORF5 virusa EAV iz vzorca semena 261-06.	231
Slika 4-44: Primerjava napovedi antigenskih lastnosti glikoproteina GP ₅ za izolate virusa EAV iz različnih genetskih skupin in za neuvrščene izolate SM-02, SM-03 in S1.	234
Slika 4-45: Napovedi antigenskih lastnosti glikoproteina GP ₅ za kraške seve virusa EAV.	236
Slika 4-46: Ohranjenost elementov sekundarne strukture (vijačnice α in strukture β), ki smo jo za vsako aminokislinsko zaporedje napovedali s programom PSIPRED.	237
Slika 4-47: Napoved sekundarne strukture glikoproteina GP ₅ iz poravnave aminokislinskih zaporedij z metastrežnikom Jpred 3.	238
Slika 4-48: Dokazovanje produktov RT-PCR v agaroznem gelu.	241
Slika 4-49: Rezultat pomnoževanja RNA izolirane iz vzorcev semena PI 068 (prvi in drugi odvzem) in RNA izolirane iz celičnih kultur, v katerih se je razmnoževal izolat 068-05.	241

Slika 4-50: Rezultat pomnoževanja z RT-PCR v realnem času.	245
Slika 4-51: Prikaz celične kulture RK-13 deseti dan po inokulaciji vzorcev semena na ravni svetlobne mikroskopije.	246
Slika 4-52: Prikaz celične kulture RK-13 deseti dan po inokulaciji vzorcev semena na ravni svetlobne mikroskopije.	247
Slika 4-53: Prikaz celične kulture RK-13 deseti dan po inokulaciji vzorca semena BG-07 in referenčnega seva Bucyrus na ravni svetlobne mikroskopije.	248
Slika 4-54: Rezultati reakcije RT-PCR s parom začetnih oligonukleotidov EAV7.53F/12644N (ORF7) so bili pozitivni za vse izolate virusa EAV.	249
Slika 4-55: Rezultati pomnoževanja z RT-PCR v realnem času.	250
Slika 4-56: Primeri tvorbe plakov v celični kulturi RK-13.	251
Slika 4-57: Primerjava rasti med referenčnim sevom Bucyrus in slovenskim izolatom 087-02.	253
Slika 4-58: Neokužena devet dni stara kontrolna celična kultura RK-13.	255
Slika 4-59: Izolat virusa EAV iz mod.	256
Slika 4-60: Dokaz virusa EAV pri žrebcu 282 z metodo RT-PCR.	257
Slika 4-61: Kužni arteritis kopitarjev, modo žrebca 282, hematoksilin in eozin, slikano pri 10-kratni povečavi, puščica označuje obsežno infiltracijo limfocitov.	257
Slika 4-62: Serološki odziv na referenčni sev Bucyrus in izolat 087-02 po cepljenju z vakcino Arvac®.	259

Kazalo tabel

Tabela 3-1: Začetni oligonukleotidi in sonde, njihova nukleotidna zaporedja in mesto v genomu ter metoda za detekcijo ORF1b.	106
Tabela 3-2: Začetni oligonukleotidi in sonde, njihova nukleotidna zaporedja in mesto v genomu ter metoda za detekcijo ORF7.	106
Tabela 3-3: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje ORF5.	107
Tabela 3-4: Seznam različnih sevov virusa EAV, ki smo jih uporabili v filogenetskih analizah delnih nukleotidnih zaporedij za ORF1b.	128
Tabela 3-5: Seznam različnih sevov virusa EAV, ki smo jih uporabili v filogenetskih analizah delnih nukleotidnih zaporedij za ORF7.	129
Tabela 3-6a: Seznam devetindvajsetih sevov virusa EAV, ki jih uvrščamo v genetsko skupino EAV-1.	148
Tabela 3-6b: Seznam sedemindvajsetih sevov virusa EAV, ki jih uvrščamo v genetsko skupino EAV-2.	149
Tabela 3-6c: Seznam štiriindvajsetih sevov virusa EAV, ki jih uvrščamo v genetsko skupino EAV-3.	150
Tabela 3-6d: Seznam osemnajstih sevov virusa EAV, ki jih ne uvrščamo v nobeno od treh genetskih skupin.	151
Tabela 3-7: Lastnosti gojitvenih posod za celično kulturo, ki smo jih uporabili pri izvajanju metode izolacije virusa EAV v celični kulturi RK-13.	160
Tabela 4-1: Rezultati seroloških testiranj žrebcev, pri katerih smo v vzorcih semena virus EAV dokazali z molekularnimi metodami.	176
Tabela 4-2: Rezultati seroloških testiranj žrebcev, pri katerih v vzorcih semena virusa EAV z molekularnimi metodami nismo dokazali.	177
Tabela 4-3: Rezultati seroloških testiranj kobil, ki so jih pripuščali pod PI in/ali žrebce, v semenu katerih virusa EAV nismo dokazali.	179
Tabela 4-4: Dokazovanje genoma virusa EAV v semenu PI iz reje A.	180
Tabela 4-5: Dokazovanje genoma virusa EAV v semenu domnevnih izločevalcev iz reje A.	180
Tabela 4-6: Rezultati dokazovanja odseka v genu za polimerazo (ORF1b) z metodo RT-PCR, »semi-nested« PCR in testom RT-PCR-ELISA.	182
Tabela 4-7: Rezultati dokazovanja odseka v genu za nukleokapsido (ORF7) z metodo RT-PCR, testom RT-PCR-ELISA in RT-PCR v realnem času.	183
Tabela 4-8: Rezultati pomnoževanja odseka v ORF7 z RT-PCR v realnem času.	207
Tabela 4-9: Primerjava nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij.	221
Tabela 4-10: Razlike med zaporedji ORF5 pri sevih virusa EAV iz reje A.	230
Tabela 4-11: Primerjava nukleotidnih zaporedij ORF5 in aminokislinskih zaporedij GP ₅ .	233
Tabela 4-12: Titer nevtralizacijskih protiteles proti virusu EAV v serumu in semenu žrebcev iz reje A.	243
Tabela 4-13: Titer nevtralizacijskih protiteles proti virusu EAV v serumu in semenu žrebcev iz zasebnih rej.	244
Tabela 4-14: Seznam žrebčkov iz reje A, ki so bila cepljena proti KAK.	258

Kazalo prilog

Priloga A: Izvidi viroloških preiskav vzorcev semena iz reje A, ki smo jih poslali v analizo v laboratorij Dr. Böse GmbH (Harsum, Nemčija).	345
Priloga B: Razporeditev žrebcev iz reje A po posameznih boksih v hlevu NHL.	346
Priloga C: Genetske razdalje med homolognimi virusi EAV, ki smo jih določili v zaporednih vzorcih semena žrebcev iz reje A.	347
Priloga D: Testiranje ničelne hipoteze L_0 o molekularni uri s testom razmerja dveh verjetij (LRT (Δ) – »likelihood ratio test«), ki se porazdeljuje po hi-kvadrat porazdelitvi (χ^2_α).	348
Priloga E: Hitrost evolucije, ki smo jo na podlagi evlucijskega modela HKY pri vseh 39 kraških zaporedij ORF5 ugotovili s programom Beast v1.4.8.	350
Priloga F: Izvirni znanstveni članek, ki je bil objavljen v reviji Journal of Virological Methods, Vol. 146/1-2 (2007) 341-54.	351

Okrajšave in simboli

»semi-nested« PCR	polvgnezdna PCR
3' UTR	3' nekodirajoče področje »3' untranslated region«
3CLSP	serinska proteolitična domena »3C-like serine proteinase«
5' UTR	5' nekodirajoče področje »5' untranslated region«
A	adenin
Å	Ångstrom, enota za merjenje dolžine, ki je enaka 0,1 nm
aa	aminokislina »amino acid«
ABC	metoda za dokazovanje virusnih antigenov z imunskim kompleksom avidin-biotin »avidin-biotin, glucose-oxidase complex«
AEC	peroksidazni substrat, 3-amino-9-etilkarbazol
AMV	virus ptičje mieloblastoze »Avian Myeloblastosis Virus«
BEV	»Berne virus«
BHK	celična linija iz hrčkovih ledvičnih celic »baby hamster kidney cells«
BHQ	nefluorescenčni dušilec »black hole quencher«
BI	Bayesova statistika »Bayesian inference«
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin »bovine serum albumin«
BVDV	virus bovine virusne diareje »bovine viral diarrhoea virus«
C	citozin
CCD	»charge-coupled device«
CD8+ T	celica T ubijalka, citotoksična celica
cDNA	komplementarna DNA »complementary DNA«
CDPI ₃	1,2-dihidro-(3 <i>H</i>)-pirolo[3,2- <i>e</i>]indol-7-karboksilat
CMC	karboksimetilceluloza »carboxymethyl-cellulose«
CO	mejna vrednost »cut off«
CP2	cisteinska proteinazna domena
CPE	citopatski efekt
CsCl	cezijev klorid
Ct	točka, v kateri pride do dviga signala fluorescence poročevalske molekule nad vrednostjo praga, ki se izraža v številu ciklov »cycle threshold«
DEPC	dietilpirokarbonat
DIVA	po cepljenju z vakcino DIVA je mogoča serološka diskriminacija med cepljenimi in naravno okuženimi živalmi »differentiating infected from vaccinated animals«
DMV	vezikularna struktura z dvojno membrano »double-membrane vesicle«
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleozid trifosfat

dsDNA	dvojnovijačna DNA »double-stranded DNA«
dUTP	deoksiuridintrifosfat
E	neglikoziliran membranski protein virusa EAV, učinkovitost pomnoževanja z RT-PCR v realnem času »efficiency«
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAV	virus kužnega arteritisa kopitarjev »equine arteritis virus«
<i>EcoR</i> I	restriksijska endonukleaza, ki so jo izolirali iz seva R bakterij <i>E. coli</i>
EDTA	etilendiaminotetraočetna kislina
EHV-1	konjski herpes virus tipa 1, povzročitelj virusnega zvržavanja kobil »equine abortion virus«
EHV-4	konjski herpes virus tipa 4, povzročitelj konjskega rinopnevmonitisa »equine rhinopneumonitis virus«
ELISA	encimsko imunski test »enzyme-linked immunosorbent assay«
EM	mutantni sev, ki je rezistenten na nevtralizacijo s protitelesi »escape mutant«
ER	endoplazemski retikulum
EVA	kužni arteritis kopitarjev »equine viral arteritis«
FAM	6-karboksi-fluorescein
FBS	fetalni goveji serum »fetal bovine serum«
FRET	fluorescenčni resonančni prenos energije »fluorescence resonance energy transfer«
G	gvanin
g	rcf, »relative centrifugal force«
GAV	»gill-associated virus«
GP _{2b}	membranski glikoprotein virusa EAV
GP ₃	membranski glikoprotein virusa EAV
GP ₄	membranski glikoprotein virusa EAV
GP ₅	poglavitni glikoziliran strukturni protein virusa EAV
HcoV-229E	humani koronavirus-229E »human coronavirus-229E«
HEL	helikazna domena
HIV-1	človeški virus imunske pomanjkljivosti, tip 1 »Human Immunodeficiency Virus«
HK	celična linija iz konjskih ledvičnih celic »primary horse kidney cells«
HKY	»Hasegawa, Kishino and Yano« model nukleotidne substitucije
hLRT	test razmerja verjetij »Hierarchical likelihood ratio test«
I	delež nevariabilnih mest
IBV	virus kužnega bronhitisa perutnine »infectious bronchitis virus«
ICTV	Mednarodni odbor za taksonomijo virusov »International Committee for the Taxonomy of Viruses«
IFN	interferon
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M

IL	interlevkin
IRES	zaporedja v virusnem genomu in sg mRNA, na katera se veže ribosom »internal ribosome entry sites«
K2P	Kimurov dvoparametrični model nukleotidne substitucije
Ka	število nesinonimnih nukleotidnih zamenjav na nesinonimno mesto
KAK	kužni arteritis kopitarjev
kDa	kilodalton, 1000 daltonov, en dalton ustreza masi enega vodikovega atoma
Ks	število sinonimnih nukleotidnih zamenjav na sinonimno mesto
KV	koeficient variacije
LB	gojišče Luria-Bertani
LDV	»lactate dehydrogenase-elevating virus«
ln	naravni logaritem
log	desetiški logaritem
LRT	test razmerja verjetij »likelihood ratio test«
M	membranski protein virusa EAV, molarnost (mol/l), standard DNA velikosti 100 bp
MAB	monoklonsko protitelo
MCMC	Markovske verige »Markov chain Monte Carlo«
MEM	»minimum essential media«
MGB	triciklična organska molekula, ki se veže v mali žleb dvojne vijačnice DNA »minor groove binder«
MHC-I	poglavitni histokompatibilnostni kompleks razreda I
ML	metoda največjega verjetja »maximum likelihood«
mRNA	informacijska RNA
N	protein nukleokapside virusa EAV
Na-EDTA	natrijeva sol etilendiaminotetraoetne kisline
NBL-6/ED	celična linija iz konjskih dermalnih celic »equine dermis cells«
NCBI	»National Centre for Biotechnology Information«
NendoU	endoribonukleaza »urydilate-specific endoribonuclease«
NFQ	nefluorescenčni dušilec »non fluorescent quencher«
NJ	metoda povezovanja sosedov »neighbor-joining«
NK	naravna celica ubijalka »natural killer cell«
nm	nanometer, enota za merjenje dolžine, ki je enaka 10^{-9} m
nsp	nestrukturni protein »nonstructural protein«
NT	nevtralizacijski test »virus neutralisation (VN) test«
nt	nukleotid
NTC	»no template control«
obr	obrat
OD	optična gostota »optical density«
OIE	Mednarodna organizacija za zdravje živali »World Organisation for Animal Health«

ORF	bralni okvir »open reading frame«
PBS	fosfatni pufer »phosphate buffered saline«
PCP	cisteinska proteinaza papainskega tipa »papain-like cysteine protease«
PCR	verižna reakcija s polimerazo »polymerase chain reaction«
PDB	baza trodimenzionalnih struktur »Protein Data Bank«
PFU	plakotvorna enota »plaque-forming units«
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
PI	perzistentni (trajni) izločevalec »persistent shedder (PS)«
pp1a	replikazni poliprotein 1a
pp1ab	replikazni poliprotein 1ab
PRSSV	virus prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma »porcine reproductive and respiratory syndrome virus«
R	nukleotid A ali G
R ²	koeficient linearne regresije
RdRp	od RNA odvisna polimeraza RNA »RNA dependent RNA polymerase«
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov »restriction fragment length polymorphism«
RK	celična linija iz kunčjih ledvičnih celic »primary rabbit kidney cells«
RNA	ribonukleinska kislina
RT	reverzna transkripcija, sinteza cDNA, »reverse transcription«
RT-PCR	reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo »reverse transcription-polymerase chain reaction«
SD	standardni odklon
SDS	»sequence detection system«
sg mRNA	subgenomska informacijska RNA »subgenomic mRNA«
SHFV	»simian hemorrhagic fever virus«
SL	sekundarna struktura steblo-zanka »stem-loop structure«
S-S	kovalentna disulfidna vez
ssRNA+	enojno vijačna, pozitivno polarna RNA »positive-single stranded RNA«
T	timin
TAE	raztopina Trisa, acetata in EDTA
TAMRA	6-karboksi-tetrametil-rodamin
Taq	» <i>Thermus aquaticus</i> «
TCID ₅₀	50-odstotna infektivna doza »tissue culture infective dose 50 %«
Tfl	» <i>Thermus flavus</i> «
TGEV	virus vnetja želodca in črevesja pri prašičih »transmissible gastroenteritis virus«
Tm	temperatura tališča »melting temperature«
TMB	tetra-metil benzidin
TNF	tumor nekrotizirajoči faktor

TRS	zaporedje, ki regulira proces sinteze sg mRNA »transcription-regulating sequence«
TSR	»template supression reagent«
V ₁	imunodominantna regija virusa EAV
VB	velogeni sev Bucyrus
VEE	venezuelski konjski encefalitis »Venezuelan equine encephalitis«
Vero	celična linija iz levičnega epitela afriških zeleni opic »african green monkey kidney«
Y	nukleotid T ali C
ZBD	domena za vezavo cinka »zinc binding domain«
ZF	motiv cinkovega prsta ZF »zinc finger«
Γ	gama porazdelitev

Okrajšana imena aminokislin

Ime aminokisline	Enočrkovni zapis	Tričrkovni zapis
glicin	G	Gly
alanin	A	Ala
valin	V	Val
levcin	L	Leu
izolevcin	I	Ile
metionin	M	Met
fenilalanin	F	Phe
prolin	P	Pro
serin	S	Ser
treonin	T	Thr
cistein	C	Cys
asparagin	N	Asn
glutamin	Q	Gln
tirozin	Y	Tyr
triptofan	W	Trp
aspartat	D	Asp
glutamat	E	Glu
histidin	H	His
lizin	K	Lys
arginin	R	Arg

MOLEKULARNO-EPIDEMIOLOŠKE IN BIOLOŠKE ZNAČILNOSTI VIRUSOV KUŽNEGA ARTERITISA KOPITARJEV

Izvleček

Ključne besede: Konji; bolezni; virus kužnega arteritisa kopitarjev - genetika - klasifikacija; arteritis - diagnostika - virologija; sperma - virologija; molekularne diagnostične tehnike - metode; reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo - metode; filogeneza; konji

Izhodišče. Kužni arteritis kopitarjev je virusna bolezen, ki jo povzroča virus EAV. Naravni rezervoar virusa je kronično okuženi žrebec, ki lahko izloča virus EAV s semenom celo življenje. V reprodukcijskem traktu perzistentnega izločevalca soobstajajo variante virusa EAV (kvazivirsa), ki se razlikujejo po virulenci. Tveganje za pojav izbruha KAK je povezano s pojavom virulentnih variant virusa EAV. Zaradi velikega odstotka asimptomatskih perzistentnih izločevalcev, ki predstavljajo od 30 do 60 % vseh serološko pozitivnih žrebcev, je bistvenega pomena njihovo zgodnje odkrivanje in čimprejšnja genotipizacija sevov virusa EAV v semenu.

Namen dela. Poglavitni namen naše naloge je bil razvoj in vpeljava hitrih molekularnih metod za dokazovanje nukleinske kisline virusa EAV v semenu serološko pozitivnih žrebcev. V Slovenji podatka o razširjenost virusa EAV med žrebci doslej še ni bilo, zato je bil naš primarni cilj usmerjen v določanje genotipov virusa EAV in odkrivanje morebitnih novih genotipov ter ugotavljanju evlucijskih odnosov med njimi.

Metode. V prvem delu naloge smo z nevtralizacijskim testom pregledali 2898 serumskih vzorcev konjev iz zasebnih rej in 1170 serumskih vzorcev konjev pasme lipicanec iz reje A. Za pomnoževanje virusnega genoma v odseku ORF7 smo razvili metodo RT-PCR v realnem času. Občutljivost in zanesljivost omenjene metode smo primerjali s splošno razširjenimi molekularnimi metodami RT-PCR, »semi-nested« PCR in RT-PCR-ELISA. Metode smo testirali na 40 vzorcih semena, poleg tega pa smo preučili tudi možnost njihove uporabe za določanje virusne RNA v vzorcih brisov sečnice. Filogenetske odnose med sevi virusa EAV, ki krožijo v slovenskem prostoru, smo določili na podlagi nukleotidnih zaporedij odsekov v ORF1b, ORF7 in ORF5. Iz vzorcev semena žrebcev, pri katerih smo z molekularnimi metodami potrdili prisotnost virusne nukleinske kisline, smo s tradicionalnim postopkom

razmnoževanja virusa EAV v celični kulturi RK-13 z gojiščem s CMC izolirali viruse EAV. Posameznim izolatom virusa EAV smo opredelili biološke značilnosti.

Rezultati in zaključki. Prekuženost z virusom EAV smo ugotovili med konji iz zasebnih rej in konji pasme lipicanec iz reje A. Med vsemi primerjanimi metodami se je najbolje izkazala metoda RT-PCR v realnem času, ki je bila 100-krat bolj občutljiva od njene starejše različice, klasične metode RT-PCR. Združitev sevov virusa EAV iz reje A v monofiletsko skupino, ki je bila na vseh filogenetskih drevesih statistično zelo dobro podprta, potrjuje, da je genetska osnova sevov iz reje A izjemna v svetovnem merilu. Preučevani sevi iz reje A so se uspešno razmnoževali v celicah RK-13 le v gojišču s CMC. S testi *in vitro* smo slovenske seve iz reje A opredelili kot manj virulentne. Njihovo omejeno razmnoževanje v celični kulturi RK-13 smo prepoznali po manj izrazitem CPE.

MOLECULAR-EPIDEMIOLOGICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF EQUINE ARTERITIS VIRUSES

Abstract

Key words: *Horse diseases; arteritis virus, equine - genetics - classification; arteritis - diagnosis - virology; semen - virology; molecular diagnostic techniques - methods; reverse transcriptase polymerase chain reaction - methods; phylogeny; horses*

Background. Equine viral arteritis (EVA) is a viral disease caused by the equine arteritis virus (EAV). The natural reservoir of the virus is chronically infected stallion shedding the EAV through his semen throughout his life. In the reproductive tract of persistent shedder, the virus variants coexist (quasispecies) and they differ according to their virulence. The risk for an EVA outbreak is connected to the presence of virulent variants of the EAV. Due to a high percentage of asymptomatic persistent shedders representing between 30 to 60 % of all serologically positive stallions, their early detection and genotyping of the EAV strains in the semen is of utmost importance.

Goal. The main goal of our thesis was to develop and introduce fast molecular methods for detecting the nucleic acid of the EAV in the semen of serologically positive stallions. In Slovenia, the data on the range of EAV infection among stallions have not been available until now; therefore our primary objective was to determine the EAV genotypes and to detect any new genotypes as well as to establish evolution patterns among them.

Methods. In the first part of the thesis, we used the virus neutralisation test and examined 2898 serum samples of horses from private stud farms, and 1170 serum samples of horses belonging to the Lipizzan breed from the stud farm A. In order to detect the virus genome in the ORF7 region, we developed the real-time RT-PCR method. The sensitivity and reliability of the mentioned method was compared to the generally accepted RT-PCR, »semi-nested« PCR and RT-PCR-ELISA molecular methods. Methods were tested on 40 semen samples, additionally we studied the possibility of their use for determining the viral RNA in the urethral swab samples. Phylogenetic relationships among the EAV strains circulating in the area of Slovenia were determined on the basis of nucleotide sequences of the ORF1b, ORF7 and ORF5 viral genome regions. From semen samples in which the presence of viral nucleic

acid was detected by molecular methods, we attempted to isolate the EAV in RK-13 cell culture with CMC containing medium. Individual EAV isolates were defined their biological characteristics.

Results and conclusions. The seroprevalence of EAV infections among horses from private stud farms and Lipizzan horses from the stud farm A was determined. Among all of the comparative methods, the most successful method was the real-time RT-PCR method, which was by 100 times more sensitive from its older version, the classical RT-PCR method. Uniting the EAV strains from the stud farm A into a monophyletic group, which was very well statistically supported in all phylogenetic trees, confirms the fact that the genetic basis of strains from stud farm A is exceptional in the word-wide aspect. The studied strains from stud farm A successfully replicated in RK-13 cells only in a CMC culture medium. With the *in vitro* tests the Slovenian strains from stud farm A were defined as less virulent. Their limited replication in the RK-13 cell culture was recognized by the less distinctive CPE.

1. UVOD

Virus EAV je prisoten med kopitarji po vsem svetu (Paweska in Barnard, 1993; Timoney in McCollum, 1993).

Države, ki priredijo največ konjskih dirk (ZDA, Japonska in Združeni arabski emirati, Velika Britanija, Nova Zelandija), investirajo v razvoj konjereje velika finančna sredstva, zato so vzpostavile učinkovite ukrepe za nadzor, zatiranje in preprečevanje širjenja kužnega arteritisa kopitarjev (KAK) (Timoney in McCollum, 1993).

V ZDA so zadnji primer te virusne bolezni ugotovili leta 2006, ko se je v zvezni državi New Mexico pojavil izbruh KAK z abortusi pri kobilah pasme »quarter horse« (Timoney in sod., 2006), ki so jih umetno osemenili z okuženim zamrznjenim semenom (Holyoak in sod., 2008).

Čeprav se klinična oblika KAK z respiratornimi znaki in abortusi pri konjih v Evropi pojavlja sporadično (Eichorn in sod., 1995), iz rezultatov sero-epidemioloških analiz ocenjujejo, da število okuženih konjev iz leta v leto narašča (Glaser in sod., 1996).

Mednarodna organizacija za zdravje živali (OIE) je v zadnjem letu v Evropski skupnosti odkril kar nekaj primerov KAK z izraženo klinično sliko (Francija, Nemčija, Italija in Švica). S serološko diagnostiko so izbruh KAK septembra 2008 potrdili tudi v sosednji Republiki Hrvaški. V serumu konjev pasme lipicanec iz reje v Djakovem so dokazali protitelesa proti virusu EAV.

Med evropskimi državami se je zaradi pogostih primerov KAK, ki potekajo brez kliničnih znakov, v odnosu do nadzora KAK oblikovala polarizacija mnenj, ki se odraža tudi v razlikah v podatkih o prekuženosti z virusom EAV.

Na eni strani so države Zahodnega Balkana, ki KAK ne pripisujejo večjega pomena niti ob morebitnem pojavu bolezenskih znakov in zato tudi nimajo razvitih ustreznih informacijskih sistemov za prijavljanje živalskih bolezni.

Na drugi strani so Francija, Nemčija, Irska, Italija in Velika Britanija, ki so uzakonile zelo stroge samoregulativne ukrepe, ki so predpisani v kodeksu »Common Code of Practice for EVA« (Horserace Betty Levy Board, <http://www.hblb.org.uk/document.php?id=43>) in redno spremljajo pojav KAK. Rezultati njihovih sero-epidemioloških študij so pomemben vir natančnejših podatkov o prekuženosti z virusom EAV pri posamezni pasmi konj.

Od 10 do 70 % serološko pozitivnih žrebcev lahko ostane trajno okuženih z virusom EAV. Perzistentni izločevalci (PI) so naravni rezervoar virusa EAV in so potencialno nevarni za širjenje okužbe v čredi konj, saj lahko kontinuirano izločajo virus s semenom skozi celo življenje. Njihovo zgodnje odkrivanje je ključnega pomena za učinkovito in uspešno preprečevanje širjenja KAK. Okužba z virusom EAV pri PI poteka navadno subklinično, zato diagnozo KAK večkrat potrdimo le s serokonverzijo (Hullinger in sod., 1998; Patton in sod., 1999; Timoney in McCollum, 1993).

1.1 RAZISKOVALNI PROBLEMI, NAMEN DELA, CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE

V Sloveniji spremljamo epidemiologijo KAK že od leta 1993, ko smo pri žrebcih iz različnih rej prvič serološko dokazali okužbe z virusom EAV (Hostnik in Grom, 1996). Doslej smo za potrditev izločanja virusa EAV s semenom uporabljali metodo izolacije virusa EAV v celični kulturi RK-13 z običajnim vzdrževalnim gojiščem.

Dosedanja prizadevanja, da bi iz semena serološko pozitivnih žrebcev, pri katerih smo s klasično metodo RT-PCR potrdili prisotnost virusne nukleinske kisline, izolirali virus EAV, niso bila uspešna. V predhodni študiji (Mankoč in sod., 2002) smo iz osmih vzorcev semena uspešno namnožili le en izolat virusa EAV. Ta rezultat ne potrjuje mnenja, ki je razširjeno v strokovnih krogih, da je tradicionalna virološka metoda izolacije virusa EAV v celični kulturi bolj občutljiva kot molekularne diagnostične metode, zato je vodilni cilj našega raziskovalnega dela usmerjen v:

- ~ nadgradnjo obstoječe klasične virološke metode za izolacijo virusa EAV iz semena v celični kulturi RK-13;
- ~ uvajanje in razvoj novih molekularnih metod za identifikacijo PI med serološko pozitivnimi žrebci.

Znano je, da med perzistentno okužbo v reproduktivnih organih PI nastajajo nove genetske različice virusa EAV, ki se med seboj razlikujejo po virulenci (Hedges in sod., 1999). Bolj virulentni virusi EAV so »potencialni kandidati«, ki bi lahko povzročili izbruh KAK. Za obvladovanje KAK je zato primarnega pomena redno spremljanje genetskega spreminjanja virusa EAV na individualni ravni (pri posameznem PI).

Molekularna tipizacija, sekvenciranje in filogenetske analize, s katerimi lahko izsledimo izvor, ugotovimo razsežnost morebitnega izbruha KAK in sledimo globalni razširjenosti okužb z virusom EAV, so danes nepogrešljiva molekularno-epidemiološka orodja vsakega sodobnega virološkega laboratorija.

V Sloveniji molekularna epidemiologija virusa EAV še ni bila izvedena. V naši raziskavi bomo posamezne izolate virusa iz semena žrebcev različnih pasem tipizirali z molekularnimi metodami in tako dobili vpogled v razširjenost virusa EAV med žrebci v Sloveniji.

1.1.1 Serološke preiskave

Nameni naše raziskave:

- ~ Ugotovili bomo prekuženost z virusom EAV pri konjih različnih pasem v Sloveniji v obdobju od leta 1999 do leta 2007.
- ~ Ugotovili bomo, ali nevtralizacijska protitelesa v vzorcih semena vplivajo na izid izolacije virusa EAV v celični kulturi RK-13.

Cilji naše raziskave:

- ~ Rezultati seroloških analiz nam bodo služili za oceno starosti, pri kateri se konji lipicanske pasme iz reje A najpogosteje prvič okužijo z virusom EAV.
- ~ Poskušali bomo ugotoviti, kateri so najpogostejši načini prenosa virusa EAV med konji v reji A, in pojasniti povezavo med načinom okužbe in spolom.

Delovna hipoteza:

H1: V semenu PI so prisotna nevtralizacijska protitelesa, ki zavirajo razmnoževanje virusa EAV v celični kulturi RK-13.

1.1.2 Molekularne preiskave

1.1.2.1 Dokaz virusa EAV v semenu žrebcev

Nameni naše raziskave:

- ~ Vpeljali bomo klasično metodo RT-PCR. Specifičnost pomnoženih odsekov bomo potrdili z dodatnim pomnoževanjem z metodo »semi-nested« PCR in z oligonukleotidno sondo v encimsko imunskem testu RT-PCR-ELISA.
- ~ Slovenskim izolatom virusa EAV bomo določili delna nukleotidna zaporedja gena za polimerazo (ORF1b) in gena za nukleokapsido (ORF7).
- ~ Razvili bomo metodo RT-PCR v realnem času s sondo MGB, ki je v primerjavi s klasično sondo TaqMan krajša in omogoča večjo specifičnost RT-PCR v realnem času.

Cilji naše raziskave:

- ~ Ugotovili bomo, katera regija virusnega genoma je med različnimi sevi virusa EAV, vključno s slovenskimi, najbolj ohranjena in primerna za načrtovanje sonde MGB.
- ~ Določili in primerjali bomo občutljivost molekularnih metod.
- ~ Z molekularnimi metodami bomo dokazali prisotnost nukleinske kisline virusa EAV v semenu slovenskih žrebcev in tako določili perzistentne izločevalce.

Delovne hipoteze:

H1: Metoda RT-PCR v realnem času je bolj občutljiva kot ostale molekularne metode.

H2: V semenu slovenskih žrebcev se nahajajo genetsko pestre različice virusa EAV.

H3: Med serološkimi reaktorji bomo z molekularnimi metodami identificirali PI.

1.1.2.2 Dokaz virusa EAV v brisih sečnice

Nameni naše raziskave:

- ~ Molekularne metode za dokazovanje virusa EAV v brisih sečnice še niso bile uporabljene, zato bomo poskusili ugotoviti, katera izmed vpeljanih molekularnih metod bi bila najbolj primerna za pomnoževanje virusne nukleinske kisline.

- ~ Določili bomo najbolj učinkovito in v praksi najbolj uporabno metodo za izolacijo virusne nukleinske kisline iz brisov sečnice.

Cilji naše raziskave:

- ~ Ugotovili bomo, ali z molekularnimi metodami pri PI in domnevnih izločevalcih virus EAV dokažemo tudi v brisih sečnice.

Delovni hipotezi:

H1: V brisih sečnice lahko z molekularnimi metodami dokažemo virus EAV.

H2: Večji izkoristek celokupne RNA bomo dobili s komercialnim kompletom MagMax™ Viral RNA Isolation Kit, ki temelji na izolaciji nukleinskih kislin s paramagnetnimi delci.

1.1.3 Molekularna epidemiologija virusa EAV

Nameni naše raziskave:

- ~ Virusom EAV, ki jih bomo dokazali v semenu slovenskih žrebcev, bomo določili nukleotidna zaporedja v regiji ORF5, ki kodira pglavitni glikoprotein GP₅.
- ~ Na osnovi delnih nukleotidnih zaporedij za ORF5 bomo pripravili filogenetske odnose med sevi virusa EAV iz Slovenije in sevi, katerih nukleotidna zaporedja so dostopna v genski banki GenBank.
- ~ Primerjali bomo nukleotidna zaporedja ORF5 žrebcev iz iste reje (reja A) in iz vzorcev zaporednih odvzemov semena pri istem žrebcu.
- ~ Prevedena aminokislinska zaporedja GP₅ virusov EAV slovenskih žrebcev bomo primerjali s prevedenimi aminokislinskimi zaporedji virusov iz drugih geografskih področij.
- ~ Virusom EAV slovenskih žrebcev bomo napovedali antigenske lastnosti in sekundarno strukturo GP₅ in jih primerjali z antigenскими determinantami virusov iz drugih geografskih področij.

Cilji naše raziskave:

- ~ Raziskali bomo genetsko raznolikost sevov virusa EAV, ki krožijo v Sloveniji, in ugotovili, ali gre za že znane ali pa popolnoma nove genotipe.
- ~ Raziskali bomo genetsko raznolikost in evolucijo virusa EAV pri istem žrebcu iz reje A v določenem časovnem obdobju.
- ~ Podrobneje bomo raziskali poti širjenja in način okužbe z virusom EAV med žrebci iz reje A.
- ~ Ugotovili bomo hitrost molekulske evolucije ORF5 in vpliv selekcije na evolucijo ORF5.
- ~ Ugotovili bomo, ali med razmnoževanjem virusa pri perzistentnem žrebcu nastajajo nove različice virusa EAV s spremenjenimi aminokislinami na nevtralizacijskih mestih B, C in D.
- ~ Določili bomo, ali aminokislinske zamenjave vplivajo na sekundarno strukturo glikoproteina GP₅.

Delovne hipoteze:

H1: Pričakujemo, da so sevi virusa EAV v Sloveniji genetsko heterogeni.

H2: Znotraj iste reje so starejše, z virusom EAV okužene živali, vir okužbe za mlajše.

H3: Zaradi evolucije virusa EAV preko kvazivirte v semenu istega PI soobstajajo genetske različice virusa EAV, ki se med seboj razlikujejo po fenotipu.

1.1.4 Biološke značilnosti slovenskih izolatov virusa EAV

Nameni naše raziskave:

- ~ Klasično metodo izolacije virusa EAV iz semena bomo izpopolnili tako, da bomo za celično kulturo RK-13 uporabili vzdrževalno gojišče s karboksimetilcelulozo (CMC).
- ~ Kvantitativno (določitev titra, živosti celic RK-13), kvalitativno (opazovanje pojava in obsega poškodb celičnega sloja) in časovno bomo ovrednotili razmnoževanje izolatov virusa EAV in referenčnega virusa Bucyrus.
- ~ Primerjali bomo kinetiko rasti virusov EAV iz različnih genetskih skupin.
- ~ Izolate virusa EAV iz semena žrebcev iz reje A bomo razmnožili v celični kulturi RK-13 z gojiščem, ki vsebuje agarozo tipa VII, in izmerili premer plakov.

- ~ Premer plakov slovenskih izolatov bomo primerjali s premerom plakov, ki jih povzroča litično razmnoževanje virulentnega seva Bucyrus.
- ~ Pri cepljenih žrebčkih bomo določili protitelesa proti referenčnemu virusu Bucyrus in proti slovenskemu izolatu 087-02.

Cilji naše raziskave:

- ~ Ugotovili bomo, ali bo vzdrževalno gojišče s CMC povečalo učinkovitost klasične metode izolacije virusa EAV iz semena v celični kulturi RK-13.
- ~ Izolirali bomo virus EAV iz čim večjega števila vzorcev semena slovenskih žrebcev, v katerih bomo z molekularnimi metodami dokazali nukleinsko kislino virusa EAV.
- ~ Raziskali bomo biološke značilnosti virusov EAV iz različnih genetskih skupin.
- ~ Ovrednotili bomo povezavo med velikostjo plakov v celični kulturi RK-13 in virulenco virusa EAV.
- ~ Pri žrebčkih, ki bodo cepljena z vakcino Arvac, bomo preverili uspešnost in ugotovili učinkovitost cepljenja.

Delovne hipoteze:

H1: Nekateri izolati iz reje A virusa EAV so necitopatogeni.

H2: Pričakujemo, da bodo imeli plaki slovenskih izolatov virusa EAV manjši premer kot plaki referenčnega virusa Bucyrus, ki je patogen za konje.

2. PODATKI IZ LITERATURE

2.1 KUŽNI ARTERITIS KOPITARJEV (*EVA*, angl. *equine viral arteritis*)

Kužni arteritis kopitarjev (KAK) je nalezljivo, virusno obolenje konj, ki ga v preteklosti niso razlikovali od drugih obolenj s podobno klinično sliko. Bolezen je bila znana že v 19. stoletju, vendar so jo opisovali pod različnimi imeni, kot so: akutna septikemija, epizootski ali kužni celulitis, konjska influenza, »fièvre typhoïde du cheval«, »influenza erysipelatosae«, »Pferdestaupe«, »pink eye« in »Rotlaufseuche« (Bergman, 1913; Brion in sod., 1967; Clark, 1892; Mumford, 1985; Pottie, 1888).

Etiologija bolezni je bila prvič dokazana leta 1953, ko so med epidemijo abortusov v kraju Bucyrus (Zvezna država Ohio, ZDA) izolirali virus EAV iz pljuč abortiranega žrebčka (Bryans in sod., 1957a; Bryans in sod., 1957b). Za bolezen je značilno sistemsko vnetje žil, od koder je bolezen tudi dobila ime KAK.

Doslej so okužbe z virusom EAV ugotovili le pri ekvidih. Med naravne gostitelje virusa EAV prištevamo konje, osle, mule in zebre (Himeur, 1976; McCollum in sod., 1995; Moraillon in Moraillon, 1978; Paweska, 1994; Paweska in Barnard, 1993; Paweska in sod., 1995; Weiss in sod., 1995).

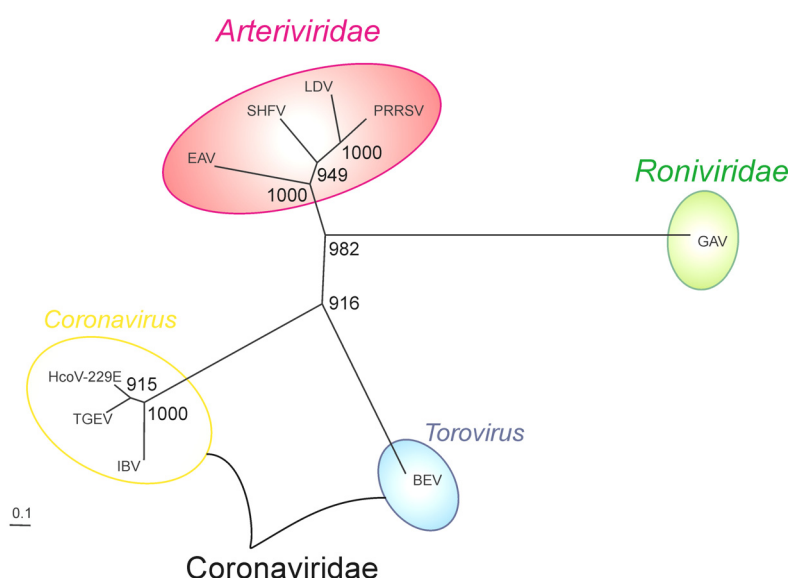
2.2 VIRUS KUŽNEGA ARTERITISA KOPITARJEV (*EAV*, angl. *equine arteritis virus*)

2.2.1 Taksonomska uvrstitev

Virus EAV so v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja sprva uvrstili med alfaviruse (Horzinek in sod., 1971) in flaviviruse (Bürki, 1970; Hyllseth, 1970). Kljub podobnim fizikalno-kemijskim in morfološkim lastnostim z virusi iz omenjenih skupin, so nadaljnje študije pokazale, da je bolj podoben virusom iz družine *Togaviridae* (Porterfield in sod., 1978). Vsak član te družine vsebuje enojnovijačno RNA, ki je pozitivno polarna (ssRNA⁺, angl. *positive-single stranded RNA*), lipidno ovojnico in ikozaedrično nukleokapsido (Westaway in sod., 1985). Ob omenjenih podobnostih ima virus EAV tudi povsem drugačne strukturne proteine (Zeegers in sod., 1976).

V začetku devetdesetih let je z razvojem molekularne virologije postalo jasno, da bo sistem klasifikacije virusov temeljil na primerjalnih sekvenčnih analizah in ne samo na obliki in sestavi nukleinskih kislin, prisotnosti ovojnice ter zgradbi in simetriji kapside. Na podlagi tehnik molekularne filogenetike so ugotovili, da obstaja med polimeraznimi geni koronavirusov, torovirusov, ronivirusov in arterivirusov jasen sorodstveni odnos. Analize aminokislinskih zaporedij so pokazale, da so posamezne domene njihovih replikaznih poliproteinov homologne in evolucijsko povezane (den Boon in sod., 1991; Snijder in sod., 1990). Ta med seboj sorodna področja se razlikujejo po dolžini aminokislinskih ostankov. Replikazni poliprotein 1ab šteje pri arterivirusih od 300 do 400 aminokislin, medtem ko je pri korona-, toro- in ronivirusih ta poliprotein dolg najmanj 6500 aminokislin (Pasternak in sod., 2006). Taksonomsko razvrstitev in evolucijsko povezavo med omenjenimi virusi so razrešili s filogenetskimi analizami domene od RNA odvisne polimeraze RNA (RdRp) (RdRp, *angl. RNA dependent RNA polymerase*), ki je poleg helikaze (HEL) ena izmed najbolj ohranjenih domen na poliproteinu 1ab. Filogenetsko drevo (Slika 2-1) prikazuje, da so si korona- in torovirusi podobni med seboj in se združujejo v svojo skupino, medtem ko roni- in arterivirusi predstavljajo bolj oddaljeni liniji znotraj nidovirusov (González in sod., 2003; Gorbalenya in sod., 2006).

Red: *Nidovirales*



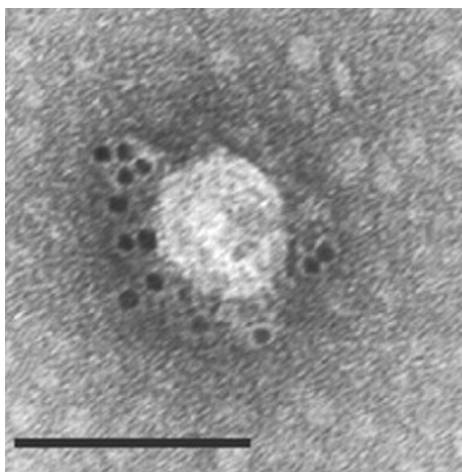
Slika 2-1: Sorodstveni odnosi med virusi iz reda *Nidovirales*. Filogenetsko drevo smo izdelali na podlagi aminokislinskih zaporedij domen RdRp različnih nidovirusov, z dostopnimi številkami (*angl. accession number*) iz podatkovne zbirke GenBank: virus EAV, sev Bucyrus (P19881); SHFV (*angl. simian hemorrhagic fever virus*) (Q68772); LDV (*angl. lactate dehydrogenase-elevating virus*), sev Plagemann (Q83017); PRSSV (*angl. porcine reproductive and respiratory syndrome virus*), sev Lelystad (Q04561); GAV (*angl. gill-associated virus*) (Q9WPZ7); BEV (*angl. Berne virus*) (P18458); IBV (*angl. infectious bronchitis virus*), sev Baudette (P26314); TGEV (*angl. transmissible gastroenteritis virus*), sev Purdue (Q9IW06) in HCoV-229E (*angl. human coronavirus-229E*) (Q9DLN1). Aminokislinska zaporedja smo poravnali s programom Muscle 3.6, filogenetsko drevo smo izdelali s programom Neighbor iz programskega paketa Phylip 3.66. Ustreznost topologije drevesa smo analizirali z metodo vezanja (*angl. seqboot*) s programom Seqboot.

Mednarodni odbor za taksonomijo ICTV (ICTV, *angl. International Committee for the Taxonomy of Viruses*) je leta 1996 virus EAV skupaj z virusom prašičjega reprodukcijskega in respiratornega sindroma PRSSV (*angl. porcine reproductive and respiratory syndrome virus*), virusom LDV (*angl. lactate dehydrogenase-elevating virus*) in virusom SHFV (*angl. simian hemorrhagic fever virus*) uvrstil v družino *Arteriviridae*, v rod *Arterivirus* (Cavanagh, 1997; Meulenbergh in sod., 1994; Pringle, 1996). Podobnost v organizaciji virusnega genoma, mehanizmi regulacije njegove ekspresije in strategija razmnoževanja so edinstveni genetski markerji, ki družine *Arteriviridae*, *Coronaviridae* in *Roniviridae* združujejo v red *Nidovirales* (Cavanagh, 1997; de Vries in sod., 1997). Taksonomsko ime reda izhaja iz načina pomnoževanja policistronskega genoma nidovirusov, za katerega je značilen nastanek številnih prekrivajočih se subgenomskih informacijskih RNA (sg mRNA, *angl. subgenomic mRNA*) in je latinskega izvora (*lat. nidus-gnezdo*) (de Vries in sod., 1990; Enjuanes in sod., 2000; McIntosh, 1974; Snijder in Horzinek, 1993; van Berlo in sod., 1982; van Berlo in sod., 1986a; Wege in sod., 1982).

2.2.2 Morfologija in fizikalno-kemijske značilnosti

Virioni virusov EAV (Slika 2-2) so sferične oblike z izometrično sredico, obdaja jih lipidna ovojnica, v katero so vgrajeni proteini (Snijder in Meulenbergh, 2001).

Velikost virionov je odvisna od načina čiščenja virusnih delcev in kontrastiranja. Po centrifugiranju v gradientu saharoze ali CsCl dobimo približno 50–60 nm velike virusne delce (Magnusson in sod., 1970). De Vries (1994) je s krioelektronsko mikroskopijo potrdil obstoj proteinov v obliki peplomerov na površini virusne ovojnice.



Slika 2-2: Elektronsko mikroskopski posnetek viriona virusa EAV. Merilo velikosti 100 nm. Povzeto po: Wieringa in sod. (2004).

Velikost virionov je odvisna od načina čiščenja virusnih delcev in kontrastiranja. Po centrifugiranju v gradientu saharoze ali CsCl dobimo približno 50–60 nm velike virusne delce (Magnusson in sod., 1970). De Vries (1994) je s krioelektronsko mikroskopijo potrdil obstoj proteinov v obliki peplomerov na površini virusne ovojnice.

Infektivnost virusa EAV je stabilna v območju vrednosti pH od 6 do 7,5. Na obstojnost virusa vpliva tudi temperatura. Pri temperaturi od –20 do –70 °C ostane virus EAV infektiven tudi več let (Crawford in Henson, 1973).

Višje temperature zmanjšujejo infektivnost virusa EAV. Pri 4 °C se infektivnost referenčnega seva Bucyrus v celični kulturi zmanjša za polovico v 75 dneh, pri 37 °C v od dveh do treh dneh in pri 56 °C v od 20 do 30 minutah (McCollum in sod., 1961). Če z virusom EAV okuženo žrebčevo seme hranimo v tekočem dušiku pri –196 °C, se biološka aktivnost virusa ohrani štiri mesece.

Virus EAV inaktivirajo tudi eter, kloroform (Bürki, 1965; Konishi in sod., 1975) in ultravijolični žarki (de Vries in sod., 1996).

Ker ima virus EAV lipidno ovojnico, ga z uporabo detergentov razgradimo. Če na virus delujemo z neionskimi detergenti (Nonidet P-40 in Triton X-100), 4M ureo ali 0,05 % saponini, razgradimo zunanjo virusno ovojnico in sprostimo nukleokapsido (Horzinek in sod., 1971).

2.2.3 Molekularna biologija virusa EAV

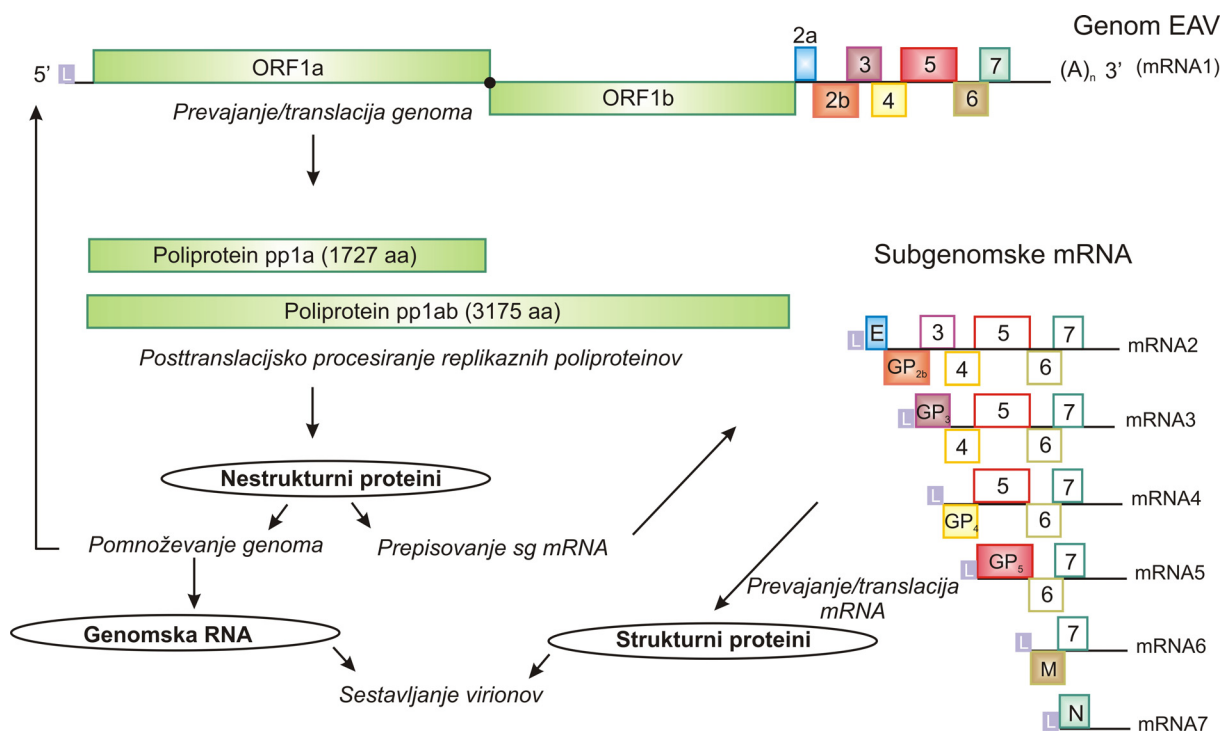
Struktura in organizacija genoma

Genom je linearna molekula pozitivno polarne enojnovijačne RNA, dolžine 12.700 nukleotidov (den Boon in sod., 1991). Prvi dokazi o tem, da je genom virusa EAV molekula RNA, so temeljili na poskusu Bürkija. Opazil je, da nukleozidni analog 5-jod-2'-deoksiuridin ne zavira razmnoževanja virusa (Bürki, 1965). Van der Zeijst in Horzinek (1975) sta ugotovila, da RNA iz prečiščenih virusov ni odporna proti cepitvi z ribonukleazami. To pomeni, da je RNA po delovanju ribonukleaz izgubila svojo infektivnost. Na ta način sta dokazala, da je genom virusa EAV kužen, saj deluje kot mRNA, ki se prevede v proteine.

Policistronski genom, ki je na 5' koncu pokrit z analogno obliko 5' kape, na 3' koncu pa ima poli-A rep (van Berlo in sod., 1982), vsebuje devet bralnih okvirjev (ORF, *angl. open reading frame*) (Snijder in Meulenberg, 1998; Snijder in Meulenberg, 2001). Približno tri četrtine genoma zajemata ORF1a in ORF1b, ki se nahajata na 5' koncu in nosita zapis za replikazna poliproteina pp1a in pp1ab (de Vries in sod., 1997; Snijder in Meulenberg, 1998; Snijder in Meulenberg, 2001). Poliproteina se sintetizirata s prevajanjem na osnovi kodirane informacije v genomski RNA. To sta prekurzorja, na katera delujejo virusne proteinaze, ki poliproteina razcepijo na 12 nestrukturnih proteinov (nsp, *angl. nonstructural protein*) (Snijder in Meulenberg, 1998; Zeiuhr in sod., 2000). Na ostali tretjini genoma si sledijo geni ORF2a, 2b, 3, 4, 5, 6 in ORF7, ki ležijo na 3' koncu genoma in nosijo zapis za sedem strukturnih proteinov E-GP_{2b}-GP₃-GP₄-GP₅-M-N (de Vries in sod., 1992; Zevenhoven-Dobbe in sod., 2004; Wieringa in sod., 2004). Strukturni proteini se sintetizirajo v procesu prevajanja iz šestih subgenomskih mRNA (sg mRNA). Na 5' koncu genoma se pred kodirajočo regijo nahaja 5' nekodirajoče področje (5' UTR, *angl. 5' untranslated region*), dolgo 224 nt, ki vsebuje signalna zaporedja, potrebna za regulacijo procesa prepisovanja in pomnoževanja genoma virusa EAV kot tudi sinteze sg mRNA (Tijms in sod., 2001). Pomnoževanje genoma virusa EAV se začne na nekodirajočem področju 3' konca genoma (3' UTR, *angl. 3' untranslated region*), kjer se nahaja sekundarna struktura steblo-zanka SL5 (SL, *angl. stem-loop structure*). V interakciji s SL4, ki je na proksimalnem 3' koncu ORF7, tvori psevdovozel (*angl. pseudoknot*) (Slika 2-3). Ta oblika interakcije med dvema sekundarnima strukturama ima regulatorno vlogo pri začetku sinteze virusne RNA, ki se najprej začne s

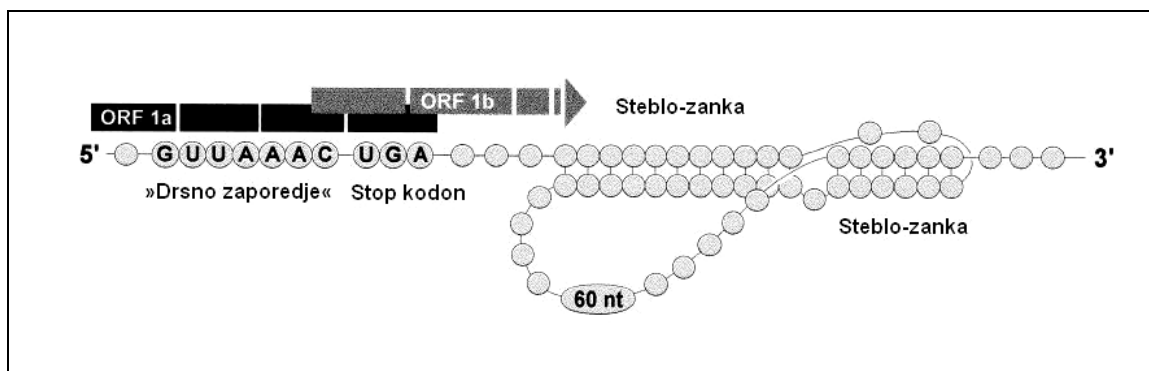
Pomnoževanje in prepisovanje genoma

Pomnoževanje genoma virusa EAV je kombinacija dveh procesov: pomnoževanja genomske RNA in prepisovanja z nastankom sg mRNA. Pomnoževanje je sinteza mRNA1, ki jo usmerja genomska RNA. Slednja deluje kot matrica, na podlagi katere od RNA odvisna polimeraza RNA (replikaza RNA) katalizira prepis RNA (mRNA1), ki je komplementaren genomski RNA (Slika 2-4).



Slika 2-4: 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 (sivo modra) 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 sg mRNA (mRNA2-mRNA7). Osnovna značilnost prepisovanja je sinteza sg mRNA, ki predstavljajo 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.

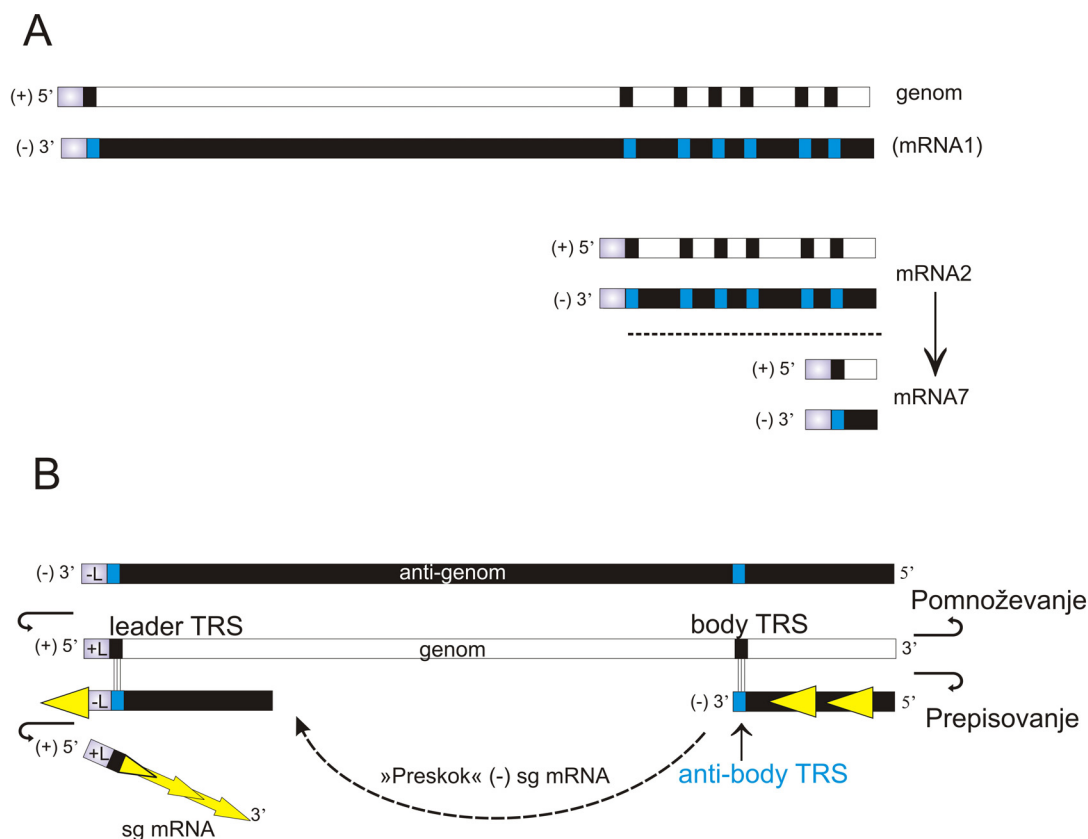
Pomnoževalni proces virusa EAV se najprej začne z izražanjem genov za pomnoževanje (replikaznih genov) ORF1a in ORF1b, ki se na genomske RNA delno prekrivata. Področje prekrivanja obeh genov ORF1a/ORF1b vsebuje »drsno« zaporedje GUUAAAC tik pred stop kodonom UGA gena ORF1a in navzdol ležeči strukturi steblo-zanka. To sta signala, ki omogočata, da prevajanje ORF1b poteka s premikom bralnega okvirja za 1 nt nazaj (-1) (Brierley in sod., 1995; den Boon in sod., 1991) (Slika 2-5).



Slika 2-5: Na sliki je prikazano področje prekrivanja genov ORF1a/ORF1b z »drsnim zaporedjem« in stop kodonom ter navzdol ležeči strukturi steblo-zanka. Povzeto po: Snijder in Meulenberg (1998).

V procesu prepisovanja se sintetizira šest sg mRNA (mRNA2-mRNA7) (Slika 2-4) (Snijder in Meulenberg, 1998). Posebnost teh subgenomskih prepisov je ta, da imajo na 5' koncu vodilno zaporedje (*angl. leader sequence*) (den Boon in sod., 1995), ki je identično zaporedju (207-212 nt) v genomu, 3' konec pa je pri posamezni sg mRNA sestavljen iz različno dolgega niza delno prekrivajočih se genov, ki predstavljajo »telo« sg mRNA (*angl. »body«*), in izvira iz 3' konca genoma.

Subgenomske mRNA se tvorijo s spajanjem vodilnega zaporedja in »telesca« med procesom abortivnega diskontinuiranega prepisovanja. Vsaka sg mRNA je strukturno policistronska (večgenska) z izjemo mRNA7. Po funkciji so monocistronske, saj se v protein prevede le 5' proksimalni gen iz »telesca« sg mRNA. Proces regulirajo zaporedja TRS (TRS, *angl. transcription-regulating sequence*), ki so prisotna na 3' koncu vodilnega zaporedja in pred začetkom vsakega strukturnega gena (Slika 2-6 A). Zaporedja TRS so pri virusu EAV sestavljena iz niza šestih nukleotidov 5'-UCAACU-3' (den Boon in sod., 1996; de Vries in sod., 1990). Parjenje baz smiselnega vodilnega zaporedja TRS v genomu s komplementarnimi bazami protismiselnega TRS iz »telesca« sg mRNA je pri virusu EAV ključnega pomena za sintezo sg mRNA (Pasternak in sod., 2001; Pasternak in sod., 2003; van Marle in sod., 1999). Stanley in Dorotea Sawicki (Sawicki in Sawicki, 1995) sta predstavila model prepisovanja nidovirusov, ki sta ga z biokemijskimi in genetskimi študijami tudi eksperimentalno potrdila in je za zdaj najboljši približek razmnoževanja nidovirusov *in vivo* (Pasternak in sod., 2001; Sawicki in sod., 2001). Na podlagi svojega modela predpostavljata, da se zaporedji TRS bazno parita v procesu nekontinuiranega prepisovanja med istočasno potekajočo kontinuirano sintezo negativno polarne genomske RNA (Slika 2-6 B).



Slika 2-6: (A) Struktura sg mRNA smiselne (+) (bela) in protismiselne (-) verige RNA (črna). Prikazane so: genomsko RNA (mRNA1), najdaljša (mRNA2) in najkrajša (mRNA7) sg mRNA. Smiselna (+) TRS zaporedja so označena s črno barvo, protismiselna (-) pa z modro. Vodilna zaporedja so označena z vijolično barvo. (B) Model diskontinuiranega prepisovanja nidovirusov (Sawicki in Sawicki, 1995). Genom arterivirusov je matrična veriga, ki se uporabi za sintezo (-) sg mRNA. Zaporedje (-) TRS v »telesu« sg mRNA je signal, ki nastajajoči verigi RNA omogoči »preskok« na 5' konec genoma. Sintetizira se (-) sg mRNA, ki je matrica za sintezo sg mRNA.

Translacijsko in posttranslacijsko procesiranje

Virusi s ssRNA⁺ so razvili izredno sofisticirane (post)translacijske kontrolne mehanizme za učinkovito regulacijo izražanja virusnega genoma. Ti mehanizmi vključujejo: od 5' kape neodvisno iniciacijo prevajanja na mestih IRES (IRES, *angl. internal ribosome entry sites*), premik bralnega okvirja in proteolitično procesiranje poliproteinskih prekurzorjev.

Prvi korak v razmnoževalnem ciklu virusa EAV je prevajanje ORF1a in ORF1b, ki nosita zapis za virusno replikazo. ORF1a se prevede v 187 kDa (1727 aa) velik poliprotein pp1a, medtem ko se ORF1b skupaj z ORF1a s premikom bralnega okvirja prevedeta v 345 kDa velik poliprotein (3175 aa) pp1ab (Slika 2-4). Poliproteina sta prekurzorja, ki jih tri virusne proteinaze (nsp1, nsp2 in nsp4) (Snijder in sod., 1992; Snijder in sod., 1995) med

avtokatalitičnim procesiranjem na enajstih mestih razcepijo v 12 nestrukturnih proteinov (nsp1-nsp12) (van Aken in sod., 2006; Ziebuhr in sod., 2000). Poliprotein pp1a se na sedmih mestih razcepi v številne vmesne produkte in 8 nestrukturnih proteinov (nsp1-nsp8). Od N-terminalnega dela pp1a in pp1ab se najprej odcepita nsp1 in nsp2, ki sta tudi končna produkta lastnega avtoproteaznega delovanja (Snijder in sod., 1992; Snijder in sod., 1995). Na vmesni produkt nsp3-8 deluje glavna virusna serinska proteinaza nsp4 (Snijder in sod., 1996), ki je odgovorna tudi za vse 3 razcepitve v delu pp1ab, ki ga kodira ORF1b (van Dinten in sod., 1996; van Dinten in sod., 1999). Končni produkti procesiranja so 4 nestrukturni proteini (nsp9-nsp12), ki imajo vodilno vlogo pri procesu pomnoževanja virusne RNA (den Boon in sod., 1991; van Dinten in sod., 1997) (Slika 2-7).

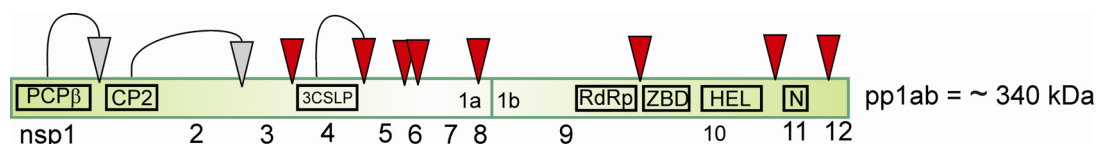
Nsp1 in nsp2 sta pomožni proteinazi, ki ne sodelujeta pri pomnoževanju genoma *per se*. Kljub temu imata pomembno vlogo pri regulaciji kompleksnih procesov pomnoževanja in izražanja genoma med virusnim razmnoževalnim ciklom. Pomožni proteinazi sta *cis*-delujoči cisteinski endopeptidazi, ki s hidrolizo razcepljata prvo polovico aminoterminalnega dela replikaznih poliproteinov pp1a in pp1ab (Tijms in sod., 2001).

Prvi produkt avtoprocesiranja virusne replikaze je nsp1 (260 aa) (Snijder in sod., 1992), njegova masa je 29 kDa. Nsp1 je regulatorni protein, ki ima na N-terminalnem koncu motiv cinkovega prsta ZF (ZF, *angl. zinc finger*), na C-terminalnem koncu pa proteolitični domeni PCP α in PCP β (PCP, *angl. papain-like cysteine protease*). PCP β je cisteinska proteinaza papainskega tipa, ki med prevajanjem razcepi peptidno vez med aminokislinama glicin na 260. in 261. mestu, t.j. na stiku med nsp1 in nsp2. S pomočjo mutageneze so ugotovili, da sta za katalitsko aktivnost encima odgovorni aminokislini cistein Cys164 in histidin His230 (Snijder in sod., 1992). Čeprav domena PCP α sama ni aktivna, pa z domenama ZF in PCP β sodeluje pri *trans*-aktivaciji sinteze sg mRNA (Tijms in sod., 2001).

Tudi nsp2 (571 aa) ima cisteinsko proteinazno domeno CP2, s katero deluje na peptidno vez med nsp2 in nsp3. Zaradi podobnosti v strukturi katalitičnih nukleofilov (Cys270 in His332) in ohranjenosti Cys270-Gly271 dipeptida v aktivnem centru encima je CP2 neobičajna virusna cisteinska proteinaza, ki posledično kaže visoko podobnost z aminokislinskimi zaporedji proteaznih homologov papainskega in kimotripsinskega tipa (Snijder in sod., 1995). Domena CP2 je med različnimi arterivirusi zelo ohranjena in na C-terminalnem koncu vsebuje 6 cisteinskih aminokislinskih ostankov (Snijder in sod., 1994). Nsp2 sodeluje tudi kot

ko-faktor z nsp4 pri encimatski cepitvi na mestu med nsp4 in nsp5 v vmesnem produktu nsp3-8 (Wassenaar in sod., 1997).

Nsp4 je glavna proteinaza (204 aa) arterivirusov s serinsko proteolitično domeno 3CLSP (3CLSP, *angl. 3C-like serine proteinase*). Serinska proteinaza izvira iz centralnega dela poliproteina, ki ga kodira ORF1a (Snijder in sod., 1994). Ime je dobila po proteinazi 3C pri virusih iz družine *Picornaviridae*, s katero si delita podobnost v specifičnosti delovanja na mestih P1|P1' v peptidnem substratu po nomenklaturi, ki sta jo uvedla Schechter in Berger (1967). Specifičnost delovanja 3CLSP do peptidnega substrata določata aminokislini Thr1179 in His1199. Le-ti se v »vezavnem žepu« vežeta s substratom, ki ima na mestu P1 aminokislino Glu (Gln), na P1' pa eno izmed majhnih aminokislin kot na primer Gly, Ser ali Ala (Gorbalenya in sod., 1989b; Ziebuhr in sod., 2000). Aktivni center arterivirusne 3CLSP sestavlja kanonična katalitska triada (His1103, Asp1129 in Ser1184). Arterivirusna 3CLSP je odgovorna za pet cepitev na C-terminalni polovici proteina, ki ga kodira ORF1a, in za tri cepitve v delu replikaze virusa EAV, ki jo kodira ORF1b (Snijder in sod., 1996; Wassenaar in sod., 1997; van Dinten in sod., 1999). Slednji nosi zapis za domene, ki so ključnega pomena za pomnoževanje RNA in prepisovanje z nastankom sg mRNA (den Boon in sod., 1991; van Dinten in sod., 1997,). Nsp9 z domeno RdRp (Poch in sod., 1989) in nsp10 s helikaznim motivom HEL (van Dinten in sod., 1996) sta pri nidovirusih najbolj ohranjeni komponenti mašinerije za sintezo RNA (Gorbalenya in Koonin, 1993; Koonin in Dolja, 1993). Med njima ležeča domena ZBD (*angl. zinc binding domain*) ima motiv cinkovega prsta, ki je sestavljen iz 13 aminokislinskih ostankov Cys⁹His⁴, na katere se s koordinacijskimi vezmi vežejo 4 cinkovi kationi (den Boon in sod., 1991; van Dinten in sod., 2000). V interakciji z domeno HEL katalizirata razpiranje dveh verig RNA ali DNA v smeri 5'→3' (Seybert in sod., 2000). Na skrajnem C-koncu niza replikaznih proteinov se nahaja nsp11, ki ima domeno NendoU (*angl. urydilate-specific endoribonuclease*) (Slika 2-7). Gre za tip endoribonukleaze, ki cepi verigi RNA navzgor in navzdol od specifičnih prepoznavnih mest GU ali GUU (Ivanov in sod., 2004; Posthuma in sod., 2006).



Slika 2-7: Proteolitično procesiranje replikaznega poliproteina pp1ab. Sivi puščici označujeta cepitvena mesta pomožnih proteinaz nsp1 in nsp2, medtem ko rdeče puščice označujejo cepitvena mesta glavne virusne

proteinaze nsp4. Znotraj produktov proteolitčnega procesiranja nsp1-12 si po vrsti sledijo naslednje domene: PCP β (cisteinska proteinaza papainskega tipa), CP2 (cisteinska proteinaza), 3CSLP (serinska proteinaza), RdRp (od RNA odvisna RNA polimeraza), ZBD (domena za vezavo cinka), HEL (helikaza) in N (endoribonukleaza NendoU). Povzeto po: Barrette-Ng in sod. (2002).

Z imunoelektronsko mikroskopijo so pokazali, da se že zelo zgodaj po uspešni infekciji celic z EAV v perinuklearnem področju pojavijo vezikularne strukture z dvojno membrano (DMV, *angl. double-membrane vesicle*) (Breese in McCollum, 1970) (Slika 2-8). V membrano, ki jo dobijo od endoplazemskega retikuluma (Pedersen in sod., 1999), se s svojimi hidrofobnimi domenami zasidrajo nestrukturni proteini nsp2, nsp3 in nsp5 (Snijder in sod., 1994; Wassenaar in sod., 1997). Slednji so v interakciji z nsp9 in nsp10 vključeni v virusni pomnoževalni kompleks, ki je povezan z membrano DMV (van der Meer in sod., 1998). Tovrstna membranska struktura virusu zagotavlja ugodno mikrookolje, kjer poteka sinteza RNA tudi s pomočjo na membrano vezanih celičnih encimov (van Dinten in sod., 1996).

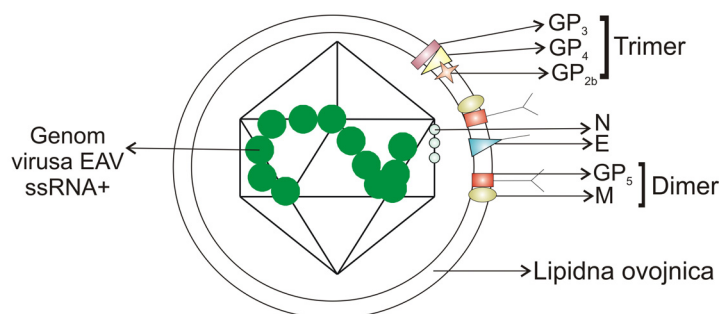


Slika 2-8: Struktura DMV, ki ima notranjo in zunanjo membrano. Merilo velikosti 100 nm. Povzeto po: Pedersen in sod. (1999).

2.2.4 Strukturni proteini

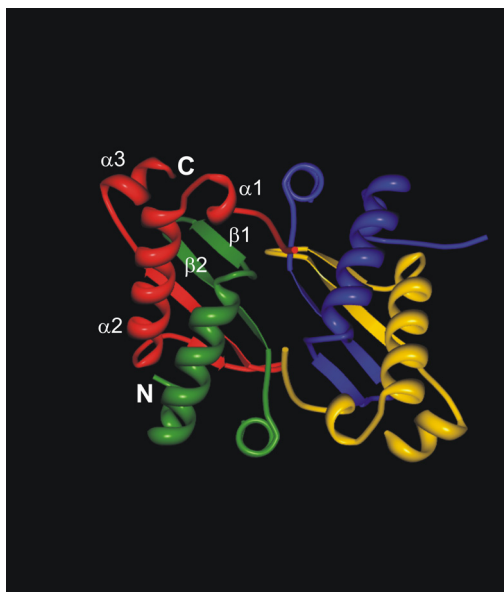
Protein nukleokapside (N)

Virion virusa EAV je zgrajen iz nukleokapside, ki jo obdaja lipidna ovojnica, v kateri je 6 strukturnih proteinov (Slika 2-9).



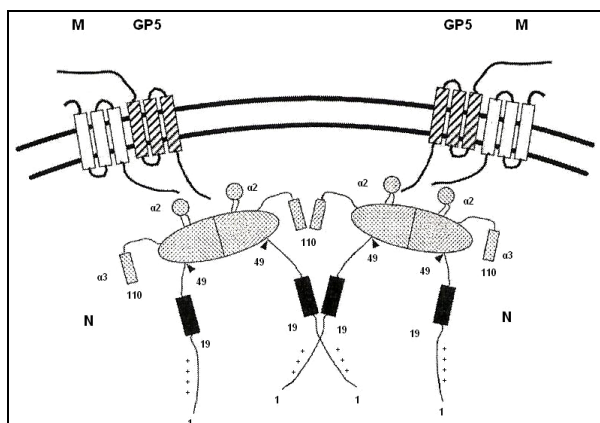
Slika 2-9: Grafična predstavitev viriona virusa EAV. Povzeto po: Holyoak in sod. (2008).

Sredica viriona vsebuje fosforilirane bazične nukleokapsidne proteine N (110 aa), velikosti 12–14 kDa (Zeegers in sod., 1976). Protein N je homodimer, ki ima v svoji strukturi β -ploskev iz 4 antiparalelnih polipeptidnih verig, ki jo pokrivata 2 dolgi α -vijačnici (Slika 2-10).



Slika 2-10: Shematska predstavitev trodimenzionalne strukture tetramera AB-CD. Posamezne podenote so različno obarvane. Podenota A je zelena, podenota B je rdeča, podenota C je modra in podenota D je zelena. Elementi sekundarne strukture so prikazani kot trakovi (β -struktura) in vijačnice (α -vijačnica). Trodimenzionalno strukturo nukleokapsidnega proteina smo predstavili s pomočjo programa PDB Protein Workshop, verzija 1.50 (Moreland in sod., 2005). Koordinate za protein nukleokapside (2i9f) smo pridobili iz baze trodimenzionalnih struktur PDB (*angl. Protein Data Bank*) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Ta strukturni element omogoča umestitev strukturnih proteinov M in GP₅ v lipidno ovojnico. V kristalu se dva dimera N povežeta v tetramer s 4 enakimi podenotami AB-CD. Na N-terminalnem koncu proteina N imajo stranske verige aminokislin (1–47 aa) pozitiven naboj in sodelujejo pri vezavi z virusno RNA (Slika 2-11) (Deshpande in sod., 2007).



Slika 2-11: Shematska predstavitev interakcij med dvema dimeroma proteinov N. Prikazane so transmembranske regije heterodimera GP₅/M (pravokotniki brez vzorca prikazujejo 3 transmembranske domene proteina M, medtem ko pravokotniki z vzorcem diagonal navzgor prikazujejo 3 transmembranske domene proteina GP₅). Dimeri proteinov N so prikazani kot pikčasti ovali z označenimi vijačnicami $\alpha 2$ in $\alpha 3$. Na N-terminalnem koncu proteina N so vijačnice α , katerih stranske verige aminokislin nosijo negativen naboj, označene s pravokotniki črne barve. Povzeto po: Deshpande in sod. (2007).

Subgenomska mRNA₇, ki jih je v celicah, okuženih z virusom EAV, količinsko največ, se prevedejo v protein N. V zrelem virionu predstavlja protein N kar velik delež (20–40 %) vseh virusnih proteinov (de Vries in sod, 1992). Pri imunskem odzivu na okužbo z virusom EAV, se v serumu konj pojavijo tudi protitelesa proti nukleokapsidnemu proteinu N (de Vries in sod., 1992; van Berlo in sod., 1986b). Prav zato ga kot antigen uporabljamo pri dokazovanju specifičnih protivirusnih protiteles z imunsko-membransko metodo po Westernu (*angl. Western immunoblotting*) (Kheyar in sod., 1997; MacLachlan in sod., 1998), imunoprecipitacijo in z encimsko imunskim testom ELISA (ELISA, *angl. enzyme-linked immunosorbent assay*) (Chirnside in sod., 1995a; Chirnside in sod., 1995b).

Membranski proteini

Protein E (67 aa) je neglikozilirani integralni membranski protein, ki ima v centralni domeni približno 30–40 hidrofobnih aminokislin, s katerimi se vgradi v virusni lipidni ovoj. Na N-

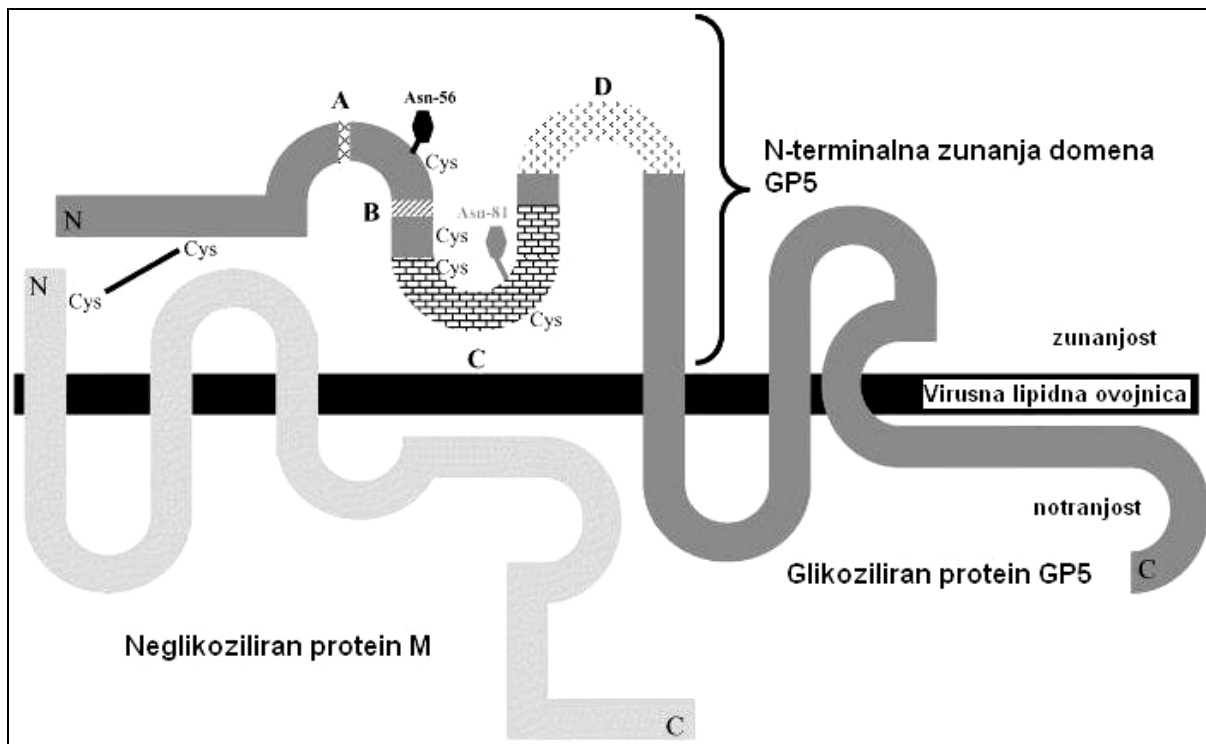
terminalnem koncu ima signal za vezavo miristinske kisline. Amidno povezana miristoilna sidra zasidrajo protein E z lipidnimi repki v membrano virusa. S transfekcijo so v celice BHK-21 (BHK, *angl. baby hamster kidney*) vnesli konstrukte z mutiranim genom ORF2a, ki se v celicah ni izražal. Zaradi spremembe v startnem kodonu ORF2a, se novi virusi niso izgradili. Na ta način so z reverzno genetiko dokazali, da je protein E pomemben za infektivnost virusa EAV (Snijder in sod., 1999).

V virusni ovojnici so tudi glikoproteini GP_{2b} (25 kDa), GP₃ (37–42 kDa) in GP₄ (28 kDa), ki jih kodirajo geni ORF2b, ORF3 in ORF4. Te strukturne komponente virusne membrane so v virionu zastopane v manjših količinah (de Vries in sod., 1992; Wieringa in sod., 2002).

GP_{2b} in GP₄ prištevamo med integralne membranske glikoproteine razreda I (N_{exo}C_{cyt}). Zanje je značilno, da imajo na N-terminalnem delu signalno zaporedje, ki se v ER (endoplazemskem retikulumu) odcepi, poleg tega imajo tudi eno ali več mest za pripenjanje oligosaharidov z N-glikozidno vezjo, hidrofobni C-konec pa jim omogoča sidranje v membrano (de Vries in sod., 1995a; Wieringa in sod., 2002). Za GP_{2b} je značilna homodimerizacija, ki poteka v ER. Dimerni proteini se vgradijo v virione. Virusni delci preidejo iz ER v Golgijev aparat, kjer se dimerni proteini še dodatno spremenijo, tako da se na N-glikane veže sialna kislina (de Vries in sod., 1995a; Roth in sod., 1985). Izjema je GP₃, pri katerem se hidrofobni N-terminalni konec ne odcepi in ima kar 6 glikozilacijskih mest. Kljub temu da topologija membranskega dela GP₃ še ni povsem pojasnjena, menijo, da se GP₃ zasidra v virusno ovojnico z N- ali C-hidrofobnim koncem ali pa kar z obema (Hedges in sod., 1999a; Wieringa in sod., 2002). V okuženi celici se GP_{2b} in GP₄ preko cisteinskih ostankov kovalentno povežeta v heterodimerno obliko GP_{2b}/GP₄. Med heterodimerom in GP₃ se vzpostavi začasna nekovalentna interakcija, ki pripomore k nadaljnji spremembi konformacije. Takoj za tem, ko na novo sestavljeni virioni zapustijo okuženo celico, se virus biokemijsko modificira. Med procesom trimerizacije se med GP₃ in GP_{2b}/GP₄ vzpostavijo kovalentne (S-S) vezi, ki stabilizirajo nativno konformacijo heterotrimerne kompleksa GP_{2b}/GP₃/GP₄ (Wieringa in sod., 2003). Ključnega pomena za uspešno izgradnjo viriona je prisotnost proteina E. Slednji je v interakciji s kompleksom GP_{2b}/GP₃/GP₄ in z GP₅/M in/ali z N ter usmerja kompleks glikoproteinov v nastajajoče virione.

Znano je, da je protein E skupaj z glikoproteini GP_{2b}/GP₃/GP₄ odgovoren za sposobnost infektivnosti virusa, verjetno pa kompleks GP_{2b}/GP₃/GP₄/(E) sodeluje tudi pri prepoznavanju receptorjev na površini celic in/ali vstopu virusa v permissivno celico (Wieringa in sod., 2004).

Neglikozilirani protein M (17 kDa) in glikoprotein GP₅ (30–44 kDa) sta glavna integralna membranska proteina, ki segata s tremi transmembranskimi regijami v notranjost virusne lipidne ovojnice (Slika 2-12).



Slika 2-12: Heterodimer GP₅/M. Slika prikazuje medmolekularno disulfidno vez (S-S) med Cys8 v proteinu M in Cys34 v proteinu GP₅. Slika prikazuje tudi 4 nevtralizacijska mesta (A, B, C in D) in mesta za N-glikozilacijo (Asn56 in Asn81). Povzeto po: Balasuriya in sod. (2004).

Protein M sodi med membranske proteine razreda III z orientacijo (N_{exo}C_{cyt}) (den Boon in sod., 1991) in je med različnimi arterivirusi dokaj ohranjen (Chirnside in sod., 1994; Snijder in Meulenberg, 1998). V primerjavi s proteinom GP₅ je protein M manj imunogen, saj je na zunanji površini virusne ovojnice izpostavljen imunskemu sistemu le kratek niz hidrofilnih aminokislin (10–18 aa) na njegovem N-terminalnem koncu (de Vries in sod., 1992). Protein M se kopiči v ER, kjer pride med procesom heterodimerizacije do tvorbe medmolekularne disulfidne vezi med Cys8 na N-terminalnem koncu proteina M in Cys34 na zunanji hidrofilni domeni GP₅ (de Vries in sod., 1995b; Snijder in sod., 2003). Nastanek heterodimera GP₅/M je *conditio sine qua non* za uspešno sestavljanje novih infektivnih virionov (Wieringa in sod., 2004). Heterodimer GP₅/M je vezni člen med nukleokapsido in virusno ovojnico (Slika 2-10), ko se v lumnu ER med sočasno potekajočo dimerizacijo in brstenjem nukleokapsid (Breesse in McCollum, 1970) sestavljajo novi virusi EAV (de Vries in sod., 1995b; Dobbe in sod.,

2001; Wieringa in sod., 2004). Virusi potem preidejo iz ER v Golgijev aparat in se iz celice sprostijo z eksocitozo (Magnusson in sod., 1970).

Glikozilirani protein GP₅ je poglavitni strukturni protein velikosti 30–44 kDa. Protein ima 255 aminokislin, ki so organizirane v N-terminalno zunanjo hidrofilno domeno z enim ali dvema mestoma za *N*-glikozilacijo (Asn56 in/ali Asn81) (Slika 2-12), kamor se pripnejo enote *N*-acetillaktozamina (de Vries in sod., 1992; Glaser in sod., 1995), notranjo hidrofobno domeno, ki prečka membrano trikrat, in C-terminalno citoplazemsko hidrofilno domeno.

Humoralni protitelesni odziv na virus EAV je uperjen proti GP₅, ki je najbolj imunogen virusni membranski protein. Na njegovi zunanji hidrofilni domeni se nahajajo glavni nevtralizacijski epitopi (Balasuriya in sod., 1993; Deregt in sod., 1994), ki pri konjih, okuženih z virusom EAV, izzovejo nastanek nevtralizacijskih protiteles (Chirnside in sod., 1995b; Chirnside in sod., 1995c). Za nastanek slednjih je nujna prisotnost proteina M, ki sodeluje pri po-prevajalni modifikaciji in zorenju GP₅ (Balasuriya in sod., 2000; Balasuriya in sod., 2002). Tovrstna interakcija vpliva na prostorsko preoblikovanje individualnih linearnih in konformacijskih epitopov, ki se med seboj povežejo in se na površini virusa izrazijo v nevtralizacijski konformaciji (Balasuriya in sod., 1997). S pomočjo monoklonskih protiteles, ki so jih proizvedli v različnih laboratorijih (Balasuriya in sod., 1993; Deregt in sod., 1994; Kondo in sod., 1998a; Weiland in sod., 2000), so na GP₅ identificirali 4 nevtralizacijska mesta A (94 aa), B (61 aa), C (67–90 aa) in D (99–106 aa) (Slika 2-12) (Balasuriya in sod., 1993; Balasuriya in sod., 1995a; Balasuriya in sod., 1997; Chirnside in sod., 1995c; Deregt in sod., 1994; Glaser in sod., 1995), znotraj katerih se nahajajo konformacijsko odvisni epitopi (Balasuriya in sod., 1997; Balasuriya in sod., 2004a). Aktivnost nevtralizacijskega delovanja je pri nevtralizacijskih protitelesih iz konjskega poliklonskega hiperimunega seruma in v laboratorijih pridobljenih nevtralizacijskih monoklonskih protitelesih uperjena predvsem proti GP₅, oziroma proti imunodominantni regiji V₁, ki zajema nevtralizacijski mesti C in D (Balasuriya in sod., 1995a; Balasuriya in sod., 1995b; Balasuriya in sod., 1997; Glaser in sod., 1995; Stadejek in sod., 1999; St-Laurent in sod., 1997; Yamaguchi in sod., 1997).

Glikoprotein GP₅ naj bi se po mnenju nekaterih raziskovalcev (de Vries, 1994) vezal z receptorjem na površini celice tarče in omogočil vstop virusa v celico s fuzijo. Nedavno so dokazali, da tropizem virusa EAV do celic ni odvisen samo od zunanje hidrofilne domene na GP₅, temveč so za vezavo na celice potrebni še dodatni proteini (Dobbe in sod., 2001; Castillo-Olivares in sod., 2003).

Monoklonska protitelesa uporabljajo tudi za spodbujanje selekcije med virusi. Virusom, ki jih namnožujejo v celičnih kulturah, dodajajo specifična nevtralizacijska monoklonska protitelesa. Taki virusi ob dodatku monoklonskih protiteles med razmnoževanjem *in vitro* mutirajo, zaradi česar pridobijo povsem drugačno antigensko sestavo. Na ta način so pridobili variante virusa EAV (EM, *angl. escape mutant*), ki so rezistentne na nevtralizacijo s specifičnimi protitelesi in pri katerih so opazili spremembe v aminokislinskem zaporedju imunodominantnega dela GP₅ (Balasuriya in sod., 1993; Balasuriya in sod., 1995a; Balasuriya in sod., 1995b; Balasuriya in sod., 1997; Balasuriya in sod., 2004a; Deregt in sod., 1994; Glaser in sod., 1995; Yamaguchi in sod., 1997; Weiland in sod., 2000). Sprememba katere od aminokislin v območju nevtralizacijskih mest C in D povzroči spremembo v hidrofobnosti in/ali sekundarni strukturi GP₅ (Balasuriya in sod., 1995b). Antigenske variacije v regiji V₁ so v glavnem vzrok za nastanek novih različic virusa EAV, ki se razlikujejo v nevtralizacijskem fenotipu (Balasuriya in sod., 1995b; Balasuriya in sod., 1997; Balasuriya in sod., 2004b; Glaser in sod., 1995). Kvantitativne variacije v nevtralizacijskem fenotipu določamo z nevtralizacijskim testom (NT) (Senne in sod., 1985), s katerim ugotavljamo prisotnost in titer nevtralizacijskih protiteles v specifičnem serumu. Nevtralizacijska aktivnost protiteles proti virusu EAV je vezana na imunoglobuline razreda IgG (Weiland in sod., 2000), ki preprečijo pojav klinične slike kužnega arteritisa kopitarjev tudi v primeru ponovne okužbe (Bryans in sod., 1957a; Doll in sod., 1968; McCollum, 1986).

Primerjalne analize nukleotidnih zaporedij ORF5, ki kodira GP₅, so pokazale, da obstajajo med sevi virusa EAV precejšnje genetske raznolikosti (Balasuriya in sod., 1999a; Glaser in sod., 1995; Hedges in sod., 1999b).

Slednja se odraža tudi na nivoju aminokislinskega zaporedja GP₅, saj pri virusih EAV ugotavljamo razlike v številu mest za *N*-glikozilacijo. Poleg glikozilacijskega mesta 56 (Asn56), ki je ohranjeno med vsemi do zdaj znanimi sevi virusa EAV in je potrebno za virulenco, imajo nekateri sevi glikoziliran tudi aminokislinski preostanek na mestu 81 (Asn81). Z reverzno genetiko, ki omogoča usmerjeno spreminjanje izražanja genov, so preučevali vlogo ORF5. S to tehnologijo so Balasuriya in sod. (2004a) pripravili 20 rekombinantnih virusov EAV, tako da so del gena, ki kodira antigensko determinanto, spremenili z nukleotidnimi substitucijami ali pa so v infektivni virusni cDNA vektor (van Dinten in sod., 1997) vgradili homologni gen virusa PRRS (Dobbe in sod., 2001). V zadnjem primeru med himernim proteinom GP₅ in nevtralizacijskimi protitelesi proti virusu EAV niso

zaznali nobene imunološke reakcije. S temi rezultati so izsledke o obstoju poglavitnih nevtralizacijskih epitopov na GP₅ še dodatno podkrepili. Pripravili so tudi rekombinantni virus EAV, pri katerem so na glikozilacijskem mestu 81 aminokislino Asn zamenjali z Asp. Z nevtralizacijskim testom so ugotovili, da med parentalnim in rekombinantnim virusom ni bistvenih razlik v nevtralizacijskem titru. Na ta način so dokazali, da glikozilacija na mestu 81 ne vpliva na nevtralizacijski fenotip virusa (Balasuriya in sod., 2004a; Glaser in sod., 1995).

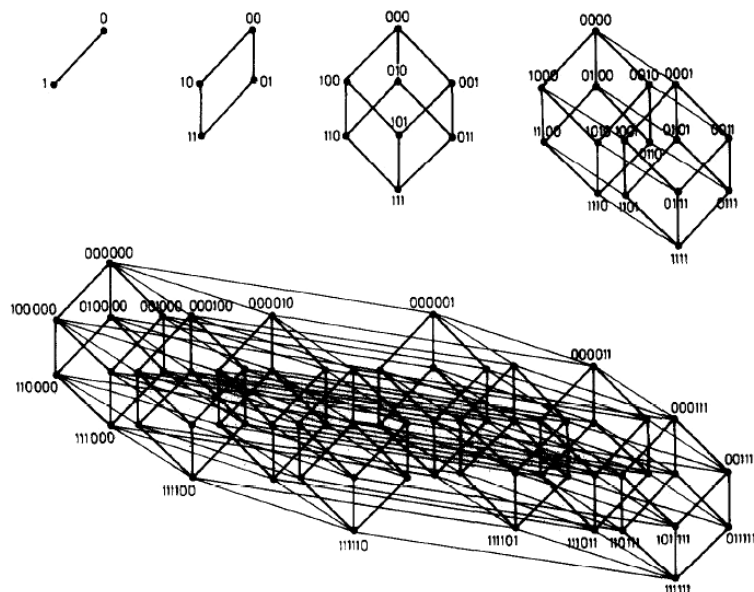
2.2.5 Glavni nevtralizacijski epitopi

Z izračuni hidrofobnega profila in analizami topologije membranskega dela GP₅ so de Vries in sod. (1992) predpostavili, da aminokislino 19–115 sestavljajo zunanjo hidrofilno domeno GP₅, na katero se vežejo nevtralizacijska protitelesa. To predpostavko so Chirnside in sod. (1995c) eksperimentalno testirali, tako da so subklonirali različne odseke ORF5 v ekspresijski sistem bakterije *Escherichia coli*. Pridobili so zbirko različnih rekombinantnih proteinov GP₅, ki so jo testirali s konjskim hiperimunim serumom v testu ELISA. Najbolj reaktiven je bil rekombinantni protein, ki so ga sestavljale aminokislino 55–98. Pozneje so iz zaporedja aminokislin 75–97 izdelali tudi sintetični peptid EAV-GP₅, ki je v vakciniranih konjih spodbudil zaščitno imunost proti virusu EAV. To odkritje odpira potencialne možnosti za uporabo sintetičnih peptidov pri pripravi cepiv. Na podlagi svojih spoznanj so opredelili imunodominantne epitope, ki na GP₅ vključujejo aminokislino 54–99 (Chirnside in sod., 1995b; Chirnside in sod., 1995c).

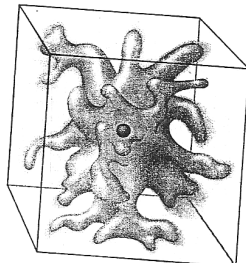
Balasuriya in sod. (1995a) so z analizami kompeticije med MAb za vezavno mesto na GP₅ ugotovili, da na površini viriona EAV obstaja vsaj eno nevtralizacijsko mesto s tremi konformacijsko odvisnimi epitopi. Ugotovitev, da zamenjava šestih aminokislin v tem področju 99–104 povzroči spremembe v sekundarni strukturi GP₅ in vpliva na kvantitativne variacije v nevtralizacijskem fenotipu med virusi EAV, kaže na pomen te regije pri nevtralizaciji. Ta ugotovitev se ujema tudi z rezultati Glaserja, ki dokazujejo, da je nevtralizacijsko rezistentni fenotip posameznih sevov EAV v korelaciji s spremembami aminokislin na mestih 96, 99, 100 in 113 (Glaser in sod., 1995).

2.2.6 Evolucija kvazivrste EAV (*angl. quasispecies EAV*) in populacijska biologija virusov z RNA

Pri različnih sevih virusa EAV izoliranih iz perzistentno okuženih živali je večina variabilnosti sevov omejena na zaporedje aminokislin, ki ustrezajo regiji V₁ (61–121 aa). Predvsem na nevtralizacijskem mestu C (67–90 aa) so zaznali veliko število nesinonimnih nukleotidnih zamenjav (Balasuriya in sod., 1995b; Balasuriya in sod., 1997). Pri perzistentno okuženih žrebcih se virus EAV trajno razmnožuje v ampulah semenovodov in akcesornih spolnih žlezah. Med razmnoževanjem virusa prihaja do spreminjanja genoma virusa EAV zaradi pogostih točkovnih mutacij in občasnih delecij. Hitrost nukleotidnih zamenjav, ki se pojavijo na posameznem baznem mestu znotraj področja ORF2-ORF7 (približno 2822 nukleotidov) v enem letu, znaša 10^{-2} (Hedges in sod., 1999b). Variabilnost, ki izvira predvsem iz mutacij na ORF5, je temelj evolucijskega spreminjanja virusa EAV. Nastajajoče mutacije so osnova za nastanek novih variant virusa EAV, ki lahko sočasno obstajajo v istem gostitelju kot heterogena skupina sorodnih genomov (Balasuriya in sod., 1995b; Cavanagh, 1997; Domingo in sod., 1996; Holland in sod., 1992). Taki populaciji, v kateri sobivajo individualni genomi, ki se na enem ali več mestih razlikujejo od skupnega zaporedja, pravimo kvazivrsta (*angl. quasispecies*). Izraz sta leta 1977 skovala Eigen in Schuster, ko sta se v svojih raziskavah o izvoru primitivnih biokemičnih mrež osredotočila na proučevanje posebnih mehanizmov evolucije molekul (Eigen in Schuster, 1977). Kvazivrsto sta definirala kot populacijo informacijskih entitet, ki so v Hammingovem sekvenčnem prostoru (Slika 2-13) (Eigen, 1993; Hamming, 1950) razporejene v obliki asimetričnega oblaka s centrom težnosti pri glavni sekvenci (*angl. »master sequence«*) (Slika 2-14).



Slika 2-13: Enostaven prikaz Hammingovih sekvenčnih prostorov. Sekvence so predstavljene v binarni abecedi, ki jo sestavljata dva znaka 0 in 1. Pri sekvenci dolžine enega nukleotida sta možni 2 zaporedji 0 ali 1, ki sta predstavljeni kot daljica s krajiščema 0 in 1. Pri sekvenci dolžine dveh nukleotidov dobimo 4 permutacije s ponavljanjem (00, 01, 10, 11), ki tvorijo vse 4 kote kvadrata. Permutacije s ponavljanjem, v sekvenci dolžine treh nukleotidov, predstavljajo vseh 8 oglišč v kocki. Povzeto po: Eigen in McCaskill (1988).



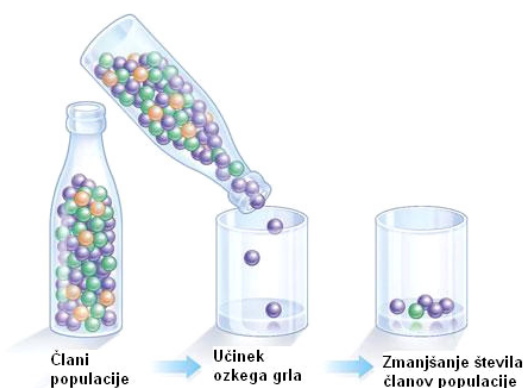
Slika 2-14: Predstavitev kvazivrste na zelo poenostavljen način. Črna pika prikazuje skupno zaporedje »consensus sequence«, oblak okrog nje pa kvazivrsto. Povzeto po: Eigen (1993).

Glavna sekvenca predstavlja genotip z najvišjo zmogljivostjo, iz katerega nastanejo vse mutante v dani populaciji, kjer sta kontinuiran proces mutacij in naravna selekcija v dinamičnem ravnovesju (Eigen, 1987; Eigen, 1996; Eigen in Schuster, 1997; Nowak, 1992). Celotna populacija sekvenc tvori kooperativno strukturo, ki se razvija enotno, tako da selekcija ne deluje na posamezno genetsko različico, ki je najbolj zmogljiva in prispeva največ potomcev v naslednji generaciji (glavna sekvenca), temveč je delovanje naravne selekcije usmerjeno na celotno paleto mutant (Eigen, 1987; Eigen, 1996).

Na splošno velja, da je stopnja mutacij pri virusih z RNA sorazmerna z recipročno vrednostjo dolžine njihovega genoma, kar pomeni, da bo imela vsaka kopija genoma v povprečju eno napako (Drake, 1991; Eigen in Biebricher, 1988; Eigen, 1993). Napake nastajajo zaradi nenatančnega podvajanja RNA ali prepisovanja genetske informacije iz RNA v DNA s pomočjo reverzne transkriptaze. Poleg tega virusne replikaze RNA in reverzne transkriptaze nimajo popravljalnega mehanizma, ki ga poznamo pri večini celičnih polimeraz DNA in se nanaša na 3'→5' eksonukleazno aktivnost (Holland in sod., 1992). Kljub temu populacija sekvenc, ki vzdržuje samo sebe, tako da se pomnožuje z napakami, vendar dovolj dobro, da se izogne »katastrofi zaradi napak«, ohranja skupinsko identiteto skozi čas (Eigen, 1993).

Genetska raznolikost virusov z RNA je kompleksen proces, ki vključuje najmanj dva mehanizma: 1. mutacije, ki nastajajo med razmnoževanjem virusa v okuženi celici, so stohastičen dejavnik in 2. usoda vsake mutante je odvisna: 2.a) od stopnje njene zmogljivosti kot tudi od selekcijskega pritiska, ki deluje v nasprotno smer od mutacij tako, da ohranja uravnovešeni polimorfizem, in 2.b) od naključnega genetskega drsa, ki znižuje gensko pestrost in variabilnost znotraj same populacije (Domingo in sod., 1996).

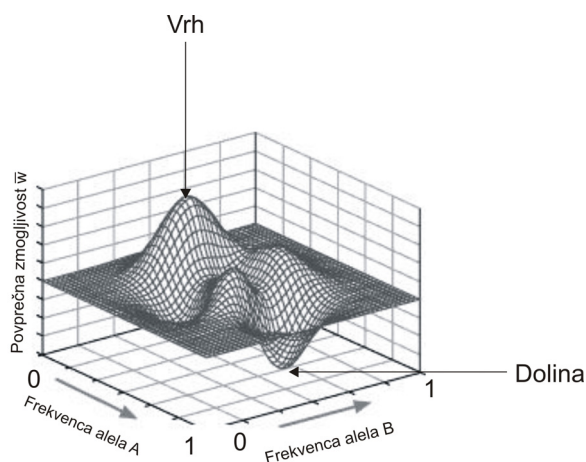
Tudi nihanja v velikosti populacije vplivajo na njeno zmogljivost. Če pride zaradi nenadne spremembe v okolju (prenos virusa z drobnimi kapljicami na drug organizem, invazija novih tkiv ali organov, ki je omejena le na nekaj infektivnih virionov) do drastičnega zmanjšanja števila članov v populaciji, govorimo o učinku ozkega grla (*angl. bottleneck effect*) (Slika 2-15).



Slika 2-15: Shematski prikaz učinka ozkega grla »bottleneck effect«. Kroglice različnih barv predstavljajo tri različne alele. V primerih, ko zaradi npr. naravne katastrofe pride do drastičnega zmanjšanja števila članov v populaciji, se po naključju ohranita le vijolični in zeleni alel. Ko bi populacija po nekem času začela ponovno naraščati, bi se vijolični alel spet uveljavil in frekvenca tega alela bi narasla.

V genetsko osiromašeni populaciji, na katero deluje naključje, se bodo fiksirali recesivni aleli, ki so nosilci neugodnih mutacij, zaradi česar se bo zmanjšala celotna zmogljivost populacije virusov (Chao, 1990; Domingo in sod., 1978; Duarte in sod., 1992; Duarte in sod., 1994).

V evoluciji virusov poznamo tudi primere, ko so v populaciji, ki se številčno zelo poveča, zelo pomembni odnosi kompeticije. Variante, ki tekmujejo med seboj za prevlado in se jim uspe fiksirati v populaciji, omenjeni populaciji prinašajo večjo zmogljivost (Domingo in sod., 1996). Spremembe zmogljivosti v dani populaciji lahko prikažemo z večdimenzionalnim modeliranjem, ki mu pravimo adaptacijska pokrajina. Vpeljal jo je glavni protagonist moderne evolucijske sinteze Sewall Wright leta 1932 (Wright, 1931). Njegov koncept je matematična paradigma, s katero je poenostavil sicer kompleksno funkcijo celotnega populacijskega fitnesa in omogočil vpogled v izredno zapleteno evolucijo virusov z RNA (Wright, 1982). Adaptacijsko pokrajino (Slika 2-16) si lahko predstavljamo kot tridimenzionalno pokrajino (za dva lokusa, pri treh lokusih bi morali imeti že štiri dimenzije), sestavljeno iz razmeroma majhnih populacij, v katerih se sorodni genotipi razlikujejo po svojih zmogljivostih. Hribi so možne genetske kompozicije v populaciji, pri katerih je povprečna zmogljivost visoka, sedla in doline pa so tiste kompozicije, kjer je ta zmogljivost nizka oziroma enaka nič. Lahko je več vrhov in dolin.



Slika 2-16: Predstavitev Wrightove adaptacijske pokrajine v obliki topografske karte.

Ko se frekvence genov v populaciji z naravno selekcijo spreminjajo, se populacija premika proti enemu od vrhov. Selekcija je deterministični dejavnik evolucije, ki zmogljivost populacije vedno samo zvišuje, zato ob njenem kontinuiranem delovanju populacija dolgo

časa ostaja na izoliranem, bolj prilagojenem vrhu z višjo zmogljivostjo. Vrhovi so povezani z dolinami, populacija pa ne more iti iz enega hriba na drugega le s pomočjo selekcije. Tudi visoka frekvenca mutacij lahko popelje navzdol (v nasprotno smer delovanja selekcije) le majhen delež variant, ki so nakopičile številne mutacije, kajti v populaciji dominirajo bolj zmogljive variante, ki so na vrhu tik ob glavni sekvenci. Wright je predvideval, da se populacije lahko premaknejo iz enega na drugi hrib z naključnim genetskim drsom oziroma ob učinku ozkega grla. Prehod se zgodi naenkrat (Jerman in Štern, 1999). Lande (1985) in Newman s sod. (1985) so Wrightov koncept prenesli v teorijo o prekinjenih ravnovesjih (*angl. punctuated equilibria*). Pokazali so, da je v primeru nespremenjenih zunanjih razmer čas, ki je potreben za tranzicijo populacije med vrhovi, izjemno kratek, nasprotno je časovno obdobje na lokaciji z najugodnejšim stanjem relativno dolgo in narašča eksponentno z velikostjo populacije.

Adaptacijska pokrajina v resnici ni statična, ampak se s spreminjanjem okolja spreminja tudi sama, zaradi česar se lahko stalno ravnotežje v populaciji virusov prekine. To se pogosto dogaja pri medsebojnem vplivanju virusa in gostitelja na ravni vsega organizma (med imunskim odzivom, vnetno reakcijo, prenosom virusa na drugega gostitelja) kot tudi na celični ravni (prehod virusa v celice različnih tkiv) (Holland in sod., 1992). Alelna populacija tava po adaptacijski pokrajini, pri tem išče ravnovesje, ki ga v stalno spreminjajočem se živem okolju nikoli ni. Gre za sklop razmišljanj znotraj evolucijske teorije, znanem pod imenom hipoteza o Rdeči kraljici (*angl. »Red Queen« hypothesis*) (van Valen, 1973), in velja tudi v odnosih med vsemi virusnimi variantami v kvazivrsti (Eigen, 1993). Ne glede na to, kako preživetveno oziroma reprodukcijsko uspešna je kakšna populacija v danem trenutku, vselej se z njo vstric razvijajo tudi njeni naravni tekmeči. Bolj kot si prilagojen, hitreje te bo nasprotnik dohitel (Jerman in Štern, 1999).

Pojav so opazovali tudi pri kvazivrstah virusov z RNA (Clarke in sod., 1994). Med seboj tekmujoče variante, ki zasedajo enako ekološko nišo in imajo približno enako zmogljivost, lahko soobstajajo v ravnovesju več generacij. Ravnovesje se poruši, ko zaradi stohastičnega pojava ugodnih mutacij nastanejo »superiorne« variante, ki po načelu kompetitivne izključitve (*angl. competitive exclusion*) izključijo druge variante. Toda »poraženci« bodo zaradi selekcijskega pritiska, ki nanje deluje iz nasprotne strani, postali uspešnejši nasprotnik. Dokler med variantami obstaja kompetitivno izključevanje, vsi člani kvazivrste pridobivajo na zmogljivosti in v tem boju načeloma nikoli ne zmagata nobena varianta.

Še danes ni povsem jasno, ali evolucijo virusov z RNA usmerjajo nevtralne mutacije in naključni genetski drs ali selekcija (Domingo in Holland, 1994). Prav slednja je v darvinizmu in neodarvinizmu osrednje vodilo evolucije. Pozitivna selekcija naj bi iz široke palete variant v kvazivrsti izbrala tiste mutante, ki so bolj prilagojeni na nove razmere v okolju (npr. razmnoževanje antigenskih variant v prisotnosti imunske selekcije). Na drugi strani pa zagovorniki Kimurove hipoteze o nevtralni teoriji (Kimura, 1984) molekularne evolucije verjamejo, da je večina mutacij, ki se v populaciji ohranijo, selekcijsko nevtralnih. To pomeni, da se v populaciji pojavljajo variante, ki so enako dobre, in rahlo neugodni aleli se fiksirajo le, ko nanje deluje naključje.

Tesna in nujna vpetost organizmov v okolje zahteva z njihove strani ustrezno prilagoditev (Jerman in Štern, 1999). Vse individualne variante virusa EAV ne tekmujejo le med seboj, marveč med populacijo virusov EAV in imunskim odzivom obstaja kompetitivna dinamika. Med perzistentno okužbo deluje imunska selekcija na antigenske determinante, ki so na površini viriona EAV. Virusi EAV se skušajo izogniti imunskemu spoznavanju z mutacijskim procesom na ORF5, ki prispeva svoj delež k variabilnosti glavnih nevtralizacijskih epitopov na GP₅. Poleg imunske selekcije na fiksacijo aminokislinskih zamenjav na GP₅ verjetno vpliva tudi delovanje drugih mehanizmov mikroevolucije (Balasuriya in sod., 1997; Domingo in sod., 1993; Spindler in sod., 1982). To pomeni, da ima dana kvazivrst EAV pester genomski sklad, na podlagi katerega je zmožna širokih fenotipskih prilagoditev, kar ji v obstoječi ekološki niši lahko prinaša določeno selekcijsko prednost (Balasuriya in sod., 1995b).

2.2.7 Genska in antigenska variabilnost virusa EAV

Razlike v kliničnem poteku izbruhov kužnega arteritisa kopitarjev (Clayton, 1987; Bryans in sod., 1957a; McCollum in Bryans, 1973) kot tudi pojav trajnega izločanja virusa EAV s semenom, ki so ga opazili le pri nekaterih serološko pozitivnih žrebcih (Neu in sod., 1988; Timoney in sod., 1986a), so nakazovale na obstoj genetskih razlik med virusi EAV.

Rezultati prve analize polimorfizma genomov pri virusih EAV z metodo iskanja prstnih odtisov z ribonukleazo T1 (*angl. fingerprinting*), ki so jo Murphy in sod. (1988) opravili na sevih, ki so jih izolirali iz okuženih konjev različnih pasem med epizootijo v Kentuckyju leta 1984, so razkrili, da med terenskimi izolati virusa EAV obstaja precejšnja genetska

raznolikost. Poleg tega so ugotovili, da so izolati, ki so jih izolirali zaporedoma iz istega konja v različnih časovnih obdobjih, podvrženi nenehnemu spreminjanju genoma. Pozneje, ko so v študijo vključili severnoameriške izolate virusa EAV iz različnih zveznih držav (Oklahoma, Minnesota in New Jersey), pridobljenih iz konj različnih pasem (angleški polnokrvni konj, arabski konj in ameriški kasač), se je izkazalo, da se stopnja oligonukleotidne homologije giblje med 83,7 in 85,7 %, kar kaže na precejšnjo genetsko podobnost. Nasprotno so primerjave med izolati virusa EAV iz različnih evropskih držav pokazale, da je med njimi oligonukleotidna homologija precej nizka.

Prvič so dokazali, da so izolati iz različnih kontinentov epidemiološko povezani. Ker se švedski in novozelandski izolati niso bistveno razlikovali od ameriškega izolata, so sklepali, da je omenjene okužbe povzročil isti ameriški sev. Izvor okužbe so najverjetneje bili z virusom EAV okuženi žrebci, ki so jih v Severno Evropo in Novo Zelandijo uvozili iz Severne Amerike. Vzrok za visoko genetsko podobnost med sevi virusa EAV iz različnih geografskih področij večinoma pripisujejo povečanemu prometu s konji med državami in znotraj teh zaradi tekem, razstav in različnih rejskih razlogov (Murphy in sod., 1992).

Razvoj različnih metod molekularne biologije, ki je predstavljal začetni zagon pri raziskavah genetske pestrosti virusov EAV, je potekal vzporedno z razvojem bioinformatike, ki služi predvsem kot orodje za organizacijo podatkov. Na podlagi preučevanja in primerjanja različnih genov virusa EAV so izdelali več filogenetskih dreves, s katerimi so predstavili filogenetske odnose med virusi EAV.

Chirnside in sod. (1994) so pri desetih izolatih virusa EAV s filogenetsko analizo nukleotidnih zaporedij genov ORF6 in ORF7 ugotovili 3–7-odstotno variabilnost. V izpeljanih aminokislinskih zaporedjih pripadajočih proteinov M in N so zaznali nekaj nesinonimnih zamenjav, vendar pomena teh zamenjav za funkcijo proteinov, ki sta ključna za ohranitev celostne strukture viriona EAV (de Vries in sod., 1992), niso znali pojasniti, kajti na razpolago niso imeli testov, s katerimi bi lahko dokazali korelacijo med razlikami v antigenu in med razlikami v nukleotidnem zaporedju ter med razlikami v biološkem fenotipu virusa EAV (Glaser in sod., 1995).

Tedanja spoznanja o diferenciaciji sevov virusa EAV so nadgradili japonski avtorji, ki so za ocenjevanje variabilnosti gena za protein M uporabili analizo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP, *angl. restriction fragment length polymorphism*) (Sekiguchi in sod., 1995).

Za ugotavljanje filogenetskih odnosov med izolati virusa EAV se večinoma uporabljajo regije, ki so zelo variabilne. Najpogosteje uporabljena regija je ORF5, ki kodira pglavni glikoprotein GP₅ (Balasuriya in sod., 1995b; Balasuriya in sod., 1998; Balasuriya in sod., 1999a; Guthrie in sod., 2003; Hornyák in sod., 2005; Larsen in sod., 2001; Larska in Lora, 2008b; Mittelholzer in sod., 2006; Patton in sod., 1999; Stadejek in sod., 1999; St-Laurent in sod., 1997; Zhang in sod., 2007).

Balasuriya in sod. (1995b) so z določanjem nukleotidnega zaporedja ORF5 preučevali genetsko variabilnost in sorodnost 18 izolatov EAV iz Evrope in Severne Amerike. V primerjavo so vključili tudi nukleotidna zaporedja treh laboratorijskih sevov virusa EAV, ki izvirajo iz originalnega prototipa izolata Bucyrus (ATCC, EAVCVDLS, EAVUCD), in nukleotidno zaporedje seva iz modificirane žive vakcine (Arvac[®], Fort Dodge Laboratories, ZDA). Vsa zaporedja so primerjali z objavljenim nukleotidnim zaporedjem seva EAVUtr, ki so ga den Boon in sod. (1991) pridobili v laboratoriju iz originalnega izolata Bucyrus.

Na podlagi filogenetskih analiz avtorji ugotavljajo, da se izolati virusa EAV uvrščajo v štiri filogenetske skupine, ki vključujejo dve severnoameriški (NA₁ in NA₂) in dve evropski (E₁ in E₂) skupini. V prvo, večjo skupino NA₁, se uvrščajo predvsem severnoameriški izolati, en evropski izolat PLD76, cepivni sev Arvac[®] in vsi laboratorijski sevi. Drugo, manjšo skupino, razvrščajo v tri podskupine. Podskupini NA₂ pripada izolat KY63 iz Severne Amerike; podskupini E₁ pripada evropski izolat SWZ64; podskupini E₂ pa pripadata dva evropska izolata AUT68 in ITA92 ter izolat AZ87. Slednji trije izolati so si med seboj bolj sorodni kot kateri koli izmed njih z izolati iz Severne Amerike ali z ostalima dvema evropskima izolatom SWZ64 in PLD76. Pripadnost izolata AZ87 evropski podskupini E₂, ki izhajajo iz skupnega prednika, je potrditel, da so se kobile v Arizoni leta 1986 okužile s tem sevom, ko so jih pripuščali k žrebcu, uvoženim iz Poljske.

V nadaljnjih filogenetskih raziskavah so si Stadejek in sod. (1999) prizadevali, da bi v analize vključili čim več izolatov EAV z različnim geografskim poreklom. V obsežni filogenetski študiji so ugotavljali evolucijske sorodstvene odnose med 43 izolati iz Amerike in Evrope, ki so jih zbirali več kot 4 desetletja. Pri analizi so uporabili tudi 22 sekvenc iz genske banke GenBank. Na podlagi sekvenc gena ORF5 so izolate virusa EAV ločili v dve skupini. Skupina I zajema predvsem izolate iz področja Severne Amerike, medtem ko v skupino II uvrščajo večino evropskih izolatov. Obe večji skupini se delita v podskupine. V ameriških podskupinah IA in IB so poleg referenčnega seva Bucyrus izolati iz Kanade, Nove Zelandije

in evropska izolata NL1 (Nizozemska, 1987) in GB2 (Velika Britanija, 1996). Skupino II so razdelili na tri podskupine IIA, IIB in IIC z naslednjimi najstarejšimi predstavniki podskupin: izolat A1[Vienna] (Avstrija, 1968), izolat F3 (Francija, 1986) in izolat I1 (Italija, 1990/1991). V podskupini IIA prevladujejo izolati iz Avstrije, Francije, Nemčije, Italije, Poljske in Velike Britanije. Podskupina IIB vključuje izolate iz Francije, Nemčije, Italije in Norveške, medtem ko v podskupino IIC sodijo italijanski in poljski izolati virusa EAV.

Neskladnost med geografskim izvorom izolatov virusa EAV in njihovim filogenetskim položajem v drevesu (npr. prisotnost »ameriških« izolatov USA8 in USA18 v evropski skupini II) je posledica transporta žrebcev okuženih z virusom EAV iz Evrope v Ameriko in obratno.

Filogenetski položaj določenih izolatov EAV je še vedno nepojasnen. V primerjalnih analizah sekvenc genov za GP₅ in odseka gena ORF1b, ki kodira virusno replikazo, se je izkazalo, da sta seva CH1[Bibuna] (Švica, 1964) in S1 (Švedska, 1989) evolucijsko dovolj oddaljena od skupin I in II, da ju obravnavajo kot zunanjika (*angl. outgroup*).

Madžarski epizootiologi so leta 2005 objavili svoje filogenetske analize, v katerih je dokazan obstoj nove podskupine IID, kamor uvrščajo madžarske seve, ki so jih izolirali do leta 2000. Madžarski sevi se v nukleotidnem zaporedju gena ORF5 razlikujejo od referenčnega seva Bucyrus za 9–18 %. Po letu 2000 so ugotovili povečano število abortusov, katerih povzročitelji sodijo v ameriški podskupini virusov IA in IB ter evropski podskupini IIA in IIB. Izvor okužbe so potrdili z anamnestičnimi podatki. Domači žrebci so se okužili v tujini ali pa so lastniki uvozili že perzistentno okužene živali (Hornyák in sod., 2005).

Virus EAV lahko v dovzetni čredi konj sproži izbruh bolezni, ki ga ne moremo napovedati vnaprej, kot tudi ne moremo napovedati, v katero smer se bo virus spreminjal. Zato si evropski znanstveniki prizadevajo, da bi se pri presoji genetske variabilnosti virusa EAV osredotočili na analizo aktualnih sevov (Mittelholzer in sod., 2006), ki v evropskem prostoru trenutno dajejo največ informacij. Mittelholzer in sod. (2006) so v okviru evropskega projekta FAIR (PL98-4123) v do zdaj najbolj obsežni in izčrpni filogenetski analizi opredelili sorodstvene odnose med več kot 200 trenutno znanimi izolati virusa EAV. Po eni strani se je izkazalo, da bipolarna razdelitev izolatov virusa EAV na ameriške in evropske seve, kot so jo predlagali avtorji predhodnih filogenetskih raziskav, ni dovolj jasna, po drugi strani pa so z vključitvijo tako velikega števila izolatov, ki se ločujejo v nove skupine, izboljšali resolucijo filogenetskih dreves. Na podlagi novejših dognanj iz področja molekularne filogenije virusov

EAV tako razlikujemo tri genetske skupine: EAV-1 (prej IIA), EAV-2 (prej IA in IB) in EAV-3 (prej IIB), ki imajo s statistično analizo »bootstrap« na vozliščih dokazano visoko vrednost ponovljivosti. Nekatere zelo variabilne sekvence iz Južne Afrike, Madžarske, Švedske in starejše izolate virusa EAV niso uvrstili v nobeno od treh obstoječih genetskih skupin. V skupino EAV-1 so opredelili le evropske izolate, v skupino EAV-2 večino ameriških izolatov, medtem ko so v tretji genetski skupini EAV-3 zastopani sevi, ki so jih izolirali v Evropi kot tudi sevi, ki so povezani z izbruhi v Severni Ameriki, katere so povzročili iz Evrope uvoženi žrebci (Mittelholzer in sod., 2006).

Balasuriya in sod. (1995b) so z analizo aminokislinskih zaporedij odkrili, da se v proteinu GP₅ nahajajo tri variabilna področja (V₁ [61-121], V₂ [141-178], V₃ [202-222]) in štiri ohranjena področja (C₁ [19-60], C₂ [122-140], C₃ [179-201] in C₄ [223-255]). Mnoge nukleotidne zamenjave, ki privedejo do zamenjave aminokislin v regiji V₁, se najpogosteje dogajajo na mestih aminokislin 61-62, 67-90, 100-106 in 118-121 (Stadejek in sod., 1999). Čeprav obstajajo med sevi virusa EAV precejšnje razlike v aminokislinskih zaporedjih glikoproteina GP₅, so vse antigenske različice tudi serološko določljive, kajti poznan je le en serotip virusa EAV (McCollum, 1969; Mumford, 1985). S specifičnim poliklonskim serumom proti virulentnemu sevu Bucyrus so uspešno nevtralizirali vse do zdaj poznane izolate virusa EAV (Balasuriya in sod., 1997; Balasuriya in sod., 1998; Balasuriya in sod., 1999a; Balasuriya in sod., 1999b; Balasuriya in sod., 2004a; Balasuriya in sod., 2004c; Hedges in sod., 1999b; Westcott in sod., 1995). Obstoj antigenih različic virusa EAV potrjuje tudi ugotovitev, da se nevtralizacija nekaterih izolatov virusa EAV lahko doseže le ob prisotnosti komplementa (Fukunaga in McCollum, 1977; Hyllseth in Pettersson, 1970; Radwan in Burger, 1973a; Radwan in sod., 1973; Radwan in Crawford, 1974).

2.2.8 Biološke značilnosti virusa EAV

Patogenost

Poleg tega, da so časovno in lokalno oddaljeni sevi virusa EAV genetsko različni (Balasuriya in sod., 1995b; Balasuriya in sod., 1997; Murphy in sod., 1988; Murphy in sod., 1992), so tudi spremenljivi v svoji patogenosti (Timoney in McCollum, 1993). Patogenost različnih sevov virusa EAV so določili neposredno z biološkim poizkusom na konjih oziroma glede na

klinično sliko, ki se v odvisnosti od virulence virusa EAV različno izraža (Moore in sod., 2003a).

Številni raziskovalci sistematično preiskujejo kandidatne gene povezane z virusno patogenostjo. Toda ključnega genetskega mehanizma, ki določa virulentni fenotip, še niso odkrili (Project FAIR6-CT98-4123, Equine viral arteritis: virulence and immunity, MAFF project code SE0750, Veterinary Laboratories Agency, Weybridge; Balasuriya in sod., 2007). Dolga leta je zlasti med veterinarji veljalo mnenje, da je virus EAV izredno patogen za konje. Napačna predstava o virulenci virusa EAV izvira iz dejstva, da je v veterinarski literaturi bolezen največkrat opisana s hudo klinično sliko in spremljajočo 50–60-odstotno smrtnostjo, ki so jo eksperimentalno povzročili z zelo virulentno laboratorijsko različico seva Bucyrus (Timoney in McCollum, 1993). Virologi še niso izolirali »divjega« seva virusa EAV, ki bi bil tako patogen za breje kobile kot sev Bucyrus, zaradi katerega je leta 1953 v okuženi čredi abortiralo 50 % kobil (Bryans in sod., 1957b). Na terenu so razširjene predvsem okužbe z nizko patogenimi sevi virusa EAV, ki potekajo subklinično, saj pride pri okuženih konjih le do serokonverzije (Glaser in sod., 1996; Glaser in sod., 1997; Hullinger in sod., 1998; McCollum in Timoney, 1999; Patton in sod., 1999; Timoney in McCollum, 1993).

Razlike med sevi virusa EAV se kažejo tudi v resnosti poteka bolezni pri konjih okuženih s tem virusom (Balasuriya in sod., 1998; Balasuriya in sod., 1999a; Balasuriya in sod., 1999b; Balasuriya in sod., 2002a; McCollum in sod., 1999; Murphy in sod., 1992; Patton in sod., 1999; Timoney in McCollum, 1993). Potek bolezni pri naravnih okužbah konj je odvisen od starosti in splošne kondicije živali, in tudi od lastnosti samega virusa: virulence ter količine vnesenega virusa in načina njegovega prenosa (MacLachlan in sod., 1996; Moore in sod., 2002; Patton in sod., 1999). Okužbe s sevi virusa EAV, ki se pojavljajo na terenu, najpogosteje potekajo subklinično (Timoney in McCollum, 1993) ali kot rahla vročinska bolezen (McCollum in Timoney, 1984; McCollum in sod., 1999). V poteku okužbe z virulentnimi sevi virusa EAV se lahko pojavijo sistemski bolezenski znaki kužnega arteritisa, ki so odraz prizadetosti arteriol (Bryans in sod., 1957a; Estes in Cheville, 1970; Jones in sod., 1957; MacLachlan in sod., 1996). Možno je, da pride do abortusa pri brejih kobilah, ki so se okužile z virusom EAV. Do abortusa lahko pride brez spremljajočih kliničnih znakov med 3. in 10. mesecem brejosti (Cole in sod., 1986; Bryans in sod., 1957a; Bryans in sod., 1957b; Golnik in sod., 1981; McCollum in Timoney, 1984). Čeprav je bolezen med konji endemična in izbruhi kužnega arteritisa niso pogosti (Timoney in McCollum, 1997), je z vidika

nevarnosti in tveganj za pojav abortusa pri brejih kobilah treba vsako okužbo z virusom EAV obravnavati kot enega izmed možnih vzrokov za njegov nastanek (Timoney, 2002).

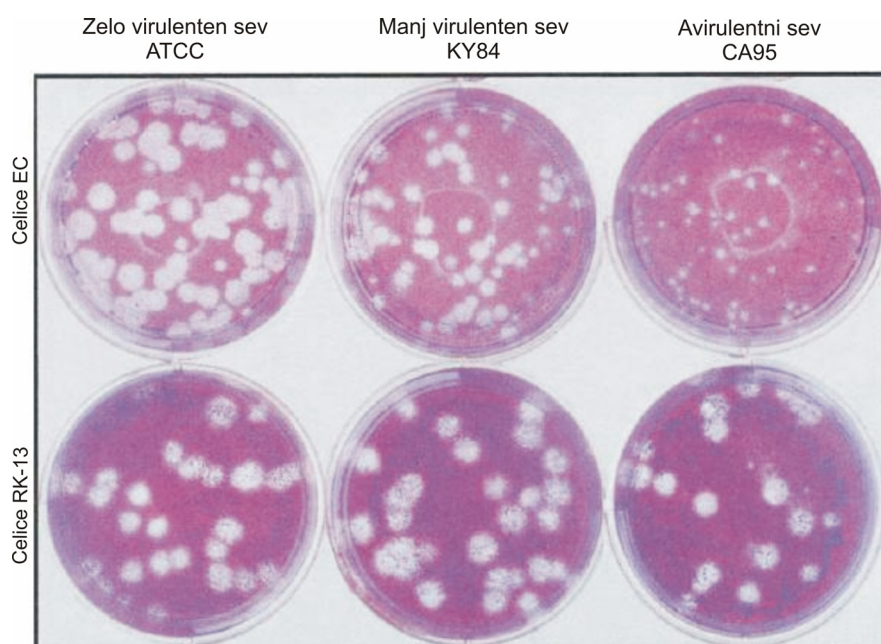
Virusni tropizem in kinetika rasti

Virus EAV se uspešno razmnožuje v primarnih celičnih kulturah iz konjskih (McCollum in sod., 1961), kunčjih (McCollum in sod., 1962a) in hrčkovih ledvičnih celic (Wilson in sod., 1962). Prav tako se razmnožuje tudi v celičnih linijah. Za izolacijo virusa EAV v laboratorijih najpogosteje uporabljajo celične linije RK-13 (RK, *angl. rabbit kidney*), BHK-21 (BHK, *angl. baby hamster kidney*), NBL-6 (*angl. equine dermis*) in Vero (*angl. african green monkey kidney*) (de Vries in sod., 1996). Virus EAV povzroča v celičnih kulturah citopatski efekt, ki je posledica propada celic zaradi nekroze (Moore in sod., 2002; Moore in sod., 2003a) in/ali apoptoze (Archambault in St-Laurent, 2000; St-Louis in Archambault, 2007). Celične linije so različno občutljive za virus EAV (Konishi in sod., 1975). Med razmnoževanjem virus EAV celice značilno okvari. Približno 10–12 ur po inokulaciji virusa postanejo okužene celice okroglaste in se ločijo od podlage (Bürki, 1965; Konishi in sod., 1975; McCollum in sod., 1961; McCollum in sod., 1962a).

Z opazovanjem citopatskega efekta lahko določimo kinetiko rasti virusa EAV v celični kulturi. Hitrost rasti virusa EAV je odvisna od celične linije in temperature inkubacije. Znano je, da se 6–8 ur po okužbi pri temperaturi 35–37 °C iz okuženih celic začnejo sproščati prvi virioni. Cikel razmnoževanja virusa EAV v celični kulturi traja 10–20 ur (Maess in sod., 1970; van Berlo in sod., 1982).

Z namenom, da bi ugotovili determinante za virulenco virusa EAV, so Moore in sod. (2002) primerjali kinetiko rasti virulentnih in avirulentnih sevov virusa EAV. Opazovanja so pokazala, da sta časovni pojav in obsežnost citopatskega efekta v primarni celični kulturi konjskih endotelnih celic EEC odvisna od virulence seva virusa EAV. Avirulentni sev virusa EAV (CA95) je povzročil le delno poškodbo celičnega sloja. Liza celic je nastopila pozneje kot pri virulentnih sevih virusa EAV (ATCC, KY84). Poleg tega sta se virulentna seva razmnoževala hitreje, pri čemer sta v enakem časovnem obdobju ustvarila večje število virionov. Virulentni sev ATCC je po 24 urah inkubacije dosegel titer 10^8 PFU (*angl. plaque-forming units*)/ml plakotvornih enot v mililitru suspenzije virusa, medtem ko je bil titer avirulentnega seva CA95 1000-krat manjši (Moore in sod., 2002).

Če pri izolaciji virusa EAV gojišču dodamo karboksimetilcelulozo ali agarozo, ki pri določeni temperaturi polimerizirata, virusu otežimo okuženje vseh celic. Polymer ustvari tridimenzionalno strukturo, ki prepreči prosto difuzijo virusa v gojišču. Virus povzroči okvare celičnega sloja v obliki plakov. Vsaka poškodba celičnega sloja je posledica razmnoževanja enega samega virusnega delca, ki jo po barvanju z vitalnim barvilom lahko vidimo s prostim očesom kot okroglo ostro omejeno področje, ki mu pravimo plak. Agarosa nam omogoča boljšo ločitev plakov, kar nam olajša štetje plakov pri določevanju titra virusa EAV (Bürki, 1965; Fukunaga in sod., 1981; Hyllseth in sod., 1969; Konishi in sod., 1975; Maess in sod., 1970; McCollum in sod., 1962a; McCollum, 1970; Radwan in Burger, 1973a; van Berlo in sod., 1980). Postopek izolacije virusa EAV z gojiščem, ki vsebuje agarozo, je omogočil dovršen del raziskav na področju določanja virulence virusa EAV *in vitro*. Velikost plaka je fenotipska lastnost virusa, na podlagi katere seve virusa EAV razlikujemo po virulenci. Virulentni sevi virusa EAV so bolj litični in zato v celični kulturi povzročajo nastanek večjih plakov, katerih premer znaša približno 2–3 milimetre. Za manj virulentne in avirulentne seve pa so značilni plaki s premerom manjšim od dveh milimetrov (Slika 2-17).



Slika 2-17: Razlike v morfologiji in velikosti plakov med tremi različnimi sevi virusa EAV (ATCC, KY84 in CA95). V jamicah zgornje vrstice so izolate virusa EAV gojili v primarni celični kulturi iz endotelnih celic (EC), ki so jih pridobili iz konjske pljučne arterije, v jamicah spodnje vrstice pa so izolate gojili v celični kulturi RK-13. Povzeto po: Moore in sod. (2002).

Na ta način lahko s plaki napovemo patogenost izolatov virusa EAV *in vitro*, ki pa ne sovпада nujno z dejansko patogenostjo *in vivo*. Za objektivno napoved patogenosti nekega seva EAV bi bilo treba izvesti biološki poskus. Ta je lahko etično sporen, časovno zamuden in drag (Moore in sod., 2002; Moore in sod., 2003a).

Perzistentna (trajna) okužba

Virus EAV lahko povzroči trajno okužbo spolnih organov le pri žrebcih. Kastrati, kobile in žrebčki nikoli ne postanejo kronični nosilci virusa (Timoney in McCollum, 1993). Žrebci, ki se običajno okužijo po respiratorni poti, razvijejo v krvi visok titer nevtralizacijskih protiteles. Po akutnem obdobju bolezni navadno ostaja 30–60 % serološko pozitivnih živali perzistentno okuženih z virusom EAV (McCollum in sod., 1994; Neu in sod., 1988; Timoney in McCollum, 1985; Timoney in sod., 1986a; Timoney in sod., 1987a). Perzistentna okužba poteka povsem brez kliničnih znakov bolezni (Clark, 1892; Pottie, 1888). Pri perzistentnih izločevalcih (PI) virus EAV ni prisoten v urinu, krvi in dihalih, temveč se izloča izključno s semenom (Timoney in McCollum, 1987). Izločanje virusa je lahko kratkotrajno (2–5 tednov), srednje dolgo (3–7 mesecev) in dolgotrajno. Kronično okuženi žrebci izločajo virus EAV s spermo več let, nekateri tudi vse življenje (Timoney in McCollum, 1985; Timoney in sod., 1986a; Timoney in sod., 1987a; Timoney in McCollum, 1993). Med posameznimi žrebci obstaja razlika v količini izločanega virusa s spermo, medtem ko je v zaporedno odvzetih vzorcih semena istega žrebca količina virusa dokaj konstantna (Little in sod., 1992; Timoney in sod., 1986b; Timoney in sod., 1987a). Virus EAV se v PI trajno ohranja v reproduktivnih organih. Razmnoževanje virusa se odvija v akcesornih spolnih žlezah in v ampulah semenovodov (Fukunaga in sod., 1992; Neu in sod., 1988). Mehanizem, ki omogoča perzistenco virusa EAV, ni dokončno razjasnjen (Glaser in sod., 1997). Mnogi avtorji navajajo, da je za kontinuirano reinfekcijo celic spolnega trakta potreben testosteron (Little in sod., 1992; McCollum in sod., 1984). Učinek androgenov na reproduktivni trakt najverjetneje vključuje imunosupresijo in povečano sprejemljivost celic za okužbo z virusom EAV (Holyoak in sod., 1993a; Holyoak in sod., 1993b). Brezuspešni poizkusi, da bi kastrate in žrebčke pred puberteto trajno okužili z virusom EAV, vsekakor kažejo na odločilni pomen testosterona za vzpostavitev in vzdrževanje perzistentne okužbe pri spolno zrelih žrebcih (Fukunaga in sod., 1994; Holyoak in sod., 1993a; McCollum in sod., 1994).

V semenu PI prevladujejo genetske različice virusa EAV, ki so adaptirane na reproduktivni trakt (Patton in sod., 1999). V celicah reproduktivnega trakta pride občasno do selektivnega razmnoževanja virulentnih variant (Balasuriya in sod., 1999a), ki se lahko neposredno z dotikom prenesejo na dovzetne živali in v čredi sprožijo izbruh (McCollum in sod., 1999). Izbruhi so rezultat periodičnega pojavljanja genotipskih in fenotipskih variant virusa EAV, ki imajo boljšo sposobnost razmnoževanja v respiratornem traktu. Med konji kroži dominantni sev virusa EAV, ki kljub večkratnim horizontalnim prenosom z aerosolom med izbruhom ostaja genetsko stabilen (Balasuriya in sod., 1999a).

V teku so preučevanja vplivov glikozilacije na biologijo različnih virusov. Funkcija *N*-vezanih oligosaharidov na različnih virusnih glikoproteinih je različna (Vigerust in Shepherd, 2007). Vsekakor je glikozilacija pomembna za virulenco arterivirusov in patogenezo okužb, ki jih povzročajo (Balasuriya in sod., 1999a).

Povečana nevrovirulenca je pri virusu LDV-C in LDV-v povezana z izgubo mest za *N*-glikozilacijo v membranskem proteinu VP-3. Nasprotno pa se glikozilacija vseh treh mest pri LDV-P kaže s trajno okužbo makrofagov, ki poteka brez nevroloških znakov (Anderson in sod., 1995; Faaberg in sod., 1995; Plagemann, 1996).

Znano je, da število *N*-vezanih oligosaharidov v različnih strukturnih proteinih virusov EAV variira (Balasuriya in sod., 1999a). Predvidevajo, da variacije v vsebnosti oligosaharidov olajšajo prenos in perzistenco virusov EAV, vendar pomena glikozilacije za pojav razlik v virulenci in tropizmu med sevi virusa EAV še niso povsem razjasnili (Zhang in sod., 2007).

2.3 EPIZOOTIOLOŠKE ZNAČILNOSTI VIRUSA EAV

Virus EAV je razširjen po vsem svetu. Leta 1953 so spoznali, da je za etiologijo tega respiratornega obolenja pri konjih odgovoren virus EAV, ki je v kraju Bucyrus (zvezna država Ohio) med ameriškimi kasači povzročil izbruh kužnega arteritisa v epizootski razsežnosti (Bryans in sod., 1957a). V času epizootije so se v vzrejališču pojavili klinični znaki obolenja dihal in abortusi pri kobilah (Bryans in sod., 1957b). Pred tem so etiologijo kužnega arteritisa večkrat zamenjali z drugimi respiratornimi povzročitelji bolezni, kot so virus konjske influence in virus konjskega rinopneumonitisa, na katere je treba posumiti, ko z diferencialno diagnostiko izključujemo podobne bolezni (Timoney in sod., 1957b).

Kužni arteritis kopitarjev je bil uradno potrjen v večini držav članic Evropske unije, v republikah bivše Jugoslavije, v Švici, Afriki, Aziji, Novi Zelandiji, Avstraliji, na Japonskem ter v Severni in Južni Ameriki (Chirnside, 1992; de Vries in sod., 1996; Glaser in sod., 1997; MacLachlan in Balasuriya, 2006; Timoney in McCollum, 1993). Za okužbo so dovzetni vsi pripadniki družine *Equidae*. Protitelesa proti virusu EAV so dokazali pri konjih, oslih, mulah in zebrah (McCollum in sod., 1995; Paweska in Barnard, 1993; Paweska in sod., 1995; Paweska in sod., 1997). Stopnja prekuženosti živali z virusom EAV je različna tako med posameznimi državami kot med različnimi pasmami konj in narašča s starostjo (Bürki in sod., 1992). Serološke raziskave kažejo, da se je v ZDA prekužilo že več kot 85 % ameriških kasačev in manj kot 5 % angleških polnokrvnih in arabskih konj (Hullinger in sod., 2001). Med pasmo ameriški kasač je virus EAV endemičen (McCollum in Bryans, 1973; Moraillon in Moraillon, 1978).

S serološkimi preiskavami so prekuženost z virusom EAV potrdili tudi v številnih evropskih državah. V Avstriji je bilo leta 1996 okuženih 27,3 % konj, v Italiji pa 25 %. V Nemčiji so leta 1994 odkrili 24,85 % seroloških reaktorjev. Na Švedskem so v obdobju od leta 1994 do leta 1995 dokazali prisotnost protiteles proti EAV v serumu 33 % švedskih kasačev in pri 15 % švedskih toplokrvnih konjih (EC Fair project PL98-4123, <http://eaveu.com/background.html>).

Čeprav je virus EAV med konji stalno navzoč, obstajajo številni primeri, pri katerih akutna okužba poteka brez kliničnih znakov (Collins in sod., 1987; Timoney in McCollum, 1985; Timoney in McCollum, 1988), zaradi česar klinično kužnega arteritisa kopitarjev ni vedno mogoče ugotoviti.

Že leta 1888 so pravilno sklepali, da je v semenski tekočini nekaterih žrebcev prisoten infektivni agens (Bergman, 1913; Clark, 1892; Pottie, 1888). Skoraj sto let pozneje, ko so leta 1984 v Severni Ameriki opisali prvi izbruh kužnega arteritisa med angleškimi polnokrvnimi konji (Timoney, 1985), so tudi prvič potrdili pomen spolnega stika pri širjenju virusa EAV. Po epizootiji v Kentuckyju je približno tretjina vseh serološko pozitivnih žrebcev ostala trajno okužena z virusom EAV (Timoney in McCollum, 1985; Timoney in sod., 1986a). Ugotovili so, da PI izločajo virus EAV s semenom in ga po venerični poti prenašajo na kobile (Little in sod., 1992; Timoney in McCollum, 1985; Timoney in sod., 1987a; Timoney in sod., 1987b; Timoney in McCollum, 1988). Virus EAV se je med dovzetnimi kobilami prenesel aerogeno in pri brejih kobilah povzročil abortuse. Šele tedaj so se rejci v ZDA začeli zavedati

ekonomskih posledic abortusov, ki bi se jim lahko izognili z aktivno imunizacijo. McCollum je pripravil poskusno modificirano živo cepivo proti virusu EAV že leta 1961 (Doll in sod., 1968; McCollum in sod., 1961; McCollum in sod., 1962a, McCollum in sod., 1962b; McCollum, 1969), vendar ga v tistem času še niso izdelovali za javno uporabo. Cepivo Arvac[®] je pridobil iz seva Bucyrus, ki ga je oslabil z večkratnimi pasažami v celičnih kulturah konjskih in kunčjih ledvičnih celic ter konjskih kožnih celic (HK-131/RK-111/ED-24). S cepivom Arvac[®] so leta 1984 uspešno zatrli izbruh kužnega arteritisa kopitarjev v Kentuckyju in zvezni državi New York. Zadnja leta vakcino Arvac[®], ki jo podjetje Forte Dodge Animal Health (Iowa, ZDA) trži že od leta 1985, uspešno uporabljajo v ZDA in Kanadi. Medtem ko so nekatere evropske države pri implementaciji programov izkoreninjenja KAK uvedle cepljenje z mrtvo vakcino. Inaktivirana vakcina Artervac[®] (Forte Dodge Animal Health, Iowa, ZDA) je registrirana na Danskem, v Franciji, Nemčiji, na Irskem, Švedskem in v Veliki Britaniji (OIE).

Kljub splošno uveljavljenemu mnenju, da današnji sevi virusa EAV veljajo za manj virulentne ali celo avirulentne, še vedno prihaja do izbruhov KAK (Larsen in sod., 2001; Szeredi in sod., 2003). Letalski promet, ki omogoča hiter in enostaven transport tudi na daljše razdalje, ustvarja ugodne pogoje za širjenje virusa. Na ta način se je virus EAV razširil na vse celine. Živahni trgovinski stiki in skupna kmetijska politika so povzročili, da se je virus razširil tudi po Evropi. V državah, ki mejijo na Slovenijo, se je povečalo število abortusov povezanih z virusom EAV. Bolezen je stalno prisotna v reji konj lipicanske pasme v Avstriji (First Symposium of equine viral arteritis, Utrecht 1996) in na Madžarskem, kjer je v obdobju od leta 1998 do 2000 prišlo do epidemije abortusov (Szeredi in sod., 2005). Bolezen so uradno potrdili tudi v širšem evropskem prostoru, ko je prišlo do izbruha v Španiji (1992), v Nemčiji (1995), na Švedskem (1995), na Danskem (1997) in v Veliki Britaniji ter na Irskem, kjer so oktobra 2004 potrdili zadnji primer te bolezni.

V Sloveniji izvajamo serološko testiranje konjev na KAK od leta 1993, ko je bila v Virološkem laboratoriju Nacionalnega veterinarskega inštituta vpeljana prva serološka diagnostična metoda za določanje protiteles proti virusu EAV v krvi. V Sloveniji so v letih od 1993 do 1995 v seroepizootiološki študiji preiskali 370 krvnih vzorcev žrebcev v naravnem pripustu in ugotovili, da je tudi v Sloveniji med populacijo konj razširjen virus EAV. Leta

1993 so okužbo z virusom EAV potrdili pri 14,2 % žrebcev, leta 1994 je bilo odkritih 9,7 % pozitivnih žrebcev, leta 1995 pa 8,5 % (Hostnik in Grom, 1996).

V letu 2000 je bilo pregledanih 761 vzorcev krvi, od tega jih je 159 reagiralo pozitivno na KAK. V letu 2001 je od 345 pregledanih vzorcev serološko reagiralo pozitivno 72 živali (Veterinarska uprava Republike Slovenije, 2002).

Že od leta 1995 naprej se v okviru rutinskih diagnostičnih preiskav preverja serološki status vseh živali v reji A na slovenskem Krasu. Serumi so bili odvzeti različnim kategorijam konjev: plemenskim žrebcom in kobilam, delovnim konjem, mladim konjem in žrebetom. Odstotek serološko pozitivnih živali vsa ta leta niha med 70 in 85 %, odvisno od kategorije živali, ki so bile zajete v serološke preiskave. Plemenski žrebci predstavljajo najbolj okuženo kategorijo živali. Okuženost z virusom EAV je pri žrebcih letnikov 2001 in 2002 dosegla 97 % (Računsko sodišče Republike Slovenije, Revizijsko poročilo o poslovanju reje A v letih od 2001 do 2003, Številka: 1207-1/2003-25, Ljubljana, 22. decembra 2004).

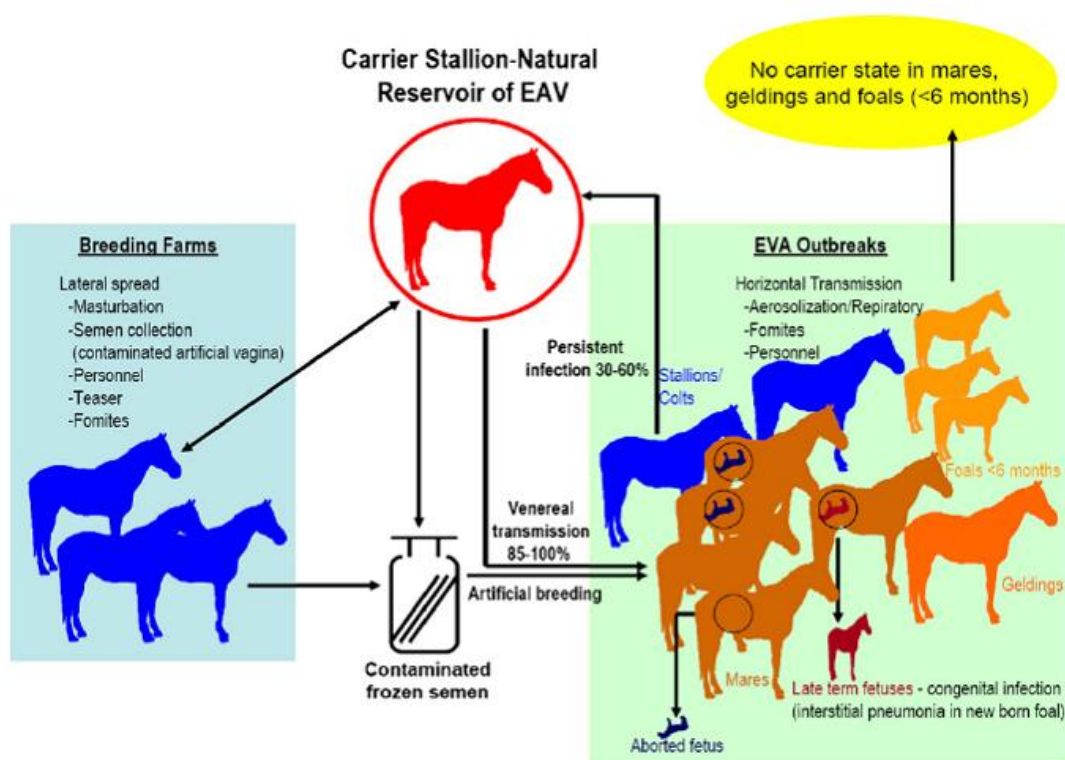
Rezultati seroloških preiskav, ki smo jih v Slovenji opravili v obdobju od 2002 do 2007, kažejo naraščanje laboratorijsko potrjenih primerov KAK. Kljub temu v Sloveniji pri kopitarjih še nismo ugotovili nobenega primera s klinično zaznavno obliko te virusne bolezni.

2.3.1 Prenos virusa EAV

Neposredni stik z aerosoli izločkov respiratornega trakta iz akutno okuženih živali je najpomembnejši način širjenja virusa EAV v vzrejališčih, na tekmah, razstavah in klinikah, kjer je tveganje za okužbo pri konjih največje, saj prihaja do združevanja večjega števila živali (Bürki in sod., 1992; Bryans in sod., 1957a; McCollum in sod., 1971; McCollum in Swerczek, 1978; Timoney in McCollum, 1993; Timoney in McCollum, 1997). Ta način prenosa predstavlja primarno pot razširjanja virusa EAV med konji po svetu (Timoney in McCollum, 1993). Virus se iz respiratornega trakta izloča približno od 7 do 14 dni (McCollum in sod., 1971). V akutni fazi bolezni se okužba širi tudi s krvjo, urinom, blatom, izcedkom iz vagine in semenom plemenjakov (Fukunaga in sod., 1981; McCollum in Timoney, 1984; Neu in sod., 1988; Timoney in McCollum, 1993). Žrebci, ki ne postanejo PI, prenehajo izločati virus EAV s semenom sedemnajsti dan po eksperimentalni okužbi (Neu in sod., 1988).

Možen je tudi posreden prenos virusa EAV od enega do drugega konja s kontaminirano opremo (brzda), orodjem, s pripomočki za nego konj, z obleko ljudi in s prevoznimi sredstvi (Collins in sod., 1987; Timoney in McCollum, 1986; Timoney in McCollum, 1993). Potencialni vir kužnega aerosola je tudi z žrebčevim masturbatom kontaminirana stelja (Bürki in sod., 1992), s katero se virus EAV lahko razseje po staji. Vsekakor je pri vseh od naštetih možnosti za horizontalno širjenje virusa EAV med konji potreben tesnejši stik s kužnino, iz katere se infektivni delci razpršijo v zrak (Collins in sod., 1987; Timoney in McCollum, 1987).

Virus EAV se prenaša tudi s spolnim stikom z okuženega žrebca na kobilo. Za razširjanje okužbe je pomemben žrebec, ki preboleva KAK z razvito klinično sliko, kot tudi PI, ki je brez simptomov in izloča virus EAV izključno s semenom. PI je najpomembnejši epidemiološki rezervoar virusa EAV (Timoney in sod., 1987a; Timoney in McCollum, 1993). Virus EAV se prenese s PI na kobilo s semenom pri naravnem pripustu ali z osemenjevanjem. Po venerični poti se z virusom EAV okuži od 85 do 100 % kobil, ki se še nikoli niso srečale z virusom. Do serokonverzije pride predvidoma v 28 dneh po okužbi (Timoney in McCollum, 1985; McCollum in sod., 1988). Okužba breje kobile v začetnem obdobju brejosti navadno povzroči abortus (Coignoul in Cheville, 1984; Bryans in sod., 1957a; Bryans in sod., 1957b). Če se brejost kobile zaradi okužbe z EAV konča z abortusom, so fetus, placenta in amnijska tekočina vir kužnega aerosola (Cole in sod., 1986; Bryans in sod., 1957b). Prirojena okužba žrebet je posledica prenosa virusa EAV preko placente v plod v poznem obdobju brejosti (Vaala in sod., 1992). Okužbe pri novorojenih žrebetih večinoma potekajo kot fulminantna intersticijska pljučnica ali kot fibronekrotični enteritis (Timoney in McCollum, 1993). Izid kongenitalne okužbe žrebet je lahko tudi smrt (Del Piero in sod., 1997; Freeman in sod., 1989; Golnik in sod., 1981; Vaala in sod., 1992; Wilkins in sod., 1995). Na sliki 2-18 so prikazani pglavitni načini prenosa virusa EAV med konji.



Slika 2-18: Prenos virusa EAV. Povzeto po: Holyoak in sod. (2008).

2.4 PATOGENEZA IN PATOMORFOLOŠKE SPREMEMBE PRI OKUŽBI Z VIRUSOM EAV

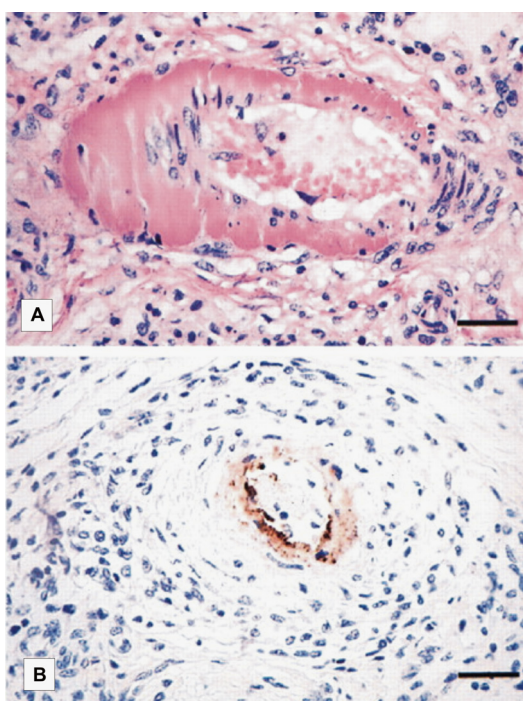
Približno štiriindvajset ur potem, ko virus EAV vstopi v dihala, vdre v epitelijske celice sluznice in v alveolarne makrofage. Drugi dan po okužbi je virus prisoten v bronhialnih bezgavkah. Tretji dan virus doseže krvni obtok. Med viremijo se virus širi po krvi prosto ali v makrofagih, ki so vključno z dendritičnimi in endotelijskimi celicami obtočil poglavitna tarča za razmnoževanje virusa EAV. Okužba zajame vsa telesna tkiva in tekočine z izjemo osrednjega živčevja, v katerega virus EAV ne prodre. Virus se zadržuje v periferni krvi in nazofarinksu približno od 3 do 19 dni (McCollum in sod., 1971).

Sekundarna mesta razmnoževanja virusa EVA so: v epitelijski nadledvičnih žlez in sapnic ter v epitelijskih celicah v jetrih, ščitnici, semenskih cevkah in ledvičnih kanalčkih. Približno osmi dan po okužbi EAV okuži mezotel in gladke mišične celice v tuniki mediji žil in miometriju. Redko ga najdemo v celicah črevesnih kript in v parenhimu jeter (Breese in McCollum, 1973; Crawford in Henson, 1973; Estes in Cheville, 1970; Lopez in sod., 1996; Timoney in McCollum, 1993). Če izvzamemo reproduktivni trakt z virusom EAV okuženih mladih žrebcev v puberteti in kronično okužene žrebce, je prisotnost virusa v drugih telesnih tkivih in

tekočinah mogoče dokazati le do osemindvajsetega dne po okužbi (Fukunaga in sod., 1981; Neu in sod., 1988).

Patomorfološke spremembe v tkivih konja, ki so ga eksperimentalno okužili z virulentnim sevom Bucyrus, so: edem, kongestija in krvavitev (Bryans in sod., 1957a; Jones, 1969; Jones in sod., 1957; Prickett in sod., 1973).

Za KAK je značilen sistemski panvaskulitis (MacLachlan in sod., 1996). Histopatološke spremembe so vidne v različnih organih in so najbolj izražene v žilah (Slika 2-19), ki te organe oskrbujejo.



Sliki 2-19 A in B: Histopatološke spremembe arterij mišičnega tipa pri žrebčku s KAK.

Slika 2-19 A: V mediji je prisotna fibrinoidna nekroza. Viden je perivaskularni edem z infiltracijo limfocitov. Svetlina žile je zožena. Merilo velikosti 80 μ m.

Slika 2-19 B: V steni žile je vidna nekroza intime in medije s perivaskularnim limfocitnim infiltratom in edemom. Temno rdeča področja v endoteliju in mediji označujejo prisotnost antigena virusa EAV, ki so ga dokazovali s hematoksilinom in avidin-biotin imunoperoksidaznim konjugatom. Povzeto po: Del Piero (2000a). Merilo velikosti 120 μ m.

Pri blagi obliki KAK so patološke spremembe vidne kot perivaskularni edem, v steni žil so posamezni infiltrati z limfociti, opazna je hipertrofija endotelnih celic. Pri hujši obliki KAK prevladuje nekroza, ki se začne z degenerativnimi spremembami endotelijskih celic v intimi.

Celice nabreknejo, njihova jedra postanejo piknotična in kariorektična. Nekrozi endotela sledi okvara in izguba lamine elastike interne. Poveča se prepustnost stene žil, kar omogoča centrifugalno širjenje virusa v medijo in adventicijo (Crawford in Henson, 1973; Henson in Crawford, 1974; Prickett in sod., 1973). Pri zelo hudem vnetju se v mediji žile pojavi fibrinoidna nekroza in obsežna infiltracija z limfociti. Ta infiltracija sega tudi v edematozno adventicijo.

Značilne mikroskopske spremembe so vidne v pljučih, v limfatičnih organih, črevesju, ledvicah in koži. Pri histološkem pregledu pljuč opazimo intersticijsko pnevmonijo. V alveolah se nakopičijo makrofagi in nevtrofilni granulociti, prisotna je tekočina. Alveolarni pnevmociti hipertrofirajo in hiperplazirajo. V limfatičnih organih vidimo nekrozo limfatičnih foliklov, krvavitve in edem. V črevesju odraslih živali je v submukozi močno razširjeno limfatično tkivo. Opazen je propad epitela črevesnih kript, v propriji je izražena nekroza.

Pri žrebetih s pnevmoenteričnim sindromom so patološke spremembe izražene v kriptah, krvnih žilah in limfatičnem tkivu črevesja. V kolonu in cekumu so lahko prisotni infarkti.

Patološko spremembo, ki je v ledvicah vidna kot limfocitarni intersticijski nefritis, zaznamo še dolgo po preboleli bolezni. Epitel ledvičnih tubulov nekrotizira, ponekod se v svetlini tubulov pojavijo hialini cilindri.

Vnetne spremembe zajamejo tudi kožo. Karakterizira jih ulcerozni dermatitis (Del Piero, 2000a).

Mehanizem nastanka vaskulitisa je slabo raziskan. Vnetje žil je posledica direktnega citopatogenega učinka, ki nastane v endotelu in miocitih zaradi razmnoževanja virusa EAV (Del Piero, 1997). Študije nakazujejo, da so v patogenezo okužbe z virusom EAV vpletene CD8⁺ T celice, ki jih je na pretek v perivaskularnih infiltratih in so citotoksične za celice okužene z virusom EAV. Menijo, da citolitično delovanje CD8⁺ T celic pripomore k patološkemu dogajanju, ki jih opazujemo v različnih organih pri konjih okuženih z virusom EAV (Del Piero, 2000b).

Patogeneza abortusov zaradi okužbe z virusom EAV še ni dobro proučena. Najverjetneje gre za kombinacijo patoloških reakcij, ki jih virus EAV povzroči v materi in plodu. Sprva so menili, da je abortus posledica povečanega mehanskega pritiska na krvne žile zaradi edema in/ali zmanjšane izločanja progesterona iz placente pri hudem nekrotizirajočem miometritisu (Coignoul in Cheville, 1984; Bryans in sod., 1957b). Čeprav so opisani posamezni primeri abortusov, ko je nekrotizirajoči vaskulitis izražen v placenti, možganih,

jetrih, vranici in pljučih abortiranih žrebet (Johnson in sod., 1991), so makroskopske in mikroskopske lezije v plodu pogosto odsotne (Coignoul in Cheville, 1984; Bryans in sod., 1957a; Bryans in sod., 1957b; Jones, 1969; McCollum in Timoney, 1984). Danes patogenezo abortusov zaradi okužbe z virusom EAV pripisujejo stresu. Virus deluje na plod kot stresor, ki aktivira hipotalamo-hipofizno-nadledvično os in pri breji kobilici sproži abortus (MacLachlan in sod., 1996).

Tudi na moških spolnih organih nastanejo patološke spremembe. Pri eksperimentalno okuženih žrebčkih so ugotovili, da so te spremembe povezane s trajanjem KAK. V akutnem obdobju (7–14 dni po okužbi) KAK histološka slika kaže nekrozo stene žil v testisih, epididimisu, semenovodih ter pripadajočih ampulah in v akcesornih spolnih žlezah. Kronično perzistentni KAK pa označujejo fokalni limfo-plazmatski infiltrati v parenhimu reproduktivnih organov in ampulah semenovodov (Holyoak in sod., 1993).

V vseh organih so prizadete predvsem arterije mišičnega tipa, vene in limfne žile. Kljub temu da so poškodbe najbolj izrazite v tuniki mediji manjših arterij, so klinični znaki najverjetneje odraz nekroz v venah in limfnih žilah (Crawford in Henson, 1973). Slednje se povsem obnovijo sočasno z ozdravitvijo živali v dveh tednih, medtem ko sta za regeneracijo arterij potrebna dva meseca (de Vries in sod., 1996).

2.5 KLINIČNA SLIKA KAK

Epidemiološke študije so pokazale, da večina naravnih okužb z virusom EAV najpogosteje poteka povsem brez kliničnih znakov bolezni (McCollum in Bryans, 1973). Zlasti pri kobilah, ki jih okužijo PI, potekajo okužbe v subklinični obliki (Timoney in McCollum, 1993). Inaparentne okužbe lahko dokažemo le s serološkimi preiskavami (Collins in sod., 1987; McCollum in Bryans, 1973). Kakšna klinična slika se bo razvila, je odvisno od virulentnosti virusa EAV. Le v redkih primerih se izbruhi KAK izkazujejo s hudo klinično sliko, ki je značilna za eksperimentalne okužbe z zelo patogenim sevom Bucyrus, ko mortalnost lahko doseže tudi 60 % (MacLachlan in sod., 1996; Timoney in McCollum, 1993).

Klinični znaki akutnega obolenja se pojavijo v od 3 do 14 dneh, pri venerični okužbi pa inkubacija traja od 6 do 8 dni. Bolezen se začne z vročino (nad 41 °C), ki traja od 1 do 9 dni. Pojavijo se bolezenski simptomi: anoreksija, depresija, edem zadnjih okončin, vnetje očesnih veznic in edem vek, ki ju spremlja solzenje, vnetje nosne sluznice z izcedkom iz nosu,

urtikarija po koži na glavi, vratu in trupu, edem prepucija, skrotuma in mlečne žleze. Virus EAV lahko pri brejih kobilah povzroči abortus.

Opisane simptome imajo predvsem stare, podhranjene in bolne živali in živali z imunosupresijo.

V poteku akutnega obolenja se lahko pojavijo tudi: oteženo dihanje, kašljanje zaradi vnetja grla in/ali žrela, prizadetost prebavil, ki se kaže s kolikami, drisko in zaprtjem. Lahko se pridružijo še motna roženica, ki jo spremlja fotofobija ter submandibularna in submaksilarna limfadenopatija, vendar se ti simptomi ne manifestirajo pogosto (Bürki in Gerber, 1966; Clayton, 1987; Collins, 1987, Bryans in sod., 1957a; Bryans in sod., 1957b; Jones, 1969; McCollum in Swerczek, 1978; Timoney in McCollum, 1987; Timoney in McCollum, 1993).

Pireksija in levkopenija sta pri večini okužb z virusom EAV najbolj značilna znaka.

Pri naravni okužbi odraslih živali klinični znaki običajno izzvenijo, ko virus EAV ni več prisoten v krvi, smrtni primeri so redki. Hud potek, tudi s smrtnim izidom, je značilen pri žrebetih s progresivno bronhointersticijsko pnevmonijo in nekrozo črevesja (Carman, 1988; Golnik in sod., 1981; Vaala in sod., 1992).

Okužbi breje kobile z virusom EAV lahko sledi abortus, ki nastopi v pozni akutni fazi okužbe ali v začetku okrevanja. Navadno se pojavi od 10 do 33 dni po okužbi, kadar koli med tretjim in desetim mesecem brejosti. Pri nekaterih abortusih klinični simptomi pri brejih kobilah niso izraženi (Bryans in sod., 1957; Clayton, 1987; Cole in sod., 1986; Bryans in sod., 1957a; Bryans in sod., 1957b; Timoney in McCollum, 1993). Pri naravnih izbruhih KAK se abortusi pojavljajo pri 10 % okuženih kobil, lahko pa odstotek abortusov doseže tudi 60 % (Timoney in McCollu, 1990). Eksperimentalna okužba z virulentnim sevom KY84 je povzročila abortus pri 71 % okuženih kobil (Cole in sod., 1986). Vse kaže na to, da med sevi virusa EAV obstajajo razlike v virulentnosti in sposobnosti, da pri breji kobili povzročijo abortus (Timoney in McCollum, 1993).

2.6 IMUNSKI ODZIV NA OKUŽBO Z VIRUSOM EAV

Mehanizmi naravne protivirusne odpornosti so pri konjih slabo raziskani. Večino informacij, ki se nanašajo na pomen protivirusne naravne obrambe, so pridobili s študijami pri drugih živalskih vrstah.

Pri nespecifičnem imunskem odzivu sodelujejo makrofagi, celice ubijalke (celice NK) in z virusi okužene celice v sluznici respiratornega in reproduktivnega trakta, ki so prva obrambna črta pri naravni okužbi z virusom EAV. Virusna okužba spodbuja omenjene celice k izločanju citokinov. Ti citokini vključujejo interleukin-12 (IL-12), tumor nekrotizirajoči faktor- α (TNF- α) interferon- α , - β , in - γ (IFN- α , IFN- β in IFN- γ). Interferoni so med najpomembnejšimi nespecifičnimi protivirusnimi dejavniki. IFN- α izdelujejo predvsem makrofagi, IFN- β pa različne celice okužene z virusi. Najpomembnejši učinek teh interferonov je preprečevanje replikacije virusov v vseh celicah in okrepitev litičnega potenciala nespecifičnih efektorskih celic NK. Poleg tega zvečajo izražanje molekul MHC-I na neokuženih celicah, ki jih celice NK ne morejo uničiti. Kajti znano je, da celice NK delujejo protivirusno s porfirini le na tiste okužene celice, ki na svoji površini nimajo molekul MHC-I (Balasuriya in sod., 2004).

S poskusom izolacije virusa EAV v primarnih celičnih kulturah konjskih makrofagov so v gojišču dokazali prisotnost mediatorjev vnetja. Makrofagi so izdelovali velike količine citokinov: IL1 β , IL-6, IL-8 in TNF- α . Ugotovili so, da je sinteza citokinov odvisna od virulentnosti seva virusa EAV. Okužba makrofagov z virulentnim sevom KY84 je privedla do večjega prepisovanja specifičnih genov za citokine kot okužba z avirulentnim sevom CA95 (Moore in sod., 2003a, 2003b).

Pri protitelesnem imunskem odzivu na virus EAV se od enega do dveh tednov po okužbi v serumu pojavijo nevtralizacijska protitelesa in protitelesa, ki vežejo komplement (McCollum, 1970; Fukunaga in McCollum, 1977). Slednja dosežejo najvišjo raven po dveh do treh tednih in se izdelujejo še osem mesecev po okužbi, medtem ko nevtralizacijska protitelesa dosežejo najvišji titer od dva do štiri mesece po okužbi in se v serumu ohranijo mnogo let (Fukunaga in McCollum, 1977, Timoney in McCollum, 1993; Balasuriya in sod., 1999a; Balasuriya in sod., 1999b; Balasuriya in sod., 2002a).

Pri nekaterih konjih so s serološkimi metodami dokazali, da se količina nevtralizacijskih protiteles s starostjo živali povečuje, kar je najverjetneje posledica večkratnih ponovnih okužb z virusom EAV. Visok titer nevtralizacijskih protiteles ugotavljajo predvsem v serumu PI (Balasuriya in sod., 2004b).

Nevtralizacijska protitelesa so prisotna tudi v kolostrumu, njihov pomen pa so ugotavljali pri kliničnem opazovanju. Žrebeta, ki so pridobila protitelesa proti virusu EAV s pasivno imunizacijo, so bila zaščitena pred klinično obliko KAK (McCollum, 1976; Hullinger in sod., 1998). Pasivna nevtralizacijska protitelesa se v serumu žrebet pojavijo nekaj ur po napajanju

ali dojenju. Najvišji titer dosežejo pri starosti enega tedna, potem pa postopoma izginjajo in jih med drugim in šestim mesecem starosti običajno ne zaznamo več (Hullinger in sod., 1998).

Načini, s katerimi humoralni efektorski mehanizmi nevtralizirajo virus EAV, še niso povsem jasni. Na voljo so številni dokazi, da je za učinkovito nevtralizacijo virusa EAV potrebna prisotnost komplementa (Hyllseth in Peterson, 1970; Radwan in sod., 1973; Radwan in Burger, 1973a, 1973b; Radwan in Crawford, 1974). Od komplementa odvisna nevtralizacijska aktivnost protiteles proti virusu EAV je vezana na imunoglobuline razreda IgG v hiperimunem (konvalescentnem) serumu. Zanimivo je, da imunoglobulini razreda IgG in IgM, ki so prisotni v serumu v začetnem obdobju okužbe z virusom EAV, nimajo nevtralizacijske aktivnosti (Radwan in Burger, 1973a).

Radwan in Crawford (1974) sta predlagala naslednje mehanizme nevtralizacije virusa EVA:

- i. Zgodnje komponente komplementnega sistema (C1-C4) lahko prekrijejo pomembna mesta na virionu in tako sterično ovirajo pritrditev in vstop virusa v celico. Omenjeni proteini lahko tudi stabilizirajo kompleks antigenska determinanta-protitelo.
- ii. Pozne komponente komplementnega sistema (C5-C9) povzročijo imunoviolizo.
- iii. Protitelesa, ki so vezana na virion, lahko preprečijo pritrditev virusa na celico, vstop vanjo in zgodnje prepisovanje virusnega genoma (Dimmock, 1984; Dimmock, 1987; Klasse in Sattentau 2001; Klasse in Sattentau, 2002).

Čeprav je veliko manj znanega o celični imunosti, je videti, da ima pomembno vlogo pri uničevanju virusa EAV, saj se pri konjih kdaj pa kdaj zgodi, da po preboleli bolezni humoralni imunski odziv ne prepreči ponovne okužbe z virusom EAV (McCollum in sod., 1986).

2.7 PREPREČEVANJE ŠIRJENJA KAK

Ker specifičnega zdravljenja pri KAK ni (Timoney in McCollum, 1993), je preprečevanje izbruhov bolezni izredno pomembno. Preventiva sloni na ustreznih programih zaščitnega cepljenja v kombinaciji z izvajanjem ukrepov za preprečevanje širjenja virusa EAV. Vsekakor je treba identificirati PI, ki so odgovorni, da virus EAV perpetuira v okuženi čredi konj.

2.7.1 Imunoprofilaksa

Pred prvim cepljenjem morajo biti konji serološko negativni. Negativen izvid mora veterinarska organizacija še pred prvim cepljenjem vpisati v identifikacijski dokument živali. V krajih, kjer je KAK endemičen, se živali cepijo najmanj tri tedne pred pripustom. Za cepljenje konj proti virusu EAV se uporabljajo živa in inaktivirana cepiva.

Živa oslabljenega vakcina Arvac[®] vsebuje sev Bucyrus, ki je s serijskimi pasażami v celičnih kulturah izgubil virulenco (McCollum, 1969; McCollum, 1986). Cepivo apliciramo intramuskularno. V redkih primerih se kmalu po cepljenju pojavi prehodna limfopenija in kratkotrajna vročina. Hipertermija, ki pri cepljenih žrebcih povzroči prehodne spremembe v morfologiji spermijev, ne vpliva na plodnost (Timoney in sod., 1988). Virus EAV lahko sporadično izoliramo iz nazofarinksa in levkocitov periferne krvi od sedmega do dvaintridesetega dne po cepljenju (Harry in McCollum, 1981; McCollum, 1981; Fukunaga in sod., 1982; McKinnon in sod., 1986; Timoney in sod., 1988; Timoney in McCollum, 1993). Cepljeni žrebci ne izločajo virusa EAV s semenom in ne z urinom. Med drugim sta Timoney in McCollum (1993) dokazala, da se kobile, ki so jih pripustili pod aktivno imunizirane žrebce dva tedna po cepljenju, niso okužile z virusom EAV. V živi vakcini je oslavljen virus, ki se ne razmnožuje v reproduktivnem traktu cepljenega žrebca (de Vries in sod., 1996).

Z vakcino Arvac[®] ne cepimo brejih kobil in žrebet pred starostjo šest tednov. Zaradi dejstva, da cepivo ščiti žrebeta pred morebitno kronično okužbo z virusom EAV, je cepljenje žrebet v preventivi KAK izrednega pomena (Balasuriya in sod., 2004b). Žrebeta cepimo pred puberteto, stara šest mesecev, ko izgubijo zaščito maternalnih protiteles (McCollum, 1976; Hullinger in sod., 1998). Cepljenje žrebet, mlajših od šest mesecev je smiselno v času epidemij, ko je tveganje za okužbo z virusom EAV večje. Pri starosti šest mesecev je potrebno obnovitveno cepljenje (Balasuriya in sod., 2004b).

Nevtralizacijska protitelesa se pojavijo že peti do osmi dan po cepljenju in perzistirajo v krvi cepljenega konja najmanj dve leti (Timoney in sod., 1988). S poživitvenim odmerkom zagotovimo učinkovito zaščitno imunost za nekaj pripustnih sezon.

Konji, ki so prvič cepljeni proti KAK, so le delno zaščiteni. Cepljenje lahko prepreči klinično obliko KAK (McCollum, 1969; McCollum, 1986), ne pa ponovne okužbe s terenskim sevom virusa EAV kot tudi ne razmnoževanja virusa. V času ponovne okužbe je žival kužna in ostane izločevalka terenskega seva le kratek čas (največ deset dni) (McCollum in sod., 1988).

Da bi preprečili širjenje KAK iz okuženih živali na tiste, ki se še niso srečale s povzročiteljem KAK, moramo kratkotrajne izločevalce terenskih sevov izolirati za 21 dni (Hoyoak in sod., 2008).

Študije kažejo, da se cepljene kobile, ki jih osemenijo s semenom PI, lahko okužijo z virusom EAV, vendar ne zbolijo. Po okužbi obstaja možnost, da se virus EAV prenese z direktnim stikom s ponovno okužene kobile na neokužene živali (McCollum in sod., 1988).

Cepivo Arvac[®] v Evropi ni komercialno dostopno. V nekaterih evropskih državah (Velika Britanija, Nemčija, Irska) uporabljajo mrtvo (inaktivirano) cepivo Aretervac[®]. Za osnovno cepljenje sta potrebna dva odmerka cepiva, ki ga damo v časovnem razmaku od treh do štirih tednov. Ponovna cepljenja sledijo vsakih šest mesecev (Whalen in sod., 1998).

Slaba stran uporabe živih in mrtvih vakcin je, da z obstoječimi diagnostičnimi testi ne moremo razlikovati cepljenih konjev od konjev, ki so se okužili s terenskim virusom.

Ena izmed možnih tehničnih rešitev je vpeljava cepiv DIVA (DIVA, *angl. differentiating infected from vaccinated animals*), katerih raba se postopno uveljavlja tudi v veterinarski medicini (Minke in sod., 2004). Razvoj in pripravo takih vakcin omogočajo predvsem molekularne metode, ki se neprestano izboljšujejo.

Pri razvoju novih cepiv za preprečevanje KAK so se v zadnjih letih uveljavile tehnologije rekombinantne DNA. Z omenjenimi tehnologijami so Castillo-Olivares in sod. (2001) izdelali podenotno cepivo iz rekombinantnega proteina, ki vključuje N-terminalno domeno GP₅ (18–122 aa) (*angl. sub-unit*). S tehnikami molekularne biologije so isti avtorji na podlagi infektivnega cDNA klona pEANG_LΔ izdelali tudi mutanto EAV-G_LΔ virusa EAV, ki so mu z delecijo v genu ORF5 odstranili poglavitno nevtralizacijsko domeno GP₅ (66–112 aa). Pokazali so, da taka cepiva zaščitijo ponije proti virulentnemu sevu virusa EAV (Castillo-Olivares in sod., 2003). Dodatna prednost uporabe vakcin druge generacije je tudi v tem, da je s testom ELISA (Nugent in sod., 2000) mogoča serološka diskriminacija med cepljenimi in naravno okuženimi živalmi (Castillo-Olivares in sod., 2003).

Balasuriya in sod. (2000) so pripravili rekombinantni vektor virusa venezuelskega encefalomitisa konj (VEE, *angl. Venezuelan equine encephalitis*), ki izdeluje heterodimer G_L/M virusa EAV. Virusni delci replikona EAV-VEE so v imuniziranih miših BALB/c sprožili nastanek nevtralizacijskih protiteles proti virusu EAV.

Najnovejše cepivo za KAK je cepivo z DNA, ki so ga izdelali tako, da so v sesalski plazmid pCR3.1 vnesli posamezne gene virusa EAV. Pri miših BALB/c, ki so jim vbrizgali plazmidno

DNA z geni ORF5 in ORF7 virusa EAV, so dosegli dober zaščitni imunski odziv proti virusu EAV (Tobiasch in sod., 2001; Giese in sod., 2002).

Vendar so pri preizkušanju potencialnih cepiv DIVA naleteli na veliko neznank. Ni še znano, ali lahko cepivni virus žrebce trajno okuži, kot tudi ne, kakšne posledice ima cepljenje za breje kobile. Kljub omenjenim pomanjkljivostim, so obeti za njihovo uporabo proti KAK dobri (Balasuriya in sod., 2004b; Minke in sod., 2004).

2.7.2 Ukrepi

Poleg cepljenja, ki je v preventivi KAK še posebej pomembno, imajo v večini držav po svetu programe, ki so usmerjeni v nadzor seroepizootiološkega stanja in v preprečevanje vnosa okuženih živali v rejo. Za novo nabavljene konje kot tudi za konje, ki so bili na razstavi, tekmi ali na izmenjavi v drugih vzrejališčih, se odredi od tri do štiri tedenska karantena. Med prestajanjem karantene je pri izoliranih živalih treba opraviti dve serološki preiskavi v razmaku 14 dni.

Pozornost je treba posvetiti serološko pozitivnim žrebcem. Pomembno je, da seme plemenskih žrebcev testiramo na prisotnost virusa EAV pred vsako plemenilno sezono. Žrebcu, pri katerem v semenu dokažemo prisotnost virusa EAV, prepovemo parjenje in ga fizično izoliramo od ostalih živali, dokler ne preneha izločati virusa EAV s semenom.

Ob izvajanju določenih varnostnih ukrepov pa ameriški predpisi PI ne prepovedujejo razmnoževanja. V tem primeru naj bi PI parili le s serološko pozitivno kobilo, ki je bila cepljena najmanj tri tedne pred pripustom ali pa se je prekužila z virusom EAV ob naravni okužbi. Po pripustu moramo kobilo osamiti od ostalih serološko negativnih živali (Timoney in McCollum, 1993). Naravno okužene kobile osamimo za 24 do 48 ur, medtem ko prvič cepljene kobile osamimo za tri tedne. Posebno nevarno je, da bi se z virusom EAV okužile breje kobile, zato je treba preprečiti njihov stik s prvič cepljenimi kobilami, ki so jih pripustili pod PI (Holyoak in sod., 2008).

Veterinarska uprava Republike Slovenije opravlja redni epizootiološki nadzor nad KAK pri kopitarjih na podlagi Pravilnika o splošnih in posebnih ukrepih pri kužnem arteritisu kopitarjev (Ur. l. RS, št. 75/05 in 94/05). Ker je perzistentno okuženi žrebec poglavitni rezervoar virusa EAV v čredi konj, je pomembno, da zakonodaja predpisuje izredno stroge ukrepe za preprečevanje okužb pri plemenskih žrebcih v odobrenih osemenjevalnih središčih,

ki v semenu ne smejo imeti virusa EAV. V skladu s Pravilnikom o rutinskih diagnostičnih preiskavah in načinu zdravljenja žrebcev v odobrenih osemenjevalnih središčih (Ur. l. RS, št. 116/00) morajo biti vsi žrebci v odobrenem osemenjevalnem središču vsaj enkrat letno na začetku plemenilne sezone pregledani na KAK. Žrebci, ki se vključujejo v osemenjevalno središče ali v naravni pripust, morajo biti prosti KAK. V žrebčevem semenu, ki je pridobljeno v odobrenem osemenjevalnem središču in se daje v promet, ne sme biti virusa EAV. Zakonska določila, ki določajo te ukrepe, so zajeta v Pravilniku o pogojih, pod katerimi se lahko daje živalsko seme v promet (Ur. l. RS, št. 71/00).

Z namenom, da se iz reje lipincev na slovenskem Krasu (reja A) izkorenini KAK, je Vlada Republike Slovenije 7. julija 2005 odobrila sklenitev pogodbe o izvajanju izkoreninjenja KAK. Program izkoreninjenja bo potekal od leta 2005 do 2011. V programu predpisana obvezna vakcinacija serološko negativnih moških živali z vakcino Arvac[®] je osnovni ukrep za izkoreninjenje KAK iz populacije kraških konj. Pred prvim cepljenjem je treba zagotoviti serološko testiranje vseh plemenskih žrebcev in žrebčkov, ki se pri starosti šest mesecev odstavi in prestavi v dislocirano rejo na Ravne, kar omogoča, da se serološko pozitivne živali loči od serološko negativnih, ki se jih cepi. Enkrat letno se z nevtralizacijskim testom opravi kontrola uspešnosti cepljenja.

Najboljša preventiva okužbe z virusom EAV je kastracija PI, vendar lahko tako radikalen poseg pripelje do velikih »genetskih izgub« v plemenski čredi žrebcev določenih linij, ki predstavljajo potrebno bazo za bodoči naraščaj.

2.8 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB Z VIRUSOM EAV

Simptomi KAK niso patognomonični, zato samo iz klinične slike ne moremo sklepati, da gre za okužbo z virusom EAV. V diferencialni diagnozi pride v poštev vrsta kužnih bolezni respiratornega trakta: konjski rinopneumonitis (EHV-4, *angl. equine rhinopneumonitis virus*), influenza konj in okužba z adenovirusi. Tudi virus kužnega zvržavanja kobil (EHV-1, *angl. equine abortion virus*) povzroča abortuse z značilnimi makroskopskimi spremembami v obliki majhnih nekrotičnih žarišč na jetrih fetusa, ki jih pri abortusih zaradi okužb z EAV ne ugotavljamo (Timoney in McCollum, 1993).

Pomisliti moramo tudi na konjsko kugo, infekciозno anemijo konj in leptospirozo, poleg tega pa še na toksikozo, urtikarijo in na hemoragično purpuro zaradi okužbe z bakterijo *Streptococcus equi* (Huntington in sod., 1990).

K pravi diagnozi nam pomagajo laboratorijske preiskave. Laboratorijsko diagnostiko KAK izvajamo s posrednimi in neposrednimi virološkimi metodami v skladu z zadnjo izdajo Diagnostičnega priročnika Mednarodne organizacije za zdravje živali (v nadaljevanju Diagnostični priročnik OIE, 2004) (*angl. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*) (OIE, *angl. World Organisation for Animal Health*).

2.8.1 Posredno dokazovanje virusa EAV s serološkimi metodami

V diagnostiki KAK se za dokazovanje specifičnih protiteles uporabljajo različne serološke metode, kot so: reakcija vezave komplementa (Fukunaga in McCollum, 1977), posredna imunofluorescenca, imunodifuzija v agarnem gelu (Crawford in Henson, 1973) in številne encimsko imunske metode ELISA (Chirnside in sod., 1995b; Cho in sod., 2000; Hedges in sod., 1998; Iniguez in sod., 1998; Kondo in sod., 1998b; Nugent in sod., 2000). Čeprav so nekateri testi ELISA približno enako občutljivi in specifični kot nevtralizacijski test (NT), še niso validirani.

Ena izmed najpomembnejših seroloških preiskav je nevtralizacijski test (NT), s katerim v serumu ugotavljamo nivo protiteles IgG proti virusnemu glikoproteinu GP₅ (Senne in sod., 1985). Za uspešno dokazovanje specifičnih protiteles je pomembno, da razredčinam preiskovanega seruma dodamo znano količino budrinega komplementa (Hyllseth in Pettersson, 1970; Senne in sod., 1985). V praksi velja, da prisotnost budrinega komplementa poveča diagnostično občutljivost in ponovljivost NT (Fukunaga in sod., 1993; Hyllseth in Pettersson, 1970; Maess, 1971; Radwan in Crawford, 1974; Radwan in Burger, 1973b).

Aktivna imunizacija s cepivi (Arvac[®] in Artervac[®], Ft. Dodge Animal Health, Iowa, ZDA) sproži nastanek zaščitnih protiteles, ki pa jih s prej omenjenim testom ne razlikujemo od protiteles, ki so posledica naravne okužbe.

Večina pozitivnih seroloških reakcij, ki smo jih dokazali pri pregledanih konjih, je posledica naravnih okužb z virusom EAV.

Metodo, ki je zelo specifična in občutljiva, uporabljamo za dokazovanje akutne okužbe in za študije o seroprevalenci. Z dokazom štirikratnega povečanja titra protiteles IgG med akutnim in rekonvalescentnim serumom, odvzetih v razmiku 21–28 dni, potrdimo akutno okužbo.

Nevtralizacijski test je tudi presejalni test, ki je namenjen iskanju PI. Če je NT pozitiven (titer nevtralizacijskih protiteles $\geq 1:4$), testiranje nadaljujemo z ugotavljanjem prisotnosti virusa EAV v semenu. Identifikacija perzistentno okuženih žrebcev (t.j. približno 30–60 % vseh seroloških reaktorjev) temelji na metodi izolacije EAV v celični kulturi (Timoney in sod., 1986a; Timoney in sod., 1987b) in določanju virusnih antigenov.

2.8.2 Neposredno dokazovanje virusa EAV

2.8.2.1 Izolacija virusa EAV v celični kulturi

Virus EAV so sprva gojili v primarni celični kulturi iz konjskih ledvičnih celic (McCollum in sod., 1961; McCollum in sod., 1962b). Danes se za razmnoževanje virusa EAV mnogo bolj uporabljajo celične linije. Izkazalo se je, da je celična linija RK-13 (McCollum in sod., 1962a), ki je v različnih diagnostičnih laboratorijih po svetu prešla v splošno uporabo, najbolj občutljiva za ugotavljanje prisotnosti virusa EAV v semenu (Glaser in sod., 1997). Število pasaž celične linije RK-13 je eden izmed dejavnikov, ki ključno vplivajo na izid izolacije virusa EAV. Število pozitivnih rezultatov je večje, kadar za izolacijo virusa EAV iz kužnine uporabimo 3–5 dni staro celično linijo RK-13 z manjšim številom pasaž. Za prakso je zelo pomembno, da je inokulum kužnine, ki ga dodamo celični kulturi, glede na površino sloja celic RK-13 zelo velik (Ostlund in sod., 1997). Poleg tega je znano, da se celične linije RK-13 med posameznimi virološkimi laboratoriji razlikujejo v številu pasaž in v dovzetnosti za okužbo z virusom EAV (de Vries in sod., 1996). Nasprotno nekateri pripisujejo velik pomen celicam RK-13 z večjim številom pasaž. Večina celic RK-13 (ATCC CCL-37) je kontaminirana z virusom bovine virusne diareje (BVDV, *angl. bovine viral diarrhoea virus*). Predvidevajo, da so celice RK-13, okužene z virusom BVD, bolj dovzetne za okužbo z virusom EAV kot neokužene (BVDV free) (.

Pomemben je tudi pravilen odvzem prave kužnine ob pravem času. V primerih akutne okužbe moramo kužni material odvzeti čim prej ob pojavu vročine. Akutno in subklinično okužbo potrdimo s prisotnostjo virusa EAV v kužninah, kot so bris žrela in nosu, bris veznice, seme

in nekoagulirana kri. Ob tem naj opozorimo, da heparin zavira rast virusa EAV v celični kulturi RK-13 (Asagoe in sod., 1997). Kadar želimo izolirati virus EAV iz krvi, je bistveno, da odvezamo kri v sterilno epruveto z dodatkom Na-EDTA (natrijeva sol etilendiaminotetraoetne kisline) ali Na-citrata (de Vries in sod., 1996).

Pri odraslih konjih in žrebetih, za katere se sumi, da so poginili zaradi okužbe z virusom EAV, odvezamo vzorec tkiva pljuč, jeter, vranice, bezgavk in ledvic (McCollum in sod., 1971).

Pri abortusih dokazujemo virus EAV v placenti (Cole in sod., 1986) in v različnih plodovih organih: v vranici, pljučih in ledvicah (Timoney in McCollum, 1993).

Kužnino prenesemo v transportnem gojišču pri 4 °C v laboratorij še isti dan. Če nimamo te možnosti, odvzeti material shranimo pri –20 °C in ga dostavimo zamrznjenega (Glaser in sod., 1997).

Metoda izolacije virusa v celični kulturi se uporablja tudi za dokaz virusa EAV v semenu plemenskih žrebcev. Za opredelitev kronične okužbe z virusom EAV pri žrebcih sta potrebni dve preiskavi. Za ta namen se serološko pozitivnim plemenskim žrebcom odvzame seme dvakrat v istem dnevu. Razmik med dvema vzorčenjema je lahko tudi več dni ali nekaj tednov. Da bi se izognili lažno negativnim rezultatom se priporoča, da se pred odvzemom semena, zunanjih spolovil pri žrebcu ne čisti z antiseptiki. Za uspešno laboratorijsko potrditev okužbe z virusom EAV pri žrebcih je pomembno, da vzorec semena vsebuje frakcijo bogato s spermiji, kajti v vodeni frakciji virusa EAV ni (Timoney in McCollum, 1993; Timoney in McCollum, 2000). Takoj po odvzemu vzorce semena ohladimo na 4 °C. Kadar dostavimo vzorce v laboratorij še isti dan, jih prenašamo v hladilni torbi s predhodno ohlajenimi hladilnimi enotami. Virološke preiskave iz semena je treba opraviti v najkrajšem možnem času po odvzemu. To pa ni mogoče, ko skušamo izolirati virus iz zamrznjenega semena, ki ga uporabljamo za osemenjevanje ali iz nepravilno hranjenih arhivskih vzorcev semena. Za daljše shranjevanje jih je treba zamrzniti pod –20 °C (Glaser in sod., 1997). Časovni presledek med odvzemoma in zamrzovanje ne vplivata na rezultat preiskave (Diagnostični priročnik OIE, 2004).

Čeprav je metoda izolacije virusa EAV v celični kulturi RK-13 preprosto orodje za dokazovanje infektivnega virusa, se večkrat pripeti, da pri naravnih okužbah virusnega povzročitelja v kužnini ne dokažemo (McCollum in Swerczek, 1978; Timoney in McCollum, 1993), kar bistveno okrne diagnostično vrednost te preiskave. Seveda ima preiskava, ki je

priporočena s strani OIE, tudi druge omejitve. Razširjeno je mnenje, da ima omenjena metoda večjo občutljivost, če vzdrževalno gojišče vsebuje karboksimetilcelulozo (CMC, *angl. carboxymethyl-cellulose*), ki ni na voljo v vsakem virološkem laboratoriju. Ker vzdrževalno gojišče s CMC ni komercialno dostopno, si ga moramo pripraviti sami, kar še poveča zahtevnost izvedbe postopka. Slabost te metode je tudi dolgotrajnost in visoki stroški postopka. Preiskava traja približno en mesec, saj zahteva več pasaž. Poskus osamitve virusa EAV iz semena je tudi po treh pasažah večkrat neuspešen. Uspešnost izolacije virusa EAV potrdimo z dokazovanjem virusnih antigenov ali virusne nukleinske kisline.

V zadnjem času so se v diagnostiki te bolezni uveljavile molekularne metode, zlasti metoda reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR, *angl. reverse transcription-polymerase chain reaction*) (Chirnside in Spaan, 1990; Gilbert in sod., 1997; Ramina in sod., 1999; Sekiguchi in sod., 1995; Starick, 1998; St-Laurent in sod., 1994). Slednja nam omogoča neposredno dokazovanje virusne nukleinske kisline tudi takrat, ko je količina virusa v preiskovanem vzorcu tako majhna, da je metoda izolacije virusa EAV v celični kulturi RK-13 premalo občutljiva ali pa je virus zaradi stanja vzorca izgubil kužnost.

Imunske metode za dokazovanje virusnih antigenov

Imunske metode za identifikacijo izolatov virusa EAV vključujejo indirektno imunofluorescenco (Crawford in Henson, 1973) in metodo ABC (ABC, *angl. avidin-biotin, glucose-oxidase complex*) z imunskim kompleksom avidin-biotin (Little in sod., 1995).

Antigene virusa EAV dokazujemo z monoklonskimi protitelesi, ki so specifična za nukleokapsidni protein N in za glikoprotein GP₅ (Deregt in sod., 1994).

2.8.2.2 Dokazovanje virusa EAV z molekularnimi metodami

Izvajanje ukrepov za izkoreninjenje KAK sloni na laboratorijski potrditvi PI. Praviloma je kronične izločevalce treba kastrirati ali jih izključiti iz vseh oblik razmnoževanja. Nedvomno prinašajo ukrepi lastniku plemenjaka hudo finančno izgubo, zaradi česar mora biti dokazovanje okužbe z virusom EAV zanesljivo. Hitrost, visoka občutljivost in specifičnost so bistvene značilnosti molekularnih metod, ki so nepogrešljive pri identifikaciji PI.

Metoda PCR, ki jo je leta 1983 zasnoval Kary B. Mullis (Mullis, 1990), je prvič zaživela v praksi že dve leti pozneje (Saiki in sod., 1985). Kompleti kemikalij različnih proizvajalcev in

številne platforme obstoječih aparatov za izvedbo testov PCR so omogočili krajši čas preiskave ter njeno enostavno in uniformno izvedbo (Tang in sod., 1997; Fredricks in Relman, 1999). To so poglobitve lastnosti, zaradi katerih si je metoda PCR utrla pot v množično uporabo in se je v rutinski virološki diagnostiki umestila kot mednarodno priznana in splošno uporabna metoda za določanje prisotnosti virusne nukleinske kisline (Mackay in sod., 2002).

Glavni predpogoj za uspešno detekcijo virusov z RNA z metodo PCR, katere princip temelji na pomnoževanju specifičnega odseka tarčne DNA, je prepis virusne RNA v komplementarno virusno DNA (cDNA, *angl. complementary DNA*) z reverzno transkriptazo.

Reakcija PCR ima tri stopnje:

- denaturacijo,
- prileganje začetnih oligonukleotidov,
- podaljševanje verige DNA, ki jo katalizira encim polimeraza DNA *Taq*, ki so jo izolirali iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*.

Vse tri stopnje sestavljajo en cikel reakcije PCR, ki jo izvajamo v več zaporednih ciklih (30–40) v termopomnoževalniku. Vsaka na novo sintetizirana veriga DNA služi kot matrica, tako da se število pomnoženih molekul DNA (produktov PCR) v vsakem ciklu podvoji in tako eksponentno narašča (Valasek in Repa, 2005).

Klasična ali konvencionalna verižna reakcija s polimerazo sloni na detekciji produktov PCR po končani reakciji. Elektroforeza v agaroznem gelu (Kidd in sod., 2000) in metoda po Southernu sta (Holland in sod., 1991) bili prvi metodi za detekcijo produktov PCR.

Prav gotovo je test PCR-ELISA dobra alternativa omenjenima metodama. Predstavlja semi-kvantitativni test, ki vključuje parjenje oligonukleotidne sonde in tarčne DNA po principu komplementarnosti baz v nukleotidih. Glede na način vezave tarčne DNA na trden nosilec in tip označevalcev oligonukleotidnih sond in začetnih oligonukleotidov poznamo več modifikacij testov ELISA za specifično detekcijo produktov PCR. Pri standardni izvedbi testa je na dno jamice mikrotitracijske plošče vezan streptavidin. Poznanih je več načinov za neradioaktivno označevanje enoverižnih molekul DNA. Večinoma so sonde za hibridizacijo označene z biotinom, digoksigeninom ali fluorescenčnimi označevalci. Oligonukleotidna sonda, ki je na 5' koncu označena z biotinom, se veže na streptavidin. Ko oligonukleotidno sondo inkubiramo s produkti PCR, v katerih je cDNA označena z digoksigeninom, bo prišlo

do nastanka hibridov med komplementarnimi nukleotidnimi zaporedji specifične hibridizacijske sonde in iskanim odsekom DNA v produktu PCR. Nastali hibrid nato identificiramo z antidigoksinogeninskimi protitelesi, ki imajo vezano peroksidazo. Na imobilizirano DNA vezana protitelesa zaznamo kolorimetrično z uporabo različnih substratov, nastali signal pa merimo s spektrofotometrom (Leutenegger, 2001; Mackay in sod., 2002).

Metodološki postopki se med posameznimi komercialno dostopnimi kompleti testov PCR-ELISA razlikujejo. Reagenti Hybridowell™ Universal Kit francoskega proizvajalca Argene (Biosoft, Francija) nam omogočajo, da se neoznačen odsek DNA iskanega gena veže direktno na trden nosilec. Na hibridizacijsko sondo, ki je na 5' koncu označena z biotinom, vežemo streptavidin s kovalentno vezano peroksidazo. Za razliko od drugih izpeljank metode PCR-ELISA ta tehnologija omogoča hitrejšo izvedbo testa.

V vzorcu semena PI je množica različnih variant virusa EAV. Velika genetska pestrost se pojavlja zaradi napak pri pomnoževanju in prepisovanju virusnega genoma. Zaradi mutacij, do katerih lahko pride tudi v delu genoma, ki ga poizkušamo določiti z metodo RT-PCR, je zelo pomembna izbira začetnih oligonukleotidov, ki omejujejo tarčni odsek v virusnem genomu, kot tudi oligonukleotidnih sond za hibridizacijo.

Za dokazovanje virusa EAV so v zadnjih letih razvili kar nekaj metod RT-PCR, ki omogočajo hitro in natančno pomnoževanje odseka različnih virusnih genov. Specifičnost metod RT-PCR je določena z izbiro začetnih oligonukleotidov. Za dokazovanje prisotnosti virusa EAV v semenu PI uporabljamo večinoma začetne oligonukleotide, s katerimi z metodo RT-PCR določamo prisotnost odseka v genu za virusno polimerazo (ORF1b) (Chirnside in Spaan, 1990; Gilbert in sod., 1997; Ramina in sod., 1999; Stadejek in sod., 1999; Starick, 1998; St-Laurent in sod., 1994).

Največjo specifičnost in občutljivost pa dosežejo metode RT-PCR, s katerimi zaznavamo odseke v nukleokapsidnem genu (ORF7). Skrajni 3' konec genoma virusa EAV, kjer se nahaja tudi ORF7, sodeluje pri pakiranju virusne nukleinske kisline v kapsido in verjetno tudi pri procesu prepisovanja virusnega genoma. Visoka ohranjenost, ki je posledica nizkega števila sinonimnih nukleotidnih zamenjav v tem delu genoma, nakazuje, da sta oba procesa izrednega pomena za preživetje virusa (Domingo in Holland, 1997). Zato je gen za nukleokapsido, ki ima pri vseh znanih izolatih virusa EAV najbolj ohranjeno zaporedje nukleotidov (Balasuriya in sod., 1999a; Balasuriya in sod., 2004c; Chirnside in sod., 1994;

Huovilainen in Ek-Kommonen, 1998; Patton in sod., 1999), tudi najpogosteje uporabljen gen za dokazovanje nukleinske kisline virusa EAV z metodo RT-PCR (Chirnside in Spaan, 1990; St-Laurent in sod., 1994; Westcott in sod., 2003).

Za povečanje specifičnosti in občutljivosti določanja virusa EAV je bila razvita tudi različica imenovana »nested« PCR (Bélak in sod., 1994; Gilbert in sod., 1997; Starick in sod., 1998; Westcott in sod., 2003).

Čeprav sta metodi RT-PCR in »nested« PCR zelo občutljivi metodi, imata tudi nekatere pomanjkljivosti. V semenu so prisotni poliamini, ki lahko zavirajo reakcijo RT-PCR, kar ima za posledico lažno negativen rezultat (Lugaro in sod., 1988). Slabost metode »nested« PCR je večja možnost lažno pozitivnih rezultatov zaradi kontaminacije med vzorci, zaradi česar je potrebna večja previdnost pri izvajanju in presoji rezultatov (Kwok in Higuchi, 1989).

Detekcija produktov PCR z elektroforezo v agaroznem gelu ali s specifičnimi oligonukleotidnimi sondami v testu ELISA nam ne omogoča natančnega ovrednotenja količine nastalega produkta PCR. Poleg tega se pri izvajanju teh metod detekcije uporablja več zdravju škodljivih kemikalij, saj produkte PCR dokazujemo z barvanjem agaroznega gela s kancerogenim etidijevim bromidom ali s toksičnim kolorimetričnim substratom v testu ELISA.

V zadnjem času je v diagnostiki KAK deležna posebne pozornosti metoda RT-PCR v realnem času (*angl. real-time RT-PCR*), ki nam poleg možnosti detekcije produktov PCR med samim potekom reakcije zagotavlja tudi večjo občutljivost in manjšo možnost kontaminacije (Balasuriya in sod., 2002b; Mankoč in sod., 2007; Westcott in sod., 2003).

2.8.2.3 PCR v realnem času (*angl. real-time PCR*)

Vsesplošno uporabljena klasična metoda PCR je v povezavi s fluorescenčno kemijo postala PCR tretje generacije in jo danes imenujemo PCR v realnem času (*real-time PCR*). Velja za »on line« različico metode po Southernu in predstavlja nadgradnjo klasične tehnike PCR, ki je v obdobju digitalne tehnologije dosegla veliko razširjenost in priljubljenost tudi v diagnostični mikrobiologiji (Mackay in sod., 2007).

Zaradi številnih aplikacij, ki vključujejo detekcijo, kvantifikacijo in genotipizacijo mikroorganizmov, je metoda PCR v realnem času postala jedro sodobne virološke diagnostike. Poleg tega, da je časovno hitrejša od klasične metode PCR, se njena uporabna

vrednost kaže v zmanjšani možnosti navzkrižne kontaminacije, saj zaradi neposredne detekcije produktov PCR na osnovi sproščene fluorescence med samim potekom reakcije, končna analiza pomnoženih produktov PCR z agaroznim gelom ni potrebna (Mackay in sod., 2007).

Vzporedno z razvojem PCR v realnem času se na tržišču pojavlja vse več različnih kemijskih metod (Mackay, 2004), ki jih glede na način fluorescentnega označevanja produktov PCR uporabljamo za nespecifično ali specifično detekcijo (Bustin in Mueller, 2005).

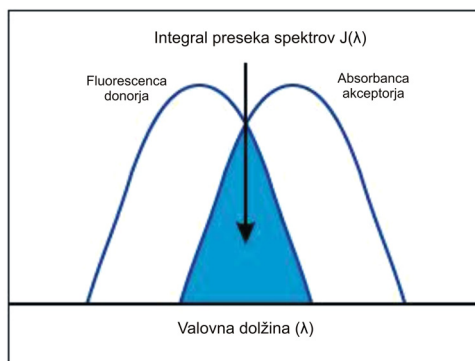
Nespecifična detekcija je zasnovana na interkalirajočih barvilih, ki se vežejo v mali žleb dvojnovijačne DNA (dsDNA, *angl. double-stranded DNA*) in oddajo močan fluorescentni signal (Kubista in sod., 2006). V letih 1990 so Higuchi in sod. (1992) razvili prvi detektorski sistem za PCR v realnem času. Nastajanje produktov med reakcijo PCR so spremljali s pomočjo etidijevega bromida, ki vzbujen z virom ultravijolične svetlobe oddaja fluorescentni signal (Valasek in Repa, 2005).

Uporabo mutagenega etidijevega bromida so v večjem obsegu zamenjala druga, zdravju neškodljiva fluorescenčna barvila: SYBR®Green I (Morrison in sod., 1998), BEBO® (Bengtsson in sod., 2003), YOYO® (Srinivasan in sod., 1993), BOXTO® (Lind in sod., 2006). V praksi se največkrat uporablja asimetrično cianinsko barvilo SYBR®Green I (Wittwer in sod., 1997a). V raztopini je njegova fluorescenca nezaznavna, ko pa se vgradi v novo nastalo DNA, odda 1000-krat močnejši signal (Wittwer in sod., 1997b). Ker se barvila vgradijo v vsako dsDNA, tudi v dimere začetnih oligonukleotidov in nespecifične produkte PCR, je specifičnost te metode določena izključno z začetnimi oligonukleotidi (Bustin, 2000). Morebitni nastanek nespecifičnih produktov PCR preverimo z analizo talilnih krivulj (*angl. melting curve analysis*) nastalih dsDNA po končani reakciji PCR (Ririe in sod., 1997).

Najnovejše kemijske metode za specifično določanje nastalih produktov PCR vključujejo fluorescentno označene začetne oligonukleotide: Sunrise™, LUX™, Scorpion®, Amplifluor™ in fluorescentno označene oligonukleotidne sonde: hibridizacijske sonde ali FRET sonde, »molekulske svetilke« (*angl. molecular beacons*), dvojno označene sonde ali hidrolizirajoče sonde (npr. sonde TaqMan®) (Gunson in sod., 2006).

Specifični detektorski sistem na osnovi fluorescentno označenih sond se opira na mehanizem fluorescenčnega resonančnega prenosa energije (FRET, *angl. fluorescence resonance energy transfer*) iz donorske na akceptorsko molekulo. Koncept resonančnega prenosa energije je razvil Förster (1948). FRET je spektroskopski proces prenosa energije med dvema

molekulama, ki sta oddaljeni med seboj 10–100 Å in katerih emisijski in absorpcijski spekter se prekrivata (Stryer in Haugland, 1967; Heller in Morrison, 1985; Clegg, 1992) (Slika 2-20).



Slika 2-20: Shematska predstavitev prekrivanja emisijskega in absorpcijskega spektra pri FRET.

Hidrolizirajoče ali dvojno označene sonde (sonde TaqMan®)

Na področju detekcije virusov se za določanje nastalih produktov PCR najpogosteje uporabljajo dvojno označene sonde (Gunson in sod., 2006).

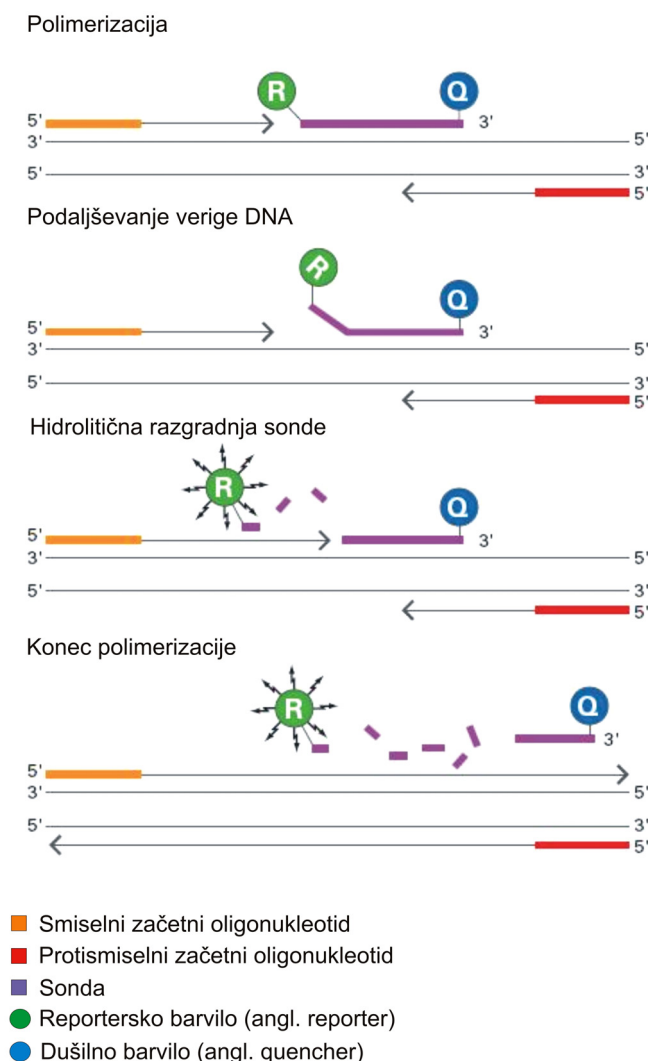
Prvo sekvenčno specifično tehniko PCR v realnem času s hidrolizirajočimi sondami je zasnoval Holland s sod. (1991). Za izvedbo specifične detekcije produktov PCR s kemijo TaqMan® potrebujemo poleg klasičnih začetnih oligonukleotidov tudi sonde TaqMan®. S sondo, ki se v združeni fazi prileganja/podaljševanja veže na tarčno zaporedje v območju med začetnima oligonukleotidoma, še dodatno potrdimo specifičnost produktov PCR (Kutyavin in sod., 2000).

Klasična sonda TaqMan® je sintetični oligonukleotid (18–40 nt), ki je na 5' in 3' koncu označena s fluorofori (Applied Biosystems, an Applera Corporation Business). Fluorescentni označevalec na 5' koncu imenujemo reportersko barvilo (*angl. reporter*), označevalec na 3' koncu pa dušilno barvilo (*angl. quencher*). Za označevanje 5' konca imamo na voljo več fluorescenčnih barvil z emisijskimi vrhovi različnih valovnih dolžin. Najbolj priljubljen med njimi je derivat fluoresceina FAM (6-karboksi-fluorescein), ki oddaja fluorescenco pri valovni dolžini 518 nm. Druga dobro znana reporterska barvila so: TET (6-karboksi-2',4,7,7'-tetraklorfluorescein), JOE (6-karboksi-4',5'-dikloro-2',7'-dimetoksifluorescein), HEX (6-karboksi-2',4,4',5',7,7'-heksaklorofluorescein) in VIC z emisijskim spektrom daljših valovnih dolžin. Eno izmed prvih dušilnih barvil TAMRA (6-karboksi-tetrametil-rodamin) danes uspešno nadomeščajo različni tipi nefluorescenčnih dušilcev NFQ (NFQ, *angl. non*

fluorescent quencher), kot so DABCYL in BHQ (BHQ, *angl. black hole quencher*). NFQ je kromofor, ki deluje kot akceptor pri prenosu energije z reporterskega barvila, od katerega prestreže fluorescentni signal. NFQ sam po sebi ne oddaja zaznavnega fluorescenčnega signala, temveč prejeto energijo oddaja v obliki toplote (Didenko, 2001), kar pripomore k zmanjšanju fluorescence ozadja, ki izvira iz optične plošče in detektorja svetlobe (Leutenegger, 2001). Z nefluorescentnim načinom označevanja 3' konca hidrolizirajočih sond pripomoremo k izboljššanemu spektralnemu razlikovanju med reporterskimi fluorofori, kar je osnovni pogoj, ki ga moramo upoštevati pri načrtovanju zahtevne multipleksne metode PCR v realnem času, da zagotovimo večjo selektivnost metode, s katero v eni reakciji z več sondami dokazujemo prisotnost več različnih nukleinskih kislin hkrati (Nitsche, 2007).

Dokler je sonda TaqMan[®] nerazgrajena (v raztopini ali vezana na tarčno molekulo) in sta barvili dovolj blizu, tako da največja razdalja med njima ne presega 25–30 nukleotidov (Mackay, 2007), dušilno barvilo absorbira emitirano svetlobo vzbujenega reporterskega barvila. Fluorescenčni signal reporterskega barvila se ne izrazi, ker ga dušilec zaduši z mehanizmom FRET (Valasek in Repa, 2005).

Fluorescenčni signal se sprostí med izgradnjo verige DNA, ko polimeraza DNA s 5'→3' eksonukleazno aktivnostjo katalizira hidrolitično razgradnjo vezane sonde (Kreuzer in sod., 2000). Pri tem pride do prostorske ločitve reporterskega barvila od dušilca, kar omogoči, da se iz reporterskega barvila sprostí fluorescenčni signal (Slika 2-21), ki narašča z vsakim novim ciklom pomnoževanja. Intenziteta fluorescenčnega signala je sorazmerna količini nastajajočega produkta PCR.

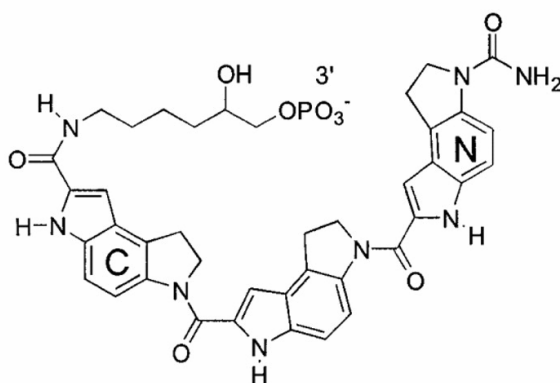


Slika 2-21: Potek PCR v realnem času z metodo detekcije s sondo TaqMan®.

Polimeraza DNA lahko razgrajuje le sonde, ki so vezane s komplementarnim zaporedjem na tarčni DNA. Da bi dosegli, da ostane sonda med sintezo komplementarnih verig združena z eno izmed matričnih DNA pod reakcijskim pogoji, ki jih zapoveduje kemija TaqMan®, moramo konstruirati sondo, katere temperatura tališča (T_m) je za približno 10 °C višja od T_m začetnih oligonukleotidov. Dovolj visoka T_m sonde (okrog 70 °C) zagotavlja komplementarno vezavo sonde pred začetkom faze podaljševanja (Landt, 2001), ki je združena s fazo prileganja in poteka pri 60 °C (www.appliedbiosystems.com.au).

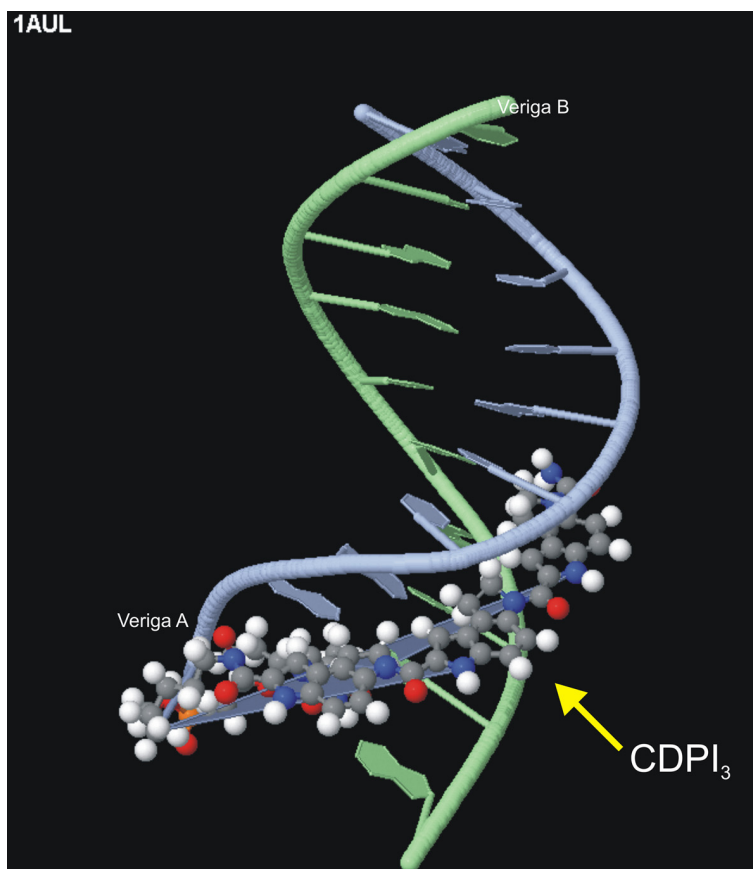
Kemična modifikacija obstoječih sond TaqMan® s triciklično organsko molekulo, ki se veže v mali žleb dsDNA in jo s kratico imenujemo MGB (MGB, *angl. minor groove binder*), pomeni

izjemno inovacijo na področju optimizacije dvojno označenih sond. Kemijsko je MGB tripeptid 1,2-dihidro-(3*H*)-pirolo[3,2-*e*]indol-7-karboksilat (CDPI₃) (Kumar in sod., 1998) (Slika 2-22), sintetični derivat antibiotika CC-1065 s protitumorskim učinkom (Hurley in sod., 1984).



Slika 2-22: Kemijska struktura CDPI₃. Povzeto po: Kutyaev in sod. (2000).

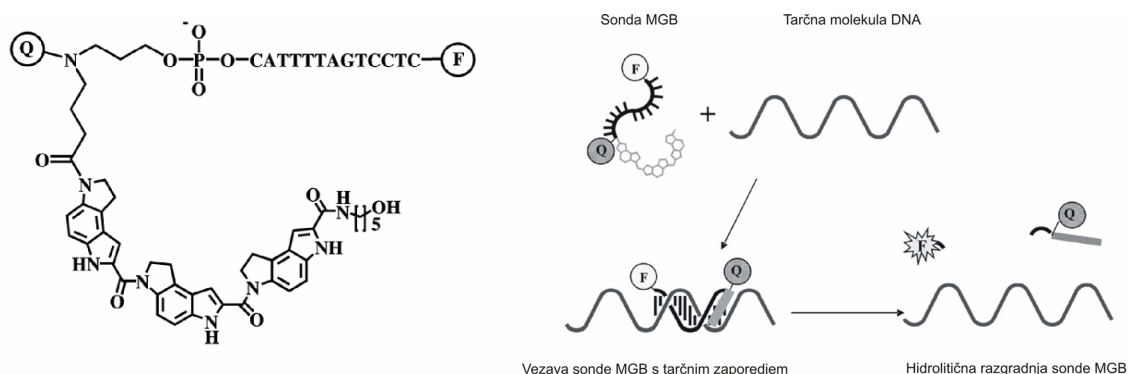
Izohelična struktura v obliki polmeseca (Boger in sod., 1987) omogoča, da se MGB selektivno veže v globok in ozek mali žleb dvojne vijačnice B-DNA (Slika 2-23), v predele z visoko vsebnostjo nukleotidov A-T (Kumar in sod., 1998).



Slika 2-23: Shematska predstavitev dvojne vijačnice DNA. Na 5' konec verige A je vezan CDPI_3 , ki se veže v mali žleb DNA. Posamezni atomi so prikazani s kroglicami različnih barv. Atom P je oranžen, atom O je rdeč, atom H je bel, atom N je moder in atom C je siv. Strukturo dvojne vijačnice DNA in nanjo vezan CDPI_3 smo predstavili s pomočjo programa FirstGlance v Jmolu (Jmol – an open-source Java molecular viewer for three-dimensional chemical structures, <http://www.jmol.org/>). Koordinate 1AUL smo pridobili iz baze trodimenzionalnih struktur PDB (angl. *Protein Data Bank*) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Povzeto po: Kumar in sod. (1998).

Hibrid, ki ga tvorita komplementarni polinukleotidni verigi tarčnega zaporedja v matrični DNA in sonda (Kutyavin in sod., 2000), stabilizirajo van der Waalsove vezi (Afonina in sod., 2002; Kutyavin in sod., 2000).

To lastnost so s pridom izkoristili pri modifikaciji sonde TaqMan[®], ki ima poleg NFQ na 3' koncu kovalentno vezan MGB (Slika 2-24).



Slika 2-24: Shematski prikaz strukture sonde MGB in vezave sonde na tarčno DNA. Povzeto po: Kutuyavin in sod. (2002).

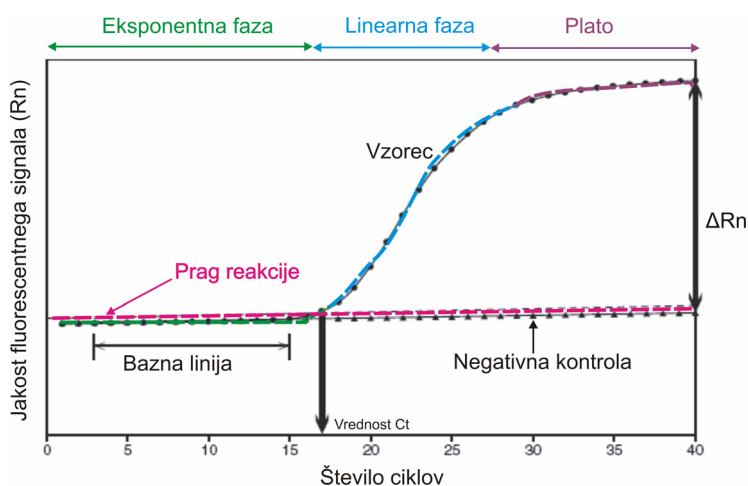
Slednji zviša T_m hibrida za 15–30 °C, kar dopušča možnost za načrtovanje izredno kratkih sond TaqMan[®] MGB (12–17 nt). Novost prinaša novo raven specifičnosti (Kutuyavin in sod., 2000; Yao in sod., 2006) na področju detekcije virusov (Whiley in Sloots; 2005). S sondo, ki je homologna nukleotidnemu tarčnemu zaporedju, lahko z večjo zanesljivostjo dokažemo prisotnost specifičnih virusnih nukleinskih kislin (Mackay in sod., 2002; Watzinger in sod., 2006).

Virusi z RNA so zaradi visoke stopnje mutacij genetsko zelo heterogeni, kar povzroča številne težave pri vpeljevanju izredno občutljivih molekularnih metod, ki se opirajo izključno na specifično nukleotidno zaporedje določenega odseka virusnega genoma (Bustin in Mueller, 2005).

Sonda TaqMan[®] MGB je dobrodošlo dopolnilo h klasični metodi TaqMan[®], saj nam nudi možnost načrtovanja začetnih oligonukleotidov, ki omejujejo zelo kratke ohranjene odseke v virusnem genomu (od 50 do 150 bp) (Gunson in sod., 2006). Največja prednost uporabe sonde MGB je, da je za pomnoževanje tarčnih molekul v več zaporednih ciklih PCR potreben krajši čas, zaradi česar se skrajša tudi čas preiskave (Wittwer in sod., 1990; Wittwer in sod., 1997a).

Popolna ohranjenost genoma na mestu vezave sonde je ključni teoretični element (Yao in sod., 2006), ki ga moramo upoštevati pri konstrukciji sonde MGB (Nitsche, 2007). Zato moramo pri načrtovanju teh sond poznati nukleotidna zaporedja različnih virusnih sevov. Pri tem smo omejeni z naborom nukleotidnih zaporedij nam znanih virusnih genomov in z javno dostopnimi nukleotidnimi zaporedji, ki so na voljo v podatkovni zbirki GenBank. Zato obstaja teoretična možnost, da s takšnim načinom detekcije ne zaznamo tistih virusnih sevov, ki imajo na mestu vezave sonde MGB tri ali več polimorfni nukleotidov (Yao in sod., 2006).

Princip metode PCR v realnem času, ki nam omogoča vpogled v kinetiko reakcije pomnoževanja DNA, temelji na fotodetekciji emitiranega fluorescentnega signala z različnimi optičnimi napravami (npr. kamera CCD, *angl. charge-coupled device*), ki preko filtrov zaznajo emisijo svetlobe določene valovne dolžine. Detekcija fluorescentnega signala je avtomatizirana in se izvrši med eksponentno fazo v vsakem ciklu PCR (Valasek in Repa, 2005). Programska oprema (npr. SDS, *angl. sequence detection system*, ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems, ZDA) samodejno opravi kvantitativno analizo izmerjene fluorescence in jo prikaže v pomnoževalnem diagramu s sigmoidno krivuljo, ki ponazarja odvisnost jakosti fluorescence od števila ciklov (Wittwer in sod., 1997b) (Slika 2-25).



Slika 2-25: Pomnoževalni diagram v linerani obliki, ki prikazuje osnovne izraze pri PCR v realnem času.

Računalniški program preračuna spremembo v signalu fluorescence (ΔR_n). ΔR_n odraža razliko med fluorescenco reporterskega barvila, ki je normalizirana s fluorescenčnim signalom pasivnega referenčnega barvila (npr. ROX) v kateri koli časovni točki med pomnoževanjem (R_n^+) in fluorescenco bazne linije (R_n^-). Pri začetnih ciklih pomnoževanja optična naprava ne loči signala pomnoževanja od ozadja. Med potekom pomnoževanja DNA jakost emitiranega fluorescentnega signala narašča sorazmerno s količino nastajajočega produkta PCR. Ko fluorescentni signal preseže prag reakcije (*angl. threshold*), ki je definiran kot desetkratna vrednost standardne deviacije bazne linije med 3. in 15. ciklom (Jung in sod., 2000), optična naprava zazna porast fluorescence v eksponentni fazi PCR. Točka, v kateri

prag reakcije, ki ga nastavi računalniški program ali uporabnik sam, seka krivuljo pomnoževanja v eksponentni fazi, predstavlja vrednost Ct (*angl. cycle threshold*). Ta se izraža v številu ciklov, ki so potrebni, da signal fluorescence preseže prag (reakcije) nad izračunano fluorescenco ozadja (Bustin in Nolan, 2004). Vrednost Ct je proporcionalna začetnemu številu kopij tarčnega zaporedja (Gibson in sod., 1996), ki ga pomnožujemo s PCR v realnem času. Več kopij nukleinskih kislin pomeni manjše število ciklov (nižja vrednost Ct), pri katerem zaznamo porast fluorescence nad prag reakcije (Bustin in Mueller, 2005). Pri teoretično idealnih pogojih se na vsake 3,32 cikla količina produkta PCR poveča za $1 \log_{10}$ (Mackay, 2007). Metodo PCR v realnem času odlikuje široko dinamično območje kvantifikacije (najmanj $5 \log_{10}$ enot) (Valasek in Repa, 2005).

Prav tako je njena uporaba nepogrešljiva v klinični virologiji, ko je za spremljanje uspešnosti protivirusne terapije potrebno ugotoviti število virusnih nukleinskih kislin do kopije natančno in so standardni testi premalo občutljivi (Leutenegger, 2001).

Kemija TaqMan[®] se je že dodobra uveljavila v vsakodnevnem delu na različnih področjih veterinarske mikrobiologije (Leutenegger, 2001) in predstavlja vodilno diagnostično orodje za dokazovanje prisotnosti genoma virusa EAV (Balasuriya in sod., 2002b; Mankoč in sod., 2007; Westcott in sod., 2003).

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Konji

V preiskavo smo vključili športne in plemenske konje različnih pasem. Med registriranimi plemenskimi žrebci v zasebni lasti so prevladovali tako plemenjaki hladnokrvnih pasem (slovenska hladnokrvna pasma, posavec, hrvaški posavec, norik, haflinger) kot toplokrvni žrebci pasme kasač (ameriški, finski, italijanski, ljutomerski, nemški, slovenski in švedski), slovenska toplokrvna pasma, lipicanci, hanoveranci, holštajnci, bavarski, češki in nizozemski toplokrvni konji. Med polnokrvnimi konji sta bili zastopani pasmi arabski in angleški polnokrvni konj. Serološke preiskave na kužni arteritis kopitarjev smo opravili tudi na manjšem številu vzorcev serumov konjev pasme quarter, appaloosa in islandski konj.

Preiskave na kužni arteritis kopitarjev smo opravili tudi na vzorcih serumov in ejakulatih pridobljenih iz žrebetišča na Brigi, kjer vzrejajo odkupljene žrebičke slovenske hladnokrvne in haflinške ter posavske pasme.

Večino vzorcev smo pridobili iz reje A na slovenskem Krasu, kjer je po rejskem programu določeno minimalno število 358 konj pasme lipicanec.

3.1.1.1 Serumski vzorci

V letih 2002–2007 smo na protitelesa proti virusu EAV pregledali 3068 vzorcev serumov.

Kri so odvzeli veterinarji iz Inštituta za rejo in zdravstveno varstvo kopitarjev na Veterinarski fakulteti in veterinarji praktiki iz zasebnih veterinarskih ambulant.

- Krvne vzorce smo centrifugirali 20 minut pri 2000 obr/min in 4 °C.
- Serume in semena smo inaktivirali 30 minut pri 56 °C.
- Do izvedbe nevtralizacijskega testa (NT) smo preiskovane vzorce hranili pri –20 °C.

3.1.1.2. Vzorci semena

V raziskavo smo vključili plemenske žrebce različnih pasem iz različnih koncev Slovenije, pri katerih smo v serumu z NT dokazali specifična protitelesa proti virusu EAV s titrom $\geq 1 : 4$.

Odvzem semena so opravili zaposleni na Inštitutu za reprodukcijo in konje Veterinarske fakultete v Ljubljani. Za odvzem ejakulata so uporabili kobilo v pojavu. Celotni ejakulat so zbrali s pomočjo umetne vagine (model Hanover) zaprtega tipa. Pri istem žrebcu so opravili dva odvzema istega dne ali v razmaku enega tedna. Po odvzemu so ejakulate pretočili iz zbiralnika za seme v 50-mililitrske centrifugirke (TPP, *angl. Techno Plastic Products*, Švica) in jih razredčili s transportnim gojiščem v razmerju 1 : 2 ter jih v hladilni torbi dostavili v laboratorij. V laboratoriju smo vzorce semena centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 1000 × g v centrifugi Rotanta 46 RS (Hettich, Nemčija). Supernatante semena smo do preiskave hranili v 4,5-mililitrskih krioepruvetah (TPP, Švica) pri -70 °C.

3.1.1.3 Brisi sečnice

Brise so odvzeli s sterilno vatenko CE 0373 (Meus S.R.L., Italija) izven pripustne sezone. Takoj po odvzemu so vatenke vložili v 15-mililitrske centrifugirke (TPP, Švica) s transportnim gojiščem (po 2 ml) in jih v hladilni torbi dostavili v laboratorij, kjer smo vzorce brisov centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 1000 × g. Supernatante brisov smo hranili pri -80 °C.

Po odvzemu brisa so žrebcu istega dne na pripustnem mestu, ob prisotnosti kobile, z umetno vagino odvzeli še vzorec semena.

3.1.1.4 Moda

Kastracijo žrebca 282, pasme lipicanec je s pomočjo lokalne anestezije opravil veterinar Anton Pečovnik iz Veterinarske ambulante Sežana, d. o. o.

3.1.2 Celice

Celična linija RK-13 (RK, *angl. rabbit kidney*)

V vseh poskusih izolacije virusa EAV v celični kulturi smo uporabili celično linijo RK-13 (ATCC CCLR7, *angl. American Type Culture Collection*, 17. pasaža, 1. 7. 2005), ki smo jo prejeli od dr. Davida G. Westcotta (Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, Velika Britanija).

3.1.3 Virusi

Referenčni sev Bucyrus

Referenčni sev Bucyrus (ATCC VR 796), ki smo ga uporabljali pri raziskovalnem delu, smo prejeli od dr. Davida G. Westcotta. Virus smo razmnožili v celični kulturi RK-13 in mu z metodo po Reed-Muenchu (Reed in Muench, 1938) določili titer oziroma 50-odstotno infektivno dozo TCID₅₀ (TCID₅₀, *angl. tissue culture infective dose 50 %*).

Sevu Bucyrus smo v celični kulturi RK-13 določali titer tudi s štetjem plakov (*angl. plaque assay*). Koncentracijo virusa smo podali s plaketovnimi enotami v 1 ml suspenzije virusa (PFU/ml).

Slovenski izolat 087-02

Slovenski izolat virusa EAV (087-02) smo uporabili pri izvedbi nevtralizacijskega testa, s katerim smo pri žrebčkih, ki so bili cepljeni z ameriško vakcino Arvac[®], ugotavljali, ali med ameriškim tipom virusa EAV in slovenskim izolatom 087-02 obstaja navzkrižna reaktivnost. Izolat 087-02 smo izolirali iz semena, ki so ga leta 2002 odvzeli perzistentnemu izločevalcu 087 iz reje A.

3.1.4 Gojišča

3.1.4.1 Gojišče za dostavo vzorcev v virološki laboratorij

Transportno gojišče

Za prenos kužnine smo uporabljali gojišče MEM (*angl. minimum essential media*, Gibco[®], Invitrogen Corporation[™], ZDA).

3.1.4.2 Gojišča za klasične virološke metode

Sestava rastnega gojišča za celično linijo RK-13 s 5 odstotki fetalnega govejega seruma, 5 % FBS) (FBS, *angl. fetal bovine serum*)

- 1000 ml gojišča Advanced D-MEM (Gibco[®], Invitrogen Corporation[™], ZDA),
- 50 ml fetalnega govejega seruma (SVA, Batch. No. 1/02, SUPER BVDV free, Svanova[®] Biotech AB, Švedska), ki je bil testiran na prisotnost nukleinske kisline virusa BVD in za katerega nam je proizvajalec jamčil, da ne vsebuje virusa BVD,
- 4 ml GlutaMAX[™]-I Supplement 200 mM (Gibco[®], Invitrogen Corporation[™], ZDA),
- 10 ml (100×) antibiotika z antimikotikom (Antibiotic/Antimycotic Solution, Gibco[®], Invitrogen Corporation[™], ZDA).

pH gojišča smo umerili na 7,4 do 7,6 in ga s sistemom za filtriranje Corning[®] filter systems filtrirali skozi celuloznoacetatni filter s porami velikosti 0,22 µm (Corning, ZDA). Hranili smo ga v hladilniku pri temperaturi od 2 do 8 °C.

Sestava vzdrževalnega gojišča za celično linijo RK-13 z 2 odstotkoma fetalnega govejega seruma (2 % FBS)

Sestava vzdrževalnega gojišča je bila enaka sestavi rastnega gojišča z 2 odstotkoma fetalnega govejega seruma (2 % FBS).

Priprava gojišča z 0,75 odstotka (0,75 % m/v) natrijeve soli karboksimetilceluloze (CMC, *angl. carboxymethyl-cellulose*) za izolacijo virusa EAV v celični kulturi

Opis postopka

- V 500-mililitrsko sterilno steklenico smo odmerili 35 ml ultra čiste vode (*angl. ultrapure water*), ki smo jo pridobili iz sistema za pripravo ultra čiste vode z Vivendi Water RO-CDI PID Water Purification System (Avstrija) in Purelab™ Classic (ELGA LabWater, Velika Britanija).
- V ultra čisto vodo smo počasi dodajali 1,5 g CMC v prahu (C-5678, Sodium salt low viscosity, Sigma-Aldrich CO., Nemčija).
- Raztopino s CMC smo mešali na magnetnem mešalniku Mini MR1 Basic (IKA Labortechnik, Nemčija) v hladni sobi preko noči, da se je raztopina s CMC dobro premešala.
- Naslednji dan smo raztopino s CMC sterilizirali z avtoklaviranjem (20 minut pri 121 °C) in jo ohladili na sobno temperaturo.
- 154 ml gojišča (1×) MEM, ki smo mu predhodno umerili pH na 6,9 ter mu dodali 4 ml FBS in 4 ml (100×) antibiotika z antimikotikom (Gibco®, Invitrogen Corporation™, ZDA), smo hladno sterilizirali s sistemom za filtriranje gojišč (Corning® filter systems, New York, ZDA) s porami velikosti 0,22 µm.
- Tako pripravljeno gojišče MEM smo dodali ohlajeni raztopini CMC. Gojišče smo hranili v hladilniku pri temperaturi od 2 do 8 °C.

Priprava gojišča z 1 odstotkom (1 % m/v) agaroze tipa VII za dokazovanje plakov (*angl. plaque assay*)

2-odstotna raztopina z agarozo tipa VII

- V 500-mililitrsko sterilno steklenico smo odtehtali 5 g agaroze tipa VII (A4018, Low gelling temperature, Sigma-Aldrich CO., Nemčija) in ji dodali 250 ml ultra čiste vode.
- 2-odstotno raztopino z agarozo smo pustili na magnetnem mešalniku v hladni sobi čez noč, da se je dobro premešala.
- Naslednji dan smo raztopino z agarozo sterilizirali z avtoklaviranjem (20 minut pri 121 °C) in jo ohladili na približno 40 °C. Še tekočo smo alikvotirali po 20 ml v 50-mililitrske

centrifugirke ter počakali, da se je agarozna pri sobni temperaturi strdila. Do uporabe smo jo hranili v hladilniku pri temperaturi od 2 do 8 °C.

Sestava gojišča za redčenje 2-odstotne raztopine z agarozo tipa VII

- 235 ml gojišča (2×) MEM (Gibco[®], Invitrogen Corporation[™], ZDA), pH 6,9,
- 10 ml FBS (4 % v/v),
- 5 ml (100×) antibiotika z antimikotikom (2 % v/v).

Pred izvedbo testa s plaki smo 2-odstotno raztopino z agarozo stopili v mikrovalovni pečici in jo še vročo prelili (2-krat po 10 ml) v dve 50-mililitrski centrifugirki. Agarozo smo ohladili na 50 °C in jo vzdrževali pri tej temperaturi v vodni kopeli. Tik pred nanosom na celični sloj smo ji dodali enako količino (10 ml) gojišča za redčenje 2-odstotne raztopine z agarozo in tako dobili 2-krat po 20 ml 1-odstotne raztopine z agarozo, kar zadošča za pripravo dveh plošč s šestimi jamicami (*angl. 6-well plate*, TPP, Švica), katerih skupni volumen znaša 15,53 ml.

3.1.4.3 Bakterijska gojišča za molekularno kloniranje

Sestava tekočega gojišča LB (Luria-Bertani)

- 10 g triptona (Biolife Italiana srl, Italija),
- 5 g kvasnega ekstrakta (Difco, ZDA),
- 5 g NaCl.

2000-mililitrsko čašo smo dopolnili do 1000 ml z ultra čisto vodo in umerili pH na 7,5. Gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem (20 minut pri 121 °C) in ga prelili v dve 1000-mililitrski erlenmajerici 2-krat po 0,5 l. Ohlajenemu gojišču smo dodali 2,5 ml kanamicina (končna koncentracija 50 µg/ml) (Invitrogen[™], ZDA) in ga shranili v hladilnik.

Sestava trdnega gojišča LB (Luria-Bertani)

- 10 g triptona (Biolife Italiana srl, Italija),
- 5 g kvasnega ekstrakta (Difco, ZDA),
- 5 g NaCl,
- 15 g agarja (Biolife Italiana srl, Italija).

2000-mililitrsko čašo smo dopolnili do 1000 ml z ultra čisto vodo in umerili pH na 7,5. Gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem (20 minut pri 121 °C) in ohlajenega (50 °C) nalili v petrijevke (v posamezno petrijevko smo nalili 30 ml). Petrijevke smo shranili v hladilnik. Gojišču v petrijevih ploščah smo pred nanosom transformiranih celic *E. coli* dodali 150 µl kanamicina in ga razmazali s hokejko.

3.1.5 Plazmidi

Pri določanju zaporedja nukleotidov v odseku gena za nukleokapsido (ORF7) virusa EAV smo produkte RT-PCR vstavili v plazmidni vektor pCR[®]4-TOPO[®], ki je sestavni del kompleta TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Invitrogen[™], ZDA).

3.1.6 Začetni oligonukleotidi in sonde

Mesta prileganja izbranih začetnih oligonukleotidov in sond ustrezajo nukleotidnim zaporedjem bralnih okvirjev v sekvenci genoma referenčnega seva Bucyrus (NC_002532), ki so ga objavili den Boon in sod. (1991).

Začetne oligonukleotide so proizvedli pri MWG Biotech AG (Nemčija) ali Invitrogen[™] (ZDA). Sonde, ki smo ju uporabili za hibridizacijo v testu PCR-ELISA, smo naročili pri MWG Biotech AG (Nemčija). Za RT-PCR v realnem času smo uporabili sondo TaqMan[®] MGB, ki so jo proizvedli pri podjetju Applied Biosystems (Warrington, Velika Britanija).

3.1.6.1 Dokazovanje nukleinske kisline virusa EAV

Za dokazovanje odseka v genu za polimerazo (ORF1b) z metodami RT-PCR, »semi-nested« PCR in PCR-ELISA smo uporabili začetne oligonukleotide in oligonukleotidno sondo, ki so podani v tabeli 3-1.

Za dokazovanje odseka v genu za nukleokapsido (ORF7) z metodami RT-PCR, »semi-nested« PCR, PCR-ELISA in RT-PCR v realnem času smo uporabili začetne oligonukleotide in oligonukleotidne sonde, ki so podani v tabeli 3-2.

Tabela 3-1: Začetni oligonukleotidi in sonde, njihova nukleotidna zaporedja in mesto v genomu ter metoda za detekcijo ORF1b.

Gen za polimerazo (ORF1b)	Smiselni začetni oligonukleotid	EAV7 ^a (9263-9282)	EAV11 ^b (9266-9289)
	Protismiselni začetni oligonukleotid	5'-GATGTCTATGCTCCATCATT-3'	5'-GTCTATGCTCCATCATTTGAACCT-3'
	EAV8 ^a (9541-9523) 5'-GGCGTAGGCTCCAATTGAA-3'	RT-PCR (279 bp)	»Semi-nested« PCR (275 bp)
	EAV12 ^b (9732-9707) 5'-GAACCAATTTGTAAGAAGTTGAACAG-3'	–	RT-PCR (467 bp)
	Oligonukleotidna sonda	Metoda	
	EAVpr ^c (9342-9365) 5'-bio-AGCCGTGTAGGCTTATGGTGTGGA-3'	PCR-ELISA	

Legenda:

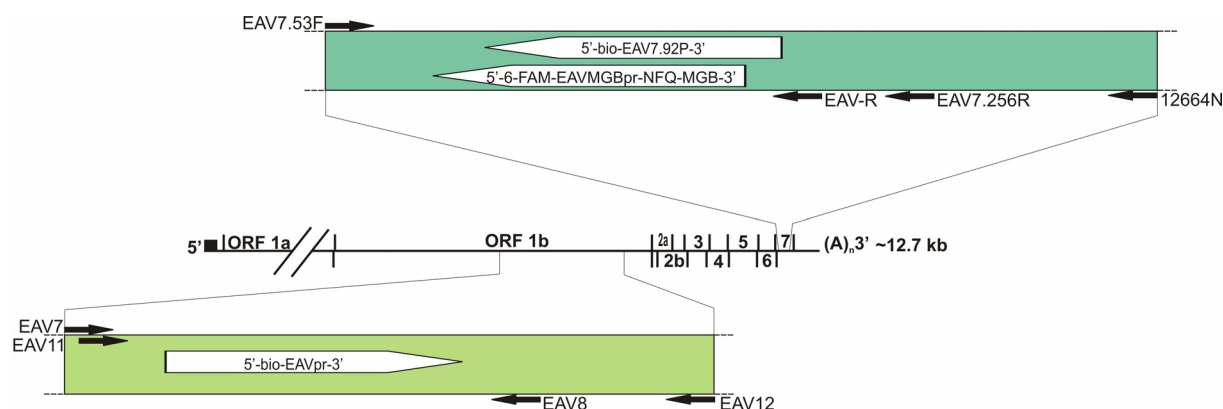
^aVir: Chirnside in Spaan (1990).^bVir: Stadejek in sod. (1999).^cVir: Ramina in sod. (1999).**Tabela 3-2:** Začetni oligonukleotidi in sonde, njihova nukleotidna zaporedja in mesto v genomu ter metoda za detekcijo ORF7.

Gen za nukleokapsido (ORF7)	Smiselni začetni oligonukleotid	EAV7.53F ^b (12365-12385)
	Protismiselni začetni oligonukleotid	5'-GGCGACAGCCTACAAGCTACA-3'
	12644N ^c (12704-12681) 5'-GGTTCCTGGGTGGCTAATAACTAC-3'	RT-PCR (340 bp)
	EAV7.256R ^b (12568-12550) 5'-CGGCATCTGCAGTGAGTGA-3'	RT-PCR in »semi-nested« PCR (204 bp)
	EAV-R ^d (12438-12402) 5'-TTGY ^a GCGGGCGGTTTG-3'	RT-PCR v realnem času (75 bp)
	Oligonukleotidna sonda	Metoda
	EAV7.29P ^b (12425-12404) 5'-bio-TTGCGGACCCGCATCTGACCAA-3'	PCR-ELISA
	EAVMGBpr ^d (12419-12402) 5'-6-FAM-ACCCGCATCTGACCAAAC-NFQ-MGB-3'	RT-PCR v realnem času

Legenda:

^aY=C ali T.^bVir: Balasuriya in sod. (2002b).^cVir: Balasuriya in sod. (2004c).^dVir: Mankoč in sod. (2007).

Mesta prileganja izbranih parov začetnih oligonukleotidov in sond na genom referenčnega seva Bucyrus so shematsko prikazana na sliki 3-1.



Slika 3-1: Shematski prikaz prileganja začetnih oligonukleotidov in sond na genom referenčnega seva Bucyrus.

3.1.6.2 Genotipizacija virusa EAV

Za genotipizacijo slovenskih izolatov virusa EAV smo izbrali začetne oligonukleotide (Tabela 3-3), ki so specifični za gen poglavitnega glikoproteina GP₅ (ORF5).

Tabela 3-3: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje ORF5.

Gen za glikoprotein GP ₅ (ORF5)	Smiselni začetni oligonukleotid	ORF5 ^b (11222-11241)	CR2 ^c (11272-11296)
	Protismiselni začetni oligonukleotid	5'-AGCGCTTCACAGACTTCACC-3'	5'-GCCAR ^a TTTGCTGCGATATGATGA-3'
	ORF5a ^b (11842-11861) 5'-CCGTAGGCCACTGCATAATC-3'	RT-»touchdown« PCR (640 bp)	—
	EAV32 ^c (11836-11817) 5'-TGGGCCTACCTGGGACTAACAAC-3'	—	»nested« PCR (519 bp)

Legenda:

^aR=G ali A.

^bVir: Hornyák in sod. (2005).

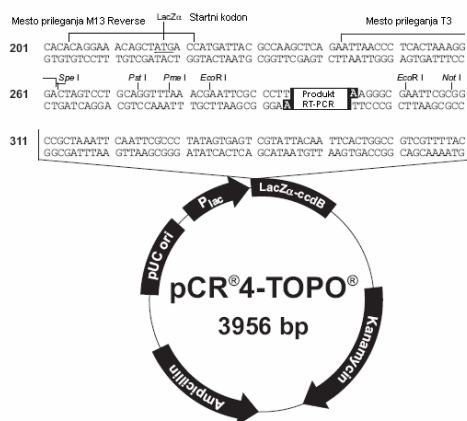
^cVir: Stadejek in sod. (1999).

3.1.6.3 Sekvenciranje produktov RT-PCR

Odsek gena za polimerazo (ORF1b) in odsek gena za nukleokapsido (ORF7)

Specifičnost pomnoženih produktov RT-PCR smo določili s sekvenčno reakcijo. Večinoma smo uporabljali pristop direktnega sekvenciranja z začetnimi oligonukleotidi EAV11 in EAV12 (ORF1b) ter EAV7.53F in 12644N (ORF7).

Nekaterim produktom RT-PCR, pomnoženim z začetnima oligonukleotidoma EAV7.53F in 12644N, nismo uspeli določiti nukleotidnega zaporedja z omenjenimi začetnimi oligonukleotidi, zato smo te produkte vstavili v plazmidni vektor, s katerim smo transformirali kompetentne bakterijske celice *E. coli* (One Shot TOP10 Competent Cells, Invitrogen™, ZDA). Namnožene plazmide smo izolirali iz posamezne bakterijske kulture in določili nukleotidna zaporedja. Pri tem smo uporabili univerzalna začetna oligonukleotida M13 Reverse in T3 iz kompleta TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen™, ZDA). Oba začetna oligonukleotida sta se prilegala specifično na cDNA plazmidnega vektorja pCR®4-TOPO® (Slika 3-2).



Slika 3-2: Plazmid pCR®4-TOPO® in njegove lastnosti. Na plazmidu je prikazano specifično mesto za začetek podvojevanja (PUC ori), promotorska regija gena LacZα, ki je povezan z letalnim genom ccdB. Znotraj gena LacZα-ccdB je označen startni kodon ATG, mesta prileganja začetnih oligonukleotidov M13 Reverse in T3, označena so mesta, na katerih režejo nekatere restriksijske endonukleaze, in mesto za vnos fragmenta DNA (produkt RT-PCR) v plazmid. V plazmidu sta tudi gena za odpornost proti ampicilinu in kanamicinu. Vir: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manual/topotaseq_man.pdf.

Odsek gena za poglobitni glikoprotein GP₅ (ORF5)

Pri določanju zaporedja nukleotidov v delu gena, ki kodira poglobitni protein GP₅, smo uporabljali enake začetne oligonukleotide kot pri pomnoževanju z metodama RT-»touchdown« PCR in »nested« PCR.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava celičnih kultur

Celične kulture RK-13 smo gojili v polistirenskih steklenicah za celično kulturo T-25 in T-75 (TPP, Švica). Hranili smo jih v vlažnem inkubatorju Forma Scientific CO₂ Water Jacketed Incubator (Labequip[®] Ltd., Kanada) pri 37 °C in 5-odstotni vsebnosti CO₂.

3.2.1.1 Razmnoževanje celične linije RK-13

Celično linijo RK-13 smo tripsinizirali. Subkulturo smo običajno pripravili 3. ali 4. dan, ko so se celice razrasle po celotni površini steklenice T-25 ali T-75.

Opis postopka

- S celičnega sloja smo odlili rastno gojišče s 5 odstotki FBS.
- Da bi sprali odmrle celice in odstranili FBS, smo celice RK-13 oplaknili z gojiščem MEM.
- V steklenico smo nalili mešanico tripsina z EDTA (0,05-odstotni Trypsin, EDTA•4Na, Gibco[®], Invitrogen CorporationTM), ki smo ga predhodno ogreli na sobno temperaturo.
- Steklenico s celicami smo inkubirali 10–15 minut pri 37 °C in v atmosferi s 5 odstotki CO₂.
- Ko so se celice odlepile od podlage, smo jih s pipeto rahlo premešali in prenesli v 15-mililitrsko centrifugirko, v katero smo predhodno dodali 1 ml ravnega gojišča.
- Celično suspenzijo v tripsinu smo centrifugirali 5 minut pri 800 obr/min in 20 °C.
- Po končanem centrifugiranju smo supernatant odlili in celice suspendirali v rastnem gojišču v razmerju 1 : 3.
- Tako pripravljeno suspenzijo celic smo porazdelili v nove steklenice za celično kulturo.
- Steklenice s celično kulturo RK-13 smo do naslednje tripsinizacije inkubirali pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.

Iz ene steklenice za celično kulturo T-25 smo pripravili tri nove steklenice T-25 ali eno steklenico T-75.

3.2.1.2 Celična kultura RK-13 za izolacijo virusa EAV v celični kulturi

Za izolacijo virusa EAV smo potrebovali en dan staro celično kulturo RK-13, ki smo jo pripravili iz največ tri dni stare celične kulture RK-13. V vsako jamico plošče s šestimi jamicami (*angl. 6-well plate*) smo odpipetirali po 3 ml suspenzije s približno 250.000 celicami RK-13 v enem mililitru rastnega gojišča. Na ta način smo zagotovili potrebno gostoto celic, ki so v 24 urah prerasle celotno dno jamice s premerom 33,7 mm.

Enako gostoto celic (250.000 celic/ml) v potrebni količini rastnega gojišča smo zagotovili tudi v primeru, ko smo izolacijo virusa v celični kulturi RK-13 izvajali v steklenicah T-25, T-75, na predmetnih stekelcih z osmimi jamicami (*angl. 8-well chamber slide*, Lab-Tek® Chamber Slide™, Nunc™, ZDA) ali v mikrotitrskih ploščah (TPP, Švica). V posamezno steklenico T-25 smo odpipetirali 6 ml, v steklenico T-75 30 ml, v vsako jamico predmetnega stekelca 400 µl, v vsako jamico mikrotitrskih plošč pa 250 µl suspenzije celic RK-13. Celice iz ene steklenice T-25 so zadostovale za pripravo ene plošče s šestimi jamicami ali treh steklenic T-25 ali štirih predmetnih stekelc z osmimi jamicami ali dveh mikrotitrskih plošč.

3.2.1.3 Suspenzija celic RK-13 v vzdrževalnem gojišču z 2 odstotkoma FBS za nevtralizacijski test (NT)

Za izvedbo NT smo potrebovali suspenzijo celic z večjo gostoto kot za poskus izolacije virusa EAV v celični kulturi RK-13. V ta namen smo iz ene steklenice T-75 s celično kulturo RK-13 pripravili 20 ml suspenzije s 350.000 celicami RK-13 v enem mililitru vzdrževalnega gojišča, kar je zadostovalo za pripravo dveh mikrotitrskih plošč, v jamice katerih smo odpipetirali po 100 µl tripsiniziranih celic RK-13.

3.2.2 Namnoževanje referenčnega seva Bucyrus v celični kulturi RK-13

Opis postopka

- Originalno raztopino referenčnega seva Bucyrus P9 smo razredčili 1 : 2 v sterilni ultra čisti vodi.
- Za pripravo inokuluma smo uporabili 200 µl referenčnega seva Bucyrus, ki smo ga razredčili v 4,8 mililitrih gojišča MEM.

- Iz steklenice T-75 s 24 ur staro celično kulturo RK-13 smo odlili rastno gojišče in na celični sloj inokulirali suspenzijo virusa v gojišču MEM.
- Inokulum smo inkubirali 1 uro pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Po končani adsorbciji virusa, smo inokulum odlili in celičnemu sloju dodali 30 ml vzdrževalnega gojišča.
- Steklenico smo inkubirali pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Po dveh dneh inkubacije, ko so citopatske spremembe zajele 70–80 odstotkov celic, smo steklenico zamrznili pri –80 °C.
- Celično kulturo RK-13 z namnoženim virusom smo odmrznili, suspenzijo virusa smo prenesli v 50-mililitrsko centrifugirko in jo centrifugirali 15 minut pri 3600 obr/min in 4 °C.
- Supernatant virusa smo razdelili na alikvote po 400 µl in jih v slamicah shranili v kriogeni posodi s tekočim dušikom pri –196 °C.

Referenčni sev Bucyrus smo uporabili za pozitivno kontrolo pri dokazovanju virusa EAV z molekularnimi in klasičnimi virološkimi metodami.

Določitev titra referenčnemu sevu Bucyrus po metodi Reed-Muench

Titracijo virusa smo izvajali v mikrotitrski ploščici. V vsaki jamici mikrotitrške ploščice je bilo 100 µl en dan stare celične kulture RK-13 v rastnem gojišču s 5 % FBS.

Opis postopka

- Iz kriogene posode s tekočim dušikom smo vzeli slamico s suspenzijo virusa in jo dali v čašo s hladno vodo (od 4 do 8 °C), da se je njena vsebina odtajala.
- Odtajano slamico smo razkužili z alkoholom in ji s sterilnimi škarjami najprej odrezali del nad čepom iz vate, potem pa še tik pod delom, kjer smo slamico zatalili z ožgano pinceto.
- Suspenzijo virusa smo prenesli v 2,5-mililitrsko krioepruveto (Eppendorf, Nemčija).
- Iz te suspenzije virusa smo v vzdrževalnem gojišču pripravili desetkratne razredčine virusa od 10⁻¹ do 10⁻⁸ (1800 µl gojišča in 200 µl suspenzije virusa).

- Iz jamic na mikrotitrski plošči smo odstranili gojišče in v osem jamic (od A do H) vsake kolone (od 1 do 8) inokulirali 25 µl posamezne desetkratne razredčine virusa.
- Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 1 uro pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Po končani adsorbciji virusa smo v vsako jamico odpipetirali po 125 µl vzdrževalnega gojišča (2 % FBS).
- Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 3 dni pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Celice smo dnevno opazovali z invertnim svetlobnim mikroskopom (Inverses mikroskop Axiovert 25, Zeiss, Nemčija) in ugotavljali, ali se je v jamicah s celično kulturo RK-13 pojavil citopatski efekt. V vsaki koloni smo pri posamezni razredčini virusa določili število jamic z izraženim citopatskim efektom.
- Z interpolacijsko formulo smo virusu določili približno vrednost titra, ki smo ga izrazili s številom infektivnih enot TCID₅₀ v mililitru inokuluma (10^X TCID₅₀/ml):

$$X = [-\log_{10}(\text{razredčina virusa, ki povzroči CPE pri več kot 50 \% jamic})] + [(\% \text{ jamic s CPE pri razredčini virusa, ki je infektivna za več kot 50 \% jamic}) - 50 \%] / [(\% \text{ jamic s CPE pri razredčini virusa, ki je infektivna za več kot 50 \% jamic}) - (\% \text{ jamic s CPE pri razredčini virusa, ki je infektivna za manj kot 50 \% jamic})] \times \log_{10}10 + [\log_{10}(1000 \text{ µl/volumen inokuluma})]$$

Določitev titra referenčnemu sevu Bucyrus s štetjem plakov

Titracijo referenčnega seva Bucyrus smo izvajali v dveh ploščah s šestimi jamicami. V vsaki jamici je bilo 250 µl en dan stare celične kulture RK-13 v rastnem gojišču s 5 % FBS.

Opis postopka

- V vzdrževalnem gojišču smo pripravili desetkratne razredčine virusa od 10^{-1} do 10^{-8} (1800 µl gojišča in 200 µl suspenzije virusa).
- Iz jamic smo odstranili gojišče in v celično kulturo inokulirali 500 µl posamezne desetkratne razredčine virusa (od 10^{-4} do 10^{-8}) v dveh ponovitvah.
- Ploščo smo inkubirali 1 uro pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Po končani adsorbciji virusa smo v vsako jamico odpipetirali po 3 ml gojišča z 1-odstotno (1 % m/v) raztopino agaroze tipa VII.

- Ploščo smo inkubirali 3 dni pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Celice smo fiksirali tako, da smo v vsako jamico na plast agaroze odpipetirali po 2 ml 1-odstotnega kristalno vijoličnega barvila.
- Ploščo smo inkubirali 2 uri pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Plast agaroze smo odstranili pod curkom mlačne vode iz vodovodne pipe.

Kristalno vijolično barvilo je vitalno barvilo, ki žive celice pobarva vijolično, medtem ko ostanejo področja, kjer je celični sloj poškodovan v obliki plakov, nepobarvana.

- Plake smo prešteli v tistih dveh jamicah, kjer je določena razredčina virusa povzročila poškodbe celičnega sloja v obliki ostro omejenih okroglih področij, ki so bila ločena med seboj in smo jih lahko prešteli s prostim očesom.
- Število prešteti plakov smo delili s številom inokuliranih jamic, da smo dobili povprečno število plakov pri dani razredčini virusa.

Titer virusa smo izrazili s številom plakotvornih enot PFU v mililitru inokuluma (PFU/ml) po formuli: povprečno število plakov $\times$ (1/razredčina virusa, pri kateri smo prešteli plake) $\times$ (1/volumen inokuluma v ml).

1-odstotna raztopina kristalno vijoličnega barvila (1 % m/v)

- Kristalno vijolično barvilo (Merck, Nemčija) 1,0 g.
- 20-odstotna raztopina etanola 100 ml.

3.2.3 Dokazovanje protiteles proti virusu EAV

3.2.3.1 Nevtralizacijski test (NT)

Z nevtralizacijskim testom smo v vzorcih serumov in semen dokazovali prisotnost nevtralizacijskih protiteles proti virusu EAV. Test smo izvajali v mikrotitrskih ploščah z ravnim dnom (TPP, Švica) v skladu z navodili iz Diagnostičnega priročnika OIE (2004, peta izdaja, Poglavje 2.5.10. (2) (a)).

Opis postopka

- Preiskovane vzorce smo segrevali v vodni kopeli (Sutjeska, Beograd, SČG) 30 minut pri 56 ± 1 °C, da smo inaktivirali komplement.
- V jamice na mikrotitrski plošči smo z dispenzerjem Multipette plus (Eppendorf, Nemčija) nanесли po 25 μ l gojišča Advanced D-MEM z dodatkom (100 $\times$) antibiotika z antimikotikom (Gibco[®], Invitrogen CorporationTM, ZDA).
- Dvakratne razredčine preiskovanih vzorcev smo pripravili tako, da smo v jamice v prvi vrsti odpipetirali po 25 μ l vsakega preiskovanega vzorca in z multikanalno pipeto prenašali po 25 μ l razredčine iz prve vrste v naslednje vrste.
- Serijo razredčin istega preiskovanega vzorca (od začetne razredčine 1 : 2 do končne 1 : 256) smo testirali v dveh paralelkah.
- Delovno razredčino virusa, ki je vsebovala od 30 do 300 infektivnih enot TCID₅₀ v 25 μ l inokuluma, smo pripravili iz enakega gojišča, kot smo ga uporabili za redčenje preiskovanih vzorcev. Delovni razredčini virusa smo dodali še serum budre (10 % v končni delovni razredčini) kot vir komplementa.
- Preiskovanim vzorcem smo z dispenzerjem dodali enak volumen (25 μ l) delovne razredčine virusa. Preiskovane vzorce smo tako še dodatno razredčili in na ta način dobili začetno razredčino preiskovanega vzorca 1 : 4 in končno 1 : 512.
- Mešanico preiskovanega vzorca in virusa smo inkubirali 1 uro pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Po inkubaciji smo v vsako jamico nanесли po 100 μ l suspenzije celic RK-13 z gostoto 350.000 celic v mililitru vzdrževalnega gojišča. Suspenzijo celic smo pripravili s tripsinizacijo celične kulture RK-13, ki je bila stara največ 5 dni.
- Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali od 48 do 72 ur pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Po inkubaciji smo celice dnevno opazovali z invertnim svetlobnim mikroskopom. Kadar v celični kulturi RK-13 nismo opazili CPE, je pomenilo, da so protitelesa preprečila pritrdjevanje in vstop virusa EAV v celice. Kadar pa v preiskovanem vzorcu ni bilo nevtralizacijskih protiteles, smo opazili CPE.
- Rezultat smo imeli za pozitiven, če smo v preiskovanem vzorcu izmerili titer protiteles IgG, ki je bil večji ali enak 1 : 4.

Pri izvajanju vsakega NT smo opravili naslednje kontrole:

Kontrola s pozitivnim serumom

Za pozitivno kontrolo smo uporabili pozitivni standardni serum s titrom protiteles IgG 1 : 64, ki smo ga prejeli iz nacionalnega referenčnega laboratorija v Veliki Britaniji (Veterinary Laboratories Agency, Weybridge).

Kontrola z negativnim serumom

Za negativno kontrolo smo uporabili serum konjev, pri katerih pri predhodnih testiranjih z NT nismo dokazali protiteles proti virusu EAV.

Kontrola virusa

Test je bil veljaven, če je delovna razredčina virusa vsebovala od 30 do 300 infektivnih enot TCID₅₀ v 25 µl inokuluma. Validacijo testa smo opravili s povratno titracijo, tako da smo iz delovne razredčine virusa pripravili serijo treh zaporednih desetkratnih razredčin (od 1 : 10 do 1 : 1000). Posamezno razredčino smo nanесли (25 µl) v eno kolono na mikrotitrski plošči (od A do H). Delovna razredčina virusa je vsebovala 100 infektivnih enot TCID₅₀, če je iz nje pripravljena stokratna razredčina vsebovala 1 infektivno enoto TCID₅₀, ki je bila kužna za 50 % testiranih celičnih kultur RK-13 (pojav CPE v štirih jamicah od osmih). Medtem ko razredčina 1 : 1000 ni povzročila vidnih poškodb v celični kulturi RK-13 v nobeni od osmih testiranih jamic na mikrotitrski plošči.

Kontrola celic RK-13

V test smo vključili tudi celično kulturo RK-13.

3.2.4 Molekularne metode za dokazovanje nukleinske kisline virusa EAV v semenu

Za optimizacijo vseh molekularnih metod smo uporabili celokupno RNA, ki smo jo izolirali iz supernatanta celične kulture RK-13, v kateri smo gojili referenčni sev Bucyrus. Izolirano RNA smo uporabljali za pozitivno kontrolo pri preverjanju uspešnosti izolacije celokupne RNA in pri dokazovanju virusnega genoma z različnimi metodami pomnoževanja na osnovi RT-PCR. V vseh poskusih dokazovanja virusa EAV z molekularnimi metodami smo

uporabljali tudi neokuženo celično kulturo RK-13 ali sterilno ultra čisto vodo brez nukleaz UltraPure™ DEPC-Treated Water [H₂O-DEPC], obdelano z 0,1 odstotkom dietilpirokarbonata (DEPC) (Invitrogen™, ZDA), ki sta nam služili za negativno kontrolo.

3.2.4.1 Izolacija celokupne RNA z reagentom TRIzol®

Metoda temelji na postopku, ki sta ga leta 1987 razvila Chomczynski in Sacchi (1987).

Opis postopka

- Za izolacijo celokupne RNA s TRIzolom (Invitrogen™, ZDA) smo uporabili 250 µl supernatanta, ki smo ga dobili po centrifugiranju semena.
- Supernatant smo prenesli v sterilno plastično 1,5-mililitrsko epruveto (Eppendorf, Nemčija) in mu dodali 750 µl TRIzola. Mešanico vzorca in TRIzola smo dobro premešali ter inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi.
- Po inkubaciji smo mešanici dodali 200 µl kloroforma (CHCl₃) (Merck, Nemčija), dobro zaprli in premešali na vibracijskem mešalniku ter ponovno inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi.
- Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 15 minut pri 12.000 × g in 4 °C.
- Po centrifugiranju smo vodno fazo (približno 500 µl) previdno prenesli v novo 1,5-mililitrsko epruveto in dodali 500 µl izopropanola (Merck, Nemčija), dobro premešali, inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi in centrifugirali 10 minut pri 12.000 × g in 4 °C.
- Po centrifugiranju smo supernatant odlili, RNA smo sprali s 500 µl 75-odstotnega etanola, ki je bil ohlajen na –20 °C. Vsebino epruvete smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku in centrifugirali najmanj 5 minut pri 7500 × g in 4 °C.
- Supernatant smo odlili ter RNA sušili na zraku približno 15 minut.
- Izolirano celokupno RNA smo raztopili v 100 µl H₂O-DEPC in jo do uporabe zamrznili pri –80 °C.

Po zgoraj opisanem postopku smo izolirali celokupno RNA:

- iz celičnih kultur RK-13, v katerih smo poizkušali namnožiti viruse EAV iz semena serološko pozitivnih žrebcev. Inficirano celično kulturo smo najprej zamrznili za 1 uro pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po odmrzovanju smo inficirano celično kulturo prenesli v 15-mililitrsko centrifugirko in jo centrifugirali 10 minut pri $1000 \times g$ in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugiranju smo za izolacijo celokupne RNA uporabili 250 μl supernatanta;
- iz primarnih celičnih kultur konjskih levkocitov, v katerih smo poizkušali namnožiti tiste viruse EAV iz semena, ki jih nismo uspeli namnožiti v celični kulturi RK-13.

3.2.4.2 Metoda reverzne transkripcije s sledečo verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR) ali klasična metoda RT-PCR

Reverzno transkripcijo RNA s sledečim pomnoževanjem cDNA smo izvajali v eni stopnji. Uporabljali smo reagente iz komercialnega kompleta Access RT-PCR System (Promega, ZDA), ki v eni reakcijski mešanici z encimom reverzna transkriptaza AMV (*angl. Avian Myeloblastosis Virus*) in polimerazo DNA *Tfl* (*lat. Thermus flavus*) združuje proces reverzne transkripcije in proces pomnoževanja.

Pomnoževali smo odsek v genu za polimerazo (ORF1b) in odsek v genu za nukleokapsido (ORF7).

V prostoru za pripravo reakcijskih mešanic smo pripravili ustrezno število 0,2-mililitrskih sterilnih polipropilenskih epruvet s tanko steno za PCR (*angl. PCR tubes, thin-walled*, Eppendorf, Nemčija), v katere smo odpipetirali 46 μl reakcijske mešanice. Reakcijski mešanici, ki je vsebovala (1 $\times$) pufer AMV/*Tfl*, 1 mM MgSO_4 , 0,2 mM vsakega nukleotida (dATP, dCTP, dGTP in dTTP), 0,4 mM posameznega začetnega oligonukleotida, 5 enot reverzne transkriptaze AMV, 5 enot *Tfl* polimeraze DNA in 29 μl H_2O -DEPC, smo dodali 4 μl izolirane RNA, tako da je bil končni volumen 50 μl .

Epruvete smo vstavili v ciklični termostatski T3 Thermocycler (Biometra, Nemčija) in za pomnoževanje uporabili ustrezen temperaturni program. Vsi programi se začnejo z reverzno transkripcijo (45 minut pri $48\text{ }^{\circ}\text{C}$) in denaturacijo (2 minuti pri $94\text{ }^{\circ}\text{C}$), ki jim sledi 40 ciklov pomnoževanja [denaturacija (30 sekund pri $94\text{ }^{\circ}\text{C}$), prileganje (1 minuta pri izbrani

temperaturi prileganja za posamezen par začetnih oligonukleotidov), podaljševanje (2 minuti pri 68 °C)] in zaključno podaljševanje (7 minut pri 68 °C).

Pomnoževanje odseka v genu za polimerazo (ORF1b)

Za pomnoževanje ORF1b smo testirali dva para začetnih oligonukleotidov (Tabela 3-1). Temperatura prilaganja posameznega para začetnih oligonukleotidov je bila naslednja:

- za par EAV7/EAV8: 52 °C,
- za par EAV11/EAV12: 48 °C.

S parom začetnih oligonukleotidov EAV7/EAV8, ki se v genomu referenčnega seva Bucyrus (NC_002532) prilegata na mesti 9263-9282 in 541-9523, smo pomnožili 279 bp velik odsek, s parom EAV11/EAV12, ki se prilegata na mesti 9266-9289 in 9732-9707, pa 467 bp velik odsek v virusnem genomu (Tabela 3-1, Slika 3-1).

Pomnoževanje odseka v genu za nukleokapsido (ORF7)

Za pomnoževanje ORF7 smo prav tako testirali dva para začetnih oligonukleotidov (Tabela 3-2). Temperatura prilaganja posameznega para začetnih oligonukleotidov je bila naslednja:

- za par EAV7.53F/EAV7.256R: 60 °C,
- za par EAV7.53F/12664N: 56 °C.

S parom začetnih oligonukleotidov EAV7.53F/EAV7.256R, ki se prilegata na mesti 12365-12385 in 12568-12550, smo pomnožili 204 bp velik odsek, s parom EAV7.53F/12664N, ki se prilegata na mesti 12365-12385 in 12704-12681, pa 340 bp velik odsek v virusnem genu, ki kodira protein nukleokapside (Tabela 3-2, Slika 3-1).

3.2.4.3 »Semi-nested« PCR

V primeru, ko smo pri analizi produktov RT-PCR z elektroforezo v agaroznem gelu dobili negativen rezultat, smo dobljene produkte poskušali še dodatno pomnožiti z »notranjima« začetnima oligonukleotidoma. Za dodatno pomnoževanje produktov prvega pomnoževanja

ORF1b s parom EAV11/EAV12 smo izbrali kombinacijo začetnih oligonukleotidov EAV11/EAV8, medtem ko smo izbor začetnih oligonukleotidov za dodatno pomnoževanje prvega pomnoževanja ORF7 s parom EAV7.53F/12664N povzeli po Balasuriyi in sod. (2002) (Tabela 3-2, Slika 3-1), ki so par začetnih oligonukleotidov EAV7.53F/EAV7.256R uporabili za pomnoževanje nukleinske kisline virusa EAV z metodo RT-PCR v realnem času.

Dodatno pomnoževanje smo izvajali z encimom Platinum[®] *Taq* polimeraza DNA (Invitrogen[™], ZDA). Reakcijska mešanica je vsebovala (1×) pufer PCR, 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen[™], ZDA), 0,2 mM mešanico nukleotidov (10 mM dNTP Mix, ki vsebuje 2,5 mM vsakega nukleotida, PE Applied Biosystems, ZDA), 0,4 mM posameznega začetnega oligonukleotida, 2,5 enote *Taq* polimeraze DNA (Invitrogen[™], ZDA) in 39 µl H₂O-DEPC.

V vsako reakcijo dodatnega pomnoževanja smo dodali 1 µl produkta RT-PCR. Končni volumen reakcij »semi-nested« PCR je bil 50 µl.

Dodatno pomnoževanje je potekalo po naslednji shemi: začetna denaturacija (2 minuti pri 94 °C), sledilo je 35 ciklov pomnoževanja [denaturacija (30 sekund pri 94 °C), prileganje (30 sekund pri 52 °C), podaljševanje (1 minuta pri 72 °C)] in zaključno podaljševanje (7 minut pri 72 °C).

3.2.4.4 Analiza produktov RT-PCR in produktov »semi-nested« PCR

Produkte RT-PCR in »semi-nested« PCR smo določevali z elektroforezo v agaroznem gelu in pufru TAE. Koncentracijo agaroze v gelu smo izbirali glede na pričakovano dolžino molekul DNA. Najpogosteje smo uporabljali 1,8-odstotni agarozni gel. Agarozni gel smo pripravili iz 1,8 g agaroze UltraPure[™] Agarose (Product of Spain, Invitrogen[™], ZDA), ki smo ji dolili 100 ml (1×) pufru TAE. Agarozo smo raztopili s segrevanjem v mikrovalovni pečici, ohladili na približno 60 °C in tekoči gel vlili v pripravljene modele. V nestrjeni gel smo vstavili glavniki za izdelavo žepkov in počakali, da se gel pri sobni temperaturi strdi. V žepke smo nanesti po 15 µl posameznega vzorca (produkt RT-PCR ali »semi-nested« PCR), ki smo mu pred nanosom v žepke dodali 3 µl (6×) nanašalnega pufru. Poleg vzorcev smo v žepke nanesti tudi 2 µl standarda DNA za določanje velikosti fragmentov DNA velikosti od 100 do 2072 bp (100 bp DNA Ladder, Invitrogen[™], ZDA), s pomočjo katerega smo ocenili velikost produktov pomnoževanja. Ločevanje molekul DNA je potekalo pri napetosti 100 V približno 45 minut. Po končani elektroforezi smo gel potopili za 30 minut v raztopino etidijevega

bromida (0,5 µg/ml). V tem času je etidijev bromid interkaliral med baze v molekuli DNA. Gel smo pregledali na presvetljevalniku z UV-svetlobo GeneGenius (Syngene, Velika Britanija) pri valovni dolžini 302 nm in ga posneli z videokamero.

Sestava (1×) pufra TAE

- Tris (40 mM).
- Acetat (20 mM).
- EDTA (2 mM).

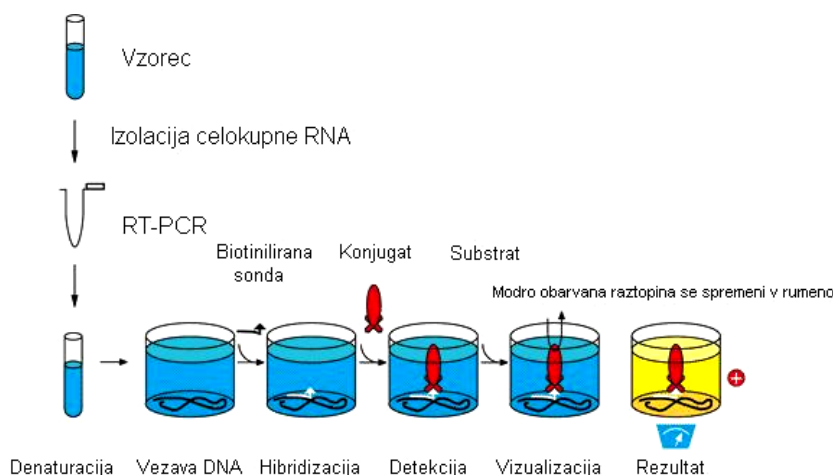
Sestava (6×) nanašalnega pufra

- Bromfenol modro (0,25 %).
- Ksilen cianol (0,25 %).
- Saharoza (40 %) v EDTA (5 mM).

Specifičnost produktov RT-PCR in »semi-nested« PCR (5 µl) smo potrdili z metodo RT-PCR-ELISA. V primerih, ko je bil rezultat testiranja negativen, smo preostanek produkta RT-PCR (30 µl) nanegli na gel in ga kasneje s skalpelom iz njega izrezali. Iz izrezanih koščkov agaroznega gela (Eppendorf, Nemčija) smo s komercialnim kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA) izolirali in očistili produkte RT-PCR. Očiščeni produkt (5 µl) smo ponovno testirali z metodo RT-PCR-ELISA. Če je bil rezultat ponovnega testiranja negativen, smo očiščenemu produktu s sekvenciranjem določili nukleotidno zaporedje in na ta način še dodatno potrdili specifičnost produkta RT-PCR. Tako smo preverili morebitne mutacije v produktu RT-PCR na mestu prileganja biotinilirane sode, ki bi lahko preprečevale komplementarno parjenje med sondo in iskanim odsekom DNA ter povzročile negativen rezultat.

3.2.4.5 RT-PCR-ELISA

Produkte RT-PCR in »semi-nested« PCR smo dokazovali s komercialnim kompletom Hybridowell™ Universal kit (Argene, Francija). Test smo izvedli po navodilih proizvajalca.



Slika 3-3: Princip metode RT-PCR-ELISA.

Opis postopka

- V 1,5-mililitrske sterilne epruvete smo odpipetirali 5 μ l produkta RT-PCR ali »semi-nested« PCR in dodali 10 μ l prve raztopine za denaturacijo DNA (»denaturation solution 1«).
- Mešanico smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku in ji dodali še 10 μ l druge raztopine za denaturacijo DNA (»denaturation solution 2«).
- Mešanico smo ponovno dobro premešali in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi.
- Denaturiranim produktom RT-PCR smo dodali 200 μ l raztopine, ki omogoča direktno vezavo DNA (»coating solution«) na dno jamic. Vsak vzorec smo testirali v dveh vzporednih ponovitvah, tako da smo v posamezni jamici nanesti po 100 μ l raztopine denaturiranih produktov RT-PCR. Štiri jamice smo uporabili za pozitivno (referenčni sev Bucyrus) in negativno kontrolo iz kompleta (»negative controle R1«).
- Sledila je dvourna inkubacija pri 37 °C.
- Po inkubaciji smo jamice izpraznili z lahkim odtisom mikrotitrne plošče na papirnati brisači.
- Dodali smo 100 μ l hibridizacijske raztopine z biotinilirano sondo (koncentracija 50 ng/ml) in inkubirali 30 minut pri 37 °C.

Za potrditev specifičnosti produktov pomnoževanja ORF1b in ORF7 smo uporabili biotinilirani sonde EAVpr (Ramina in sod., 1999) (Tabela 3-1, Slika 3-1) ter EAV7.92P (Balasuriya in sod., 2002) (Tabela 3-2, Slika 3-1).

- Po inkubaciji smo jamice spraznili z otresanjem in jih 4-krat dobro sprali z raztopino za spiranje (»washing solution«). Tako smo odstranili presežek vzorca in nevezane sonde.
- Hibride, ki so nastali med odsekom DNA v produktu RT-PCR in specifično biotinilirano sondo, smo dokazali s konjugatom beljakovine streptavidin in encima hrenove peroksidaze (»streptavidin-peroxidase conjugate«). V jamice smo nanесли 100 µl konjugata in inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi.
- Po inkubaciji smo jamice spraznili in ponovno 4-krat sprali.
- Dodali smo 100 µl substrata TMB (tetra-metil benzidin) ter inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi v temi. V jamicah s hibridom je prišlo do barvne reakcije. Barva prej brezbarvnega substrata se je spremenila v modro.
- Razvijanje barve smo zaustavili s 100 µl raztopine za ustavitev reakcije (»stop solution«), ki vsebuje klorovodikovo kislino (HCl). Barva substrata se je spremenila v rumeno. RT-PCR-ELISA je semi-kvantitativni test, zato je intenziteta rumene barve sovpadala s količino produkta RT-PCR.
- Optično gostoto OD (*angl. optical density*) smo izmerili s spektrofotometrom Sunrise (Tecane, Francija) pri valovni dolžini 450 nm.

Rezultate smo interpretirali po navodilih proizvajalca na naslednji način:

- Mejno vrednost (CO) (*angl. cut-off value*) smo izračunali po formuli:
$$CO = \text{povprečna vrednost OD negativne kontrole R1} + 0.150.$$
- Vzorec, pri katerem je povprečna vrednost OD višja od $CO + 10 \%$, je pozitiven.
- Vzorec, pri katerem je povprečna vrednost OD nižja od $CO - 10 \%$, je negativen.

V primeru lažno negativnega rezultata, ko smo produkt pomnoževanja z metodo RT-PCR dokazali z elektroforezo v agaroznem gelu, nismo pa omenjenega produkta uspeli dokazati z metodo RT-PCR-ELISA, smo produkt RT-PCR očistili s komercialnim kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA). Iz reakcijske mešanice za RT-PCR v eni stopnji smo na ta način odstranili detergente, ki lahko ovirajo hibridizacijo med sondo in tarčnim odsekom DNA.

(1×) Raztopina za spiranje

(1×) Raztopino za spiranje smo pripravili tako, da smo (10×) raztopino za spiranje razredčili v razmerju 1 : 10 z ultra čisto vodo.

Konjugat beljakovine streptavidin in encima hrenove peroksidaze

Konjugat smo razredčili v razmerju 1 : 50 s pufrom za redčenje konjugata, ki smo ga predhodno ogreli na sobno temperaturo.

3.2.4.6 Kloniranje in določanje nukleotidnih zaporedij za gena ORF1b in ORF7

3.2.4.6.1 Čiščenje produktov RT-PCR

Specifične produkte RT-PCR, ki smo jih izrezali iz agaroznega gela, smo očistili s komercialnim kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA) po navodilih proizvajalca.

Opis postopka

- V 1,5-mililitrsko epruveto smo h koščku izrezanega agaroznega gela dodali 300 µl reagenta za vezavo DNA na kremenčevo membrano (»Membrane binding solution«). Sledilo je kratko mešanje na vibracijskem mešalniku.
- Epruveto smo vstavili v toplotni stresalnik z nastavljivo temperaturo (Thermomixer 5436, Eppendorf, Nemčija), da se je gel popolnoma stopil. Gel smo običajno topili 15 minut pri 65 °C.
- Raztopino gela smo prenesli v kolono (»SV Minicolumn«), ki smo jo predhodno vstavili v zbirno epruveto (»Collection Tube«) in inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi.
- Zbirno epruveto z vstavljenjo kolono smo centrifugirali v centrifugi Centrifuge 5417C (Eppendorf, Nemčija) 1 minuto pri 16.000 × g.
- Po centrifugiranju smo zbirno epruveto spraznili, v kolono pa odpipetirali 700 µl raztopine za spiranje membrane (»Membrane Wash Solution«).
- Ponovno smo centrifugirali 1 minuto pri 16.000 × g in po centrifugiranju ponovili spiranje s 500 µl raztopine za spiranje.

- Po centrifugiranju 5 minut pri $16.000 \times g$ smo kolono v izpraznjeni zbirni epruveti centrifugirali še enkrat 1 minuto pri enakih obratih, da smo odstranili vso raztopino za spiranje.
- Po koncu centrifugiranja smo zbirno epruveto zavrgli, kolono pa vstavili v novo sterilno 1,5-mililitrsko epruveto.
- Ne da bi se z nastavkom mikropipete dotaknili membrane na koloni, smo pazljivo odpipetirali 50 μ l H₂O-DEPC in inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi.
- Na membrano vezano DNA smo sprali z vodo (H₂O-DEPC) in centrifugirali 1 minuto pri $16.000 \times g$.
- Kolono smo po centrifugiranju zavrgli, 1,5-mililitrsko epruveto z raztopino DNA pa shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4.6.2 Kloniranje produktov RT-PCR v plazmid pCR[®]4-TOPO[®]

Specifične produkte reakcij RT-PCR, ki smo jih pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov EAV7.53F/12664N (ORF7), smo klonirali v plazmid pCR[®]4-TOPO[®], ki je sestavni del komercialnega kompleta TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Invitrogen[™], ZDA). Šest μ l ligacijske mešanice, ki smo jo pripravili po navodilih proizvajalca, je vsebovalo 4 μ l očiščenega produkta RT-PCR, 1 μ l raztopine soli (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) in 1 μ l plazmidne DNA (10 ng/ μ l). Ligacija je potekala 5 minut pri sobni temperaturi. Dva μ l ligacijske mešanice smo uporabili za transformacijo kompetentnih celic *E. coli* (One Shot[®] TOP10, Invitrogen[™], ZDA).

3.2.4.6.3 Transformacija bakterij *E.coli* (One Shot[®] TOP10)

- Kompetentne celice *E. coli*, ki smo jih hranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo odtajali na ledu. Odtajanim celicam smo dodali 2 μ l ligacijske mešanice, nežno premešali in inkubirali 20 minut na ledu.
- Sledili sta inkubaciji 30 sekund pri $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ v toplotnem stresalniku in 2 minuti na ledu.
- V epruveto s celicami smo dodali 250 μ l medija S.O.C., ki smo ga predhodno ogreli na sobno temperaturo.

- Epruveto smo dobro zaprli z zamaškom na navoj in jo s pomočjo lepilnega traku namestili v ležeči položaj v inkubator z nastavljivim tresenjem VIBROMIX 403 RVI (Tehtnica, Slovenija) ter inkubirali 1 uro pri 200 obr/min in 37 °C.
- Po končani transformaciji smo na plošče s selektivnim gojiščem LB s kanamicinom (50 ng/ml) nacepili enkrat po 30 µl in enkrat po 50 µl bakterijske kulture.
- Plošče smo inkubirali pri 37 °C čez noč.
- Naslednji dan smo preverili prisotnost belih kolonij in jih nacepili v tekoče gojišče LB s kanamicinom (50 ng/ml). Iz vsake plošče LB smo nacepili 5 kolonij, vsako v svojo 15-mililitrsko epruveto. Inkubirali smo v inkubatorju z nastavljivim tresenjem 24 ur pri 200 obr/min in 37 °C.

3.2.4.6.4 Izolacija plazmida z vstavljenim specifičnim produktom RT-PCR

Iz namnoženih bakterij smo izolirali plazmide z vstavljenim produktom RT-PCR. Za izolacijo smo uporabili komplet Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, ZDA). Plazmidno DNA, vezano na kolono, smo eluirali s 100 µl H₂O-DEPC. Plazmide smo preverili v agaroznem gelu in jih shranili pri –20 °C.

Vstavljeni produkt RT-PCR smo potrdili z restrikcijsko analizo plazmidne DNA. Uporabili smo restrikcijsko endonukleazo *EcoR* I. Pripravili smo restrikcijsko mešanico s skupnim volumnom 20 µl, ki jo je sestavljalo 16,3 µl H₂O-DEPC, 2 µl (10×) restrikcijskega pufra, 0,2 µl govejega serumskega albumina (BSA), 1,0 µl plazmidne DNA in 0,5 µl encima *EcoR* I. Mešanico smo inkubirali v cikličnem termostatu T3 Thermocycler (Biometra, Nemčija) 2 uri pri 37 °C.

Na 1,8-odstotnem agaroznem gelu smo preverili, ali velikost restrikcijskih produktov, ki so nastali po cepitvi z *EcoR* I, ustreza lineariziranemu plazmidu in specifičnemu produktu RT-PCR. Poleg vzorcev smo v žepke nanesti tudi 2 µl standarda DNA za določanje velikosti fragmentov DNA (100 bp DNA Ladder, Invitrogen™, ZDA), s pomočjo katerega smo ocenili velikost produktov RT-PCR, in tudi 2 µl standarda DNA za določanje velikosti fragmentov DNA velikosti od 1000 do 10.000 bp (High DNA Mass Ladder), s pomočjo katerega smo ocenili velikost lineariziranega plazmida.

3.2.4.6.5 Določanje nukleotidnega zaporedja

Sekvenčna reakcija

V sekvenčni reakciji smo uporabljali iz gela očiščene produkte RT-PCR ali očiščene plazmide z vstavljenim produktom RT-PCR. Vsaka reakcijska mešanica je vsebovala 4,0 µl reagenta BigDye™ iz kompleta ABIPRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, ZDA), 1 µl začetnega oligonukleotida (EAV11, EAV12, EAV7.53F ali 12664N s koncentracijo 1,6 pmol/µl ali M13 Reverse oziroma T3 s koncentracijo 3,2 pmol/µl) in 5 µl očiščenega produkta RT-PCR oziroma očiščenega plazmida z vstavljenim produktom RT-PCR.

Pogoji pomnoževanja v cikličnem termostatu so bili naslednji: začetna denaturacija (1 minuto pri 96 °C), sledilo je 25 ciklov pomnoževanja [denaturacija (10 sekund pri 95 °C), prileganje (5 sekund pri 50 °C), podaljševanje (4 minute pri 60 °C)] in končna inkubacija pri 4 °C.

Čiščenje produktov DNA po sekvenčni reakciji

- Vzorcem smo dodali 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3 M natrijevega acetata in 25 µl 100-odstotnega etanola. Mešanico smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku in jo inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi.
- Mešanico smo centrifugirali 30 minut pri $10.000 \times g$ in sobni temperaturi.
- Supernatant smo odstranili in oborino sprali s 35 µl 70-odstotnega etanola, dobro premešali ter ponovno centrifugirali 15 minut pri $10.000 \times g$ in sobni temperaturi.
- Supernatant smo odstranili in pelet sušili v cikličnem termostatu T3 Thermocycler (Biometra, Nemčija) 1 minuto pri 90 °C.

Kapilarna elektroforeza

Pelet smo raztopili v 15 µl reagenta TSR (*angl. Template supression reagent*) (Applied Biosystems, ZDA) in inkubirali 2 minuti pri 94 °C. Po inkubaciji smo dali vzorce za 5 minut na led, nato pa jih prenesli v nosilec aparature ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems, ZDA), kjer je s kapilarno elektroforezo potekala ločitev fragmentov DNA, ki so označeni s fluorescentnimi barvili.

3.2.4.6.6 Analize nukleotidnih zaporedij

Za primerjalno analizo sekvenc smo z brskalnikom Entrez Browser za iskanje po bioloških podatkovnih zbirkah, ki jih ureja Nacionalni center za informacije s področja biotehnologije (NCBI, *angl. National Centre for Biotechnology Information*), dobili podatke o nukleotidnem zaporedju različnih sevov virusa EAV.

Podatke o nukleotidnih zaporedjih ORF1b smo povzeli po Stadejeku in sod. (1999) (Tabela 3-4).

Tabela 3-4: Seznam različnih sevov virusa EAV, ki smo jih uporabili v filogenetskih analizah delnih nukleotidnih zaporedij za ORF1b.

Ime seva	Država izvora	Leto izolacije	Oznaka seva	V GenBank dostopna številka (<i>angl. accession number</i>)
Vienna	Avstrija	1964	Vienna	AF099854
Fallat	Kanada	1986	CDN1	AF099868
EAV 86 R	Francija	1986	F1	AF099867
EAV 86 110	Francija	1986	F3	AF099866
W877	Nemčija	1994	D1	AF099880
A275	Nemčija	1995	D5	AF099863
D526	Nemčija	1996	D6	AF099865
1192VE4/91	Italija	1990/91	I1	AF099855
470VE1/95	Italija	1994/95	I4	AF099858
73VE2/95	Italija	1994/95	I5	AF099860
1330VE/95	Italija	1995	I7	AF099856
1489V/96	Italija	1995/96	I8	AF099857
S-113	Nizozemska	1987	NL1	AF099872
S-544	Nova Zelandija	1989	NZ1	AF099879
NEAV-1	Norveška	1988	N1	AF099869
NEAV-2	Norveška	1989	N2	AF099870
S-436	Poljska	1988	PL3	AF099878
5499/94	Poljska	1994	PL4	AF099859
S-2506	Švedska	1989	S1	AF099877
Bibuna	Švica	1964	Bibuna	AF099864
96/328	Velika Britanija	1996	GB2	AF099861
96/7982	Velika Britanija	1996	GB3	AF099862
S1512	ZDA	1995	USA18	AF099873
S1655	ZDA	1996	USA20	AF099875
S1711	ZDA	1996	USA21	AF099876
CW96	ZDA	1996	CW96	AY349167
CW01	ZDA	2001	CW01	AY349168
Bucyrus	ZDA	1953	Bucyrus	NC_002532

Podatke o nukleotidnih zaporedjih ORF7 smo pridobili iz podatkovne zbirke GenBank (Tabela 3-5).

Tabela 3-5: Seznam različnih sevov virusa EAV, ki smo jih uporabili v filogenetskih analizah delnih nukleotidnih zaporedij za ORF7.

Ime seva	Država izvora	Leto izolacije	Oznaka seva	V GenBank dostopna številka (<i>angl. accession number</i>)
Vienna	Avstrija	1964	Vienna	X78497
CAN86	Kanada	1986	CAN86	U81021
NORW1	Norveška	-	NORW1	X78500
NORW2	Norveška	-	NORW2	X78501
WROCLAW	Poljska	1978	WROCLAW	X78498
POL185	Poljska	1983	POL185	X78499
Bibuna	Švica	1964	Bibuna	X78496
KS67	ZDA	1953	KS67	X78493
E89	ZDA	1989	E89	AF107278
CA95I2	ZDA	1995	CA95I2	U81025
CA95G	ZDA	1995	CA95G	U81023
CA95GS2	ZDA	1995	CA95GS2	U81027
PA76	ZDA	1976	PA76	U81018
PF67	ZDA	1953	PF67	78492X
KY63	ZDA	1963	KY63	U81014
KY77	ZDA	1977	KY77	U81015
KY84	ZDA	1984	KY84	AF107279
KY93	ZDA	1993	KY93	U81017
A1	Evropa	1995	A1	AF118760
A4	Evropa	1997	A4	AF118772
R1	ZDA	1996	R1	AF118773
R2	ZDA	1998	R2	AF118774
P1	ZDA	1996	P1	AF118775
P2	ZDA	1997	P2	AF118776
G1	ZDA	1995	G1	AF118777
G2	ZDA	1997	G2	AF118778
G3	ZDA	1997	G3	AF118779
G4	ZDA	1998	G4	AF118780
BT-PA96	ZDA	1996	BT-PA96	AF118781
CW96	ZDA	1996	CW96	AY349167
CW01	ZDA	2001	CW01	AY349168
ARVAC	ZDA	-	ARVAC	U81019
ATCC	ZDA	-	ATCC	U81020
VBS53	ZDA	1953	VBS53	U81013
Bucyrus	ZDA	1953	Bucyrus	NC_002532

(-) = Ni podatka.

V primerjalno analizo sekvenc smo vključili tudi slovenske izolate virusa EAV, ki smo jim določili nukleotidna zaporedja in jih s pomočjo programa Sequin 7.00 (National Center for Biotechnology Information) predložili genski banki GenBank v odobritev. Vsakemu nukleotidnemu zaporedju slovenskih sevov virusa EAV so podelili kodo (*angl. accession*

number), s pomočjo katere lahko pridemo do javno dostopnih podatkov o nukleotidnih zaporedjih slovenskih sevov virusa EAV.

Sekvence slovenskih izolatov virusa EAV smo najprej obdelovali s programi iz programskega paketa Lasergene (DNASTAR, ZDA). Nukleotidna zaporedja smo uredili s programoma Seqman in Editseq. S programom za progresivno poravnavo več zaporedij Clustal X 1.83 (Thompson in sod., 1997) smo jih poravnali z znanimi nukleotidnimi zaporedji iz baze podatkov GenBank.

V analizo gena za polimerazo (ORF1b) smo vključili 15 sekvenc slovenskih izolatov virusa EAV in 28 sekvenc izbranih iz genske banke (Tabela 3-4), medtem ko smo v analizo gena za nukleokapsido (ORF7) vključili 22 sekvenc slovenskih izolatov virusa EAV in 27 sekvenc iz genske banke (Tabela 3-5).

S programom MegAlign (DNASTAR, ZDA) smo določili razlike (*angl. divergence*) in odstotek identičnosti (*angl. percent identity*) med posameznimi pari nukleotidnih zaporedij.

Za filogenetsko analizo smo uporabili programe iz paketa Phylip, verzija 3.66 (Felsenstein, 2006).

Za izračun sorodnosti preiskovanih sekvenc smo uporabili Kimurov dvoparametrični evlucijski model (Kimura, 1980). S programom DAMBE (Xia in Xie, 2001) smo za izbrani model izračunali razliko v deležu tranzicij in transverzij za posamezno genetsko razdaljo, ki je bila izračunana za vsak par nukleotidnih zaporedij. Program vsebuje zelo enostavno metodo za ugotavljanje nasičenja s substitucijami med poravnanimi nukleotidnimi zaporedji. Metoda temelji na empiričnih dognanjih, ki kažejo na to, da so tranzicije bolj pogoste od transverzij. Število tranzicij in transverzij narašča linearno z večanjem genetske razdalje, pri čemer je delež tranzicij vedno večji od deleža transverzij. S programom lahko določimo, ali so vse tri pozicije v kodonu pri izbranem evlucijskem modelu filogenetsko informativne. Znano je, da pri virusih z RNA mutacije niso enakomerno porazdeljene po vseh pozicijah v kodonu in se tretja pozicija v kodonu spreminja najhitreje. S substitucijami nasičene tretje pozicije niso filogenetsko informativne. Seveda pa moramo taka mesta izključiti iz nadaljnjih filogenetskih analiz.

Program izriše dve krivulji. V grafu so na osi x podane genetske razdalje med posameznimi pari nukleotidnih zaporedij, na osi y pa so podane relativne vrednosti razlik med tranzicijami in transverzijami. Krivulja, ki prikazuje delež tranzicij, mora praviloma potekati nad krivuljo, ki prikazuje delež transverzij. Če krivulji dosežeta plato, pomeni, da izbrani model na izbranih

pozicijah v kodonu ni realen, saj ne upošteva, da je porazdelitev substitucijske hitrosti v kodonu nehomogena. Rešitev je v tem, da v evolucijski model vključimo parameter porazdelitve substitucijske hitrosti.

S programom DNADIST smo za posamezne pare nukleotidnih zaporedij izračunali matriko razdalj. Iz matrike izračunanih razdalj smo z distančno metodo izdelali filogenetsko drevo. Kot distančni metodi smo v programih NEIGHBOR in FITCH uporabili metodo povezovanja sosedov (NJ, *angl. Neighbor-Joining*) (Saitou in Nei, 1987) in metodo Fitch-Margoliash (FM) (Fitch in Margoliash, 1967).

Z metodo samovzorčenja (*angl. bootstrapping*) s programom SEQBOOT, ki jo je v filogenetske raziskave uvedel Felsenstein (1985), smo ocenili zanesljivost filogenetskih dreves in vrednosti analize bootstrap vpisali na vozlišča dreves, kjer prikazujejo odstotek ponovljivosti posameznega vozlišča pri 1000 ponovitvah.

Za grafično predstavitev topologije drevesa smo uporabili program TREEVIEW (Page, 1996).

3.2.4.7 RT-PCR v realnem času za pomnoževanje odseka v nukleokapsidnem genu (ORF7)

Z metodo RT-PCR v realnem času smo tako virus EAV v vzorcih semena kot tudi standard (referenčni sev Bucyrus) pomnoževali s smiselnim začetnim oligonukleotidom EAV7.53F (Balasuriya in sod., 2002) in protismiselnim začetnim oligonukleotidom EAV-R ter sondo EAVMGBpr (Tabela 3-2, Slika 3-1).

Za dokaz virusne RNA smo uporabili detekcijski sistem, ki temelji na sondi TaqMan® MGB. Sonda EAVMGBpr je na 5' koncu označena s fluorescentnim barvilom FAM (6-karboksi-fluorescein), na 3' koncu pa ima dušilno barvilo (NFQ, *angl. non-fluorescent quencher*) in kovalentno vezano proteinsko molekulo MGB, ki omogoča stabilnejšo vezavo sonde na tarčno zaporedje.

3.2.4.7.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sonde MGB

Mesta prileganja začetnih oligonukleotidov in sonde MGB smo izbrali v genu za nukleokapsido (ORF7), ki ima pri vseh znanih izolatih virusa EAV najbolj ohranjeno zaporedje nukleotidov.

Pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov in sonde MGB za pomnoževanje odseka v ORF7 smo uporabili nukleotidno zaporedje referenčnega seva Bucyrus (NC_002532), ki smo ga pridobili iz podatkovne zbirke GenBank.

Začetne oligonukleotide in sondo MGB smo načrtovali s programom PrimerExpress™ v2.0 (Applied Biosystems, ZDA). Pri tem smo upoštevali pogoje in parametre načrtovanja, ki so določeni v zgoraj omenjenem programu. Pogoji in parametri so se nanašali na delež GC (30–80 %), temperaturo tališča T_m (58–60 °C), dolžino produkta pomnoževanja (50–100 bp) in dolžino začetnih oligonukleotidov (optimalna dolžina 20 nukleotidov). Dodatno smo preverili, katera od predlaganih kombinacij začetnih oligonukleotidov ne tvori sekundarnih struktur in dimerov.

Specifičnost izbranega para začetnih oligonukleotidov in komplementarnost med nukleotidnim zaporedjem sonde MGB in nukleotidnimi zaporedji različnih sevov virusa EAV smo analizirali *in silico*. Iz podatkovne zbirke nukleotidnih zaporedij GenBank smo dobili podatke o nukleotidnih zaporedjih različnih sevov virusa EAV. S programom Clustal X 1.83 smo delna nukleotidna zaporedja gena za nukleokapsido poravnali in preverili, ali je na mestu vezave izbrane sonde EAVMGBpr ohranjenost genoma med različnimi sevi virusa EAV popolna.

3.2.4.7.2 RT-PCR v realnem času

Za pomnoževanje odseka v nukleokapsidnem genu (ORF7) smo uporabili komplet kemikalij Superscript™ III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX (Invitrogen™, ZDA), ki nam omogoča pomnoževanje v eni stopnji.

Reakcijska mešanica je vsebovala (1×) reakcijsko mešanico s pasivnim referenčnim barvilom ROX (reaction mix with ROX), 0,5 µl mešanice encimov reverzne transkriptaze Superscript™ III RT in Platinum® Taq polimerze DNA, 200 nM sondo EAVMGBpr, 800 nM posameznega začetnega oligonukleotida, 1,5 µl H₂O-DEPC.

Po 21 µl pripravljene reakcijske mešanice smo nanesti v jamice na optični ploščici (96-Well Optical Reaction Plate, Applied Biosystems, ZDA) in v vsako reakcijo pomnoževanja dodali po 4 µl izolirane RNA. Vsak vzorec smo na ploščico nanesti v dveh ponovitvah. V zadnjo reakcijsko mešanico smo namesto RNA dodali 4 µl H₂O-DEPC, ki nam je služila kot kontrola kontaminacije (NTC, *angl. no template control*). Ploščico smo prekrili z optično folijo

(MicroAmpTM Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, ZDA) in jo centrifugirali v centrifugi Multifuge 1 S-R (Heraeus, Nemčija) 6 minut pri 4300 obr/min in 4 °C. Po centrifugiranju smo ploščico vstavili v aparaturu ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA), v kateri je reakcija pomnoževanja v realnem času potekala pod naslednjimi pogoji: reverzna transkripcija 15 minut pri 50 °C, sledilo je 45 ciklov pomnoževanja v dveh stopnjah (denaturacija 15 sekund pri 95 °C, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige DNA 30 sekund pri 60 °C).

3.2.4.7.3 Obdelava rezultatov

Rezultate smo analizirali s programom SDS, verzija 1.1 (Applied Biosystems, ZDA). Fluorescenca reporterske molekule je po reakciji normalizirana glede na fluorescenco ozadja aparature, glede na interno pasivno referenčno barvilo ROX, ki je v reakcijski mešanici, in glede na bazno linijo. Normaliziran fluorescenčni signal je podan kot vrednost ΔR_n .

Program izriše graf pomnoževanja produkta PCR. Na osi x je podano število ciklov (1-45), na osi y pa vrednost ΔR_n . Linija praga reakcije (*angl. threshold*), ki jo določimo v eksponentnem delu logaritemske krivulje, določa število ciklov (vrednost C_t), pri katerem fluorescenčni signal, ki ga povzroči vzorec, preseže linijo praga reakcije. Pri večjem številu molekul DNA v vzorcu fluorescenčni signal prej preseže prag reakcije, kar se odraža z manjšo vrednostjo C_t . Vrednosti C_t so torej obratno sorazmerne s količino tarčnih molekul (genom virusa EAV) in na osnovi le-teh lahko vzorce med seboj primerjamo.

Pri določevanju vrednosti C_t smo največkrat upoštevali avtomatsko nastavitve vrednosti bazne linije (med šestim in petnajstim ciklom) in praga reakcije (*angl. cycle threshold 0,2000*). V primerih, ko je bila količina virusne RNA v vzorcu semena zelo majhna in je bila krivulja posledično bolj položna, smo linijo praga reakcije nastavili ročno v začetni fazi eksponentnega pomnoževanja.

Vrednosti C_t smo prenesli v program Microsoft Excel. Iz dveh ponovitev istega vzorca smo izračunali povprečno vrednost C_t . Za vsak vzorec smo iz vrednosti C_t izračunali še standardni odklon (SD) in koeficient variacije (KV).

Standardni odklon (SD) smo določili po naslednji formuli:

$$SD = \sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} / \sqrt{N-1}$$

N = število meritev

x_i = posamezna meritev

$\bar{x}$ = povprečna vrednost

Koeficient variacije (KV) smo izračunali po naslednji formuli:

$$KV = (100 \times SD) / \bar{x}$$

Rezultate smo interpretirali na naslednji način:

- Vzorce, katerih vrednost Ct je bila manjša ali enaka 40, smo določili za pozitivne.
- Vzorce, katerih vrednost Ct je bila večja ali enaka 40, pa smo določili za negativne.

3.2.4.7.4 Določanje meje detekcije

Referenčnemu sevu Bucyrus, ki smo ga predhodno namnožili v celični kulturi RK-13, smo s štejem plakov določili koncentracijo. Začetna koncentracija je vsebovala $6,8 \times 10^6$ plaketovnih enot v mililitru supernatanta celične kulture RK-13 ($6,8 \times 10^6$ PFU/ml). Iz 250 μ l supernatanta ($1,7 \times 10^6$ PFU) smo z reagentom TRIzol[®] izolirali celokupno RNA, ki smo jo po spiranju s 75-odstotnim etanolom raztopili v 100 μ l H₂O-DEPC. Za določitev meje detekcije smo celokupno RNA redčili v H₂O-DEPC. Pripravili smo serijo desetkratnih razredčin (od 10^{-1} do 10^{-7}). Vsako razredčino smo v posameznem poskusu testirali v dveh ponovitvah. Po končani reakciji RT-PCR v realnem času smo dobili podatke za vrednosti Ct posameznih razredčin. Zatem smo podatke prenesli iz programa SDS verzija 1.1 (Applied Biosystems, ZDA) v program Microsoft Excel, s pomočjo katerega smo narisali standardno linearno regresijsko krivuljo. Na os x smo nanesti logaritemske vrednosti razredčin ($\log_{10}$ je predstavljal nerazredčeno celokupno RNA, sledila je serija razredčin od $\log_{10}^{-1}$ do $\log_{10}^{-7}$), na os y pa vrednosti Ct posamezne razredčine. Iz standardne krivulje smo dobili podatke o vrednosti naklona krivulje in o koeficientu linearne regresije (R^2). S pomočjo vrednosti

naklona smo lahko izračunali učinkovitost pomnoževanja vzorcev z metodo RT-PCR v realnem času, medtem ko nam je vrednost R^2 služila kot merilo ujemanja podatkov v linearni regresijski krivulji.

S pomočjo standardne linearne regresijske krivulje smo določili spodnjo mejo detekcije. Največja razredčina celokupne RNA je z največjo vrednostjo Ct predstavljala teoretično spodnjo mejo detekcije.

3.2.4.7.5 Določanje učinkovitosti pomnoževanja

Učinkovitost pomnoževanja smo izračunali s pomočjo vrednosti naklona linearne regresijske krivulje po formuli:

$$E = 10^{(-1/\text{naklon})} - 1$$

E pomeni učinkovitost pomnoževanja.

Pri vrednosti naklona linearne regresijske krivulje $-3,32$ ima E vrednost 1, kar pomeni 100-odstotno učinkovitost pri pomnoževanju tarčne molekule (Ginzinger, 2002).

3.2.4.8 Primerjava molekularnih metod za detekcijo odseka v nukleokapsidnem genu (ORF7)

Med seboj smo primerjali občutljivost štirih molekularnih metod, ki smo jih zasnovali za dokazovanje nukleinske kisline virusa EAV. V ta namen smo z reagentom TRIzol[®] izolirali celokupno RNA iz referenčnega seva Bucyrus in iz nje pripravili serijo desetkratnih razredčin (od 10^{-1} do 10^{-7}) po postopku, ki je opisan že v točki 3.2.4.7.4. Štiri μ l vsake razredčine RNA smo analizirali z molekularnimi metodami [Klasična metoda RT-PCR (3.2.4.2), »semi-nested« PCR (3.2.4.3), RT-PCR-ELISA (3.2.4.5) in RT-PCR v realnem času (3.2.4.7)].

Občutljivost metod RT-PCR in »semi-nested« PCR smo dokazovali z elektroforezo v 1,8-odstotnem agaroznem gelu in z barvanjem v raztopini etidijevega bromida (0,5 μ g/ml).

S presvetljevanjem agaroznega gela z UV-svetlobo smo ugotavljali, pri kateri razredčini celokupne RNA, še zaznamo produkte pomnoževanja. Na ta način smo omenjenima metodama določili mejo detekcije.

Za vrednotenje občutljivosti metode RT-PCR-ELISA smo pri izvedbi metode ELISA vzporedno analizirali 5 µl produkta RT-PCR direktno iz reakcijske mešanice in enako količino produkta RT-PCR, ki smo ga predhodno očistili s komercialnim kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA), kot je opisano v točki 3.2.4.6.1.

Narisali smo graf, v katerem smo na os x nanesti logaritemske vrednosti razredčin celokupne RNA, na os y pa ustrezne vrednosti OD.

Rezultate omenjenih metod smo primerjali z rezultati, ki smo jih dobili z metodo RT-PCR v realnem času. Pri analizi rezultatov smo postopali tako, kot je razloženo v točki 3.2.4.7.4.

3.2.5 Molekularne metode za dokazovanje virusa EAV v brisih sečnice in vzorcih semena

Žrebce iz reje A, v semenu katerih smo z molekularnimi virološkimi metodami dokazali virus EAV, so pred jemanjem semena odvzeli bris sečnice. Pri različnih metodah izolacije celokupne RNA in metodah za dokazovanje virusne RNA smo poleg referenčnega seva Bucyrus uporabili tudi omenjene vzorce brisov.

Referenčni sev Bucyrus nam je služil kot pozitivna kontrola, H₂O-DEPC pa smo imeli za negativno kontrolo.

3.2.5.1 Izolacija celokupne RNA

Pri raziskovalnem delu smo uporabljali različne metode za izolacijo celokupne RNA. V večini primerov smo celokupno RNA izolirali z reagentom TRIzol® (Invitrogen™, ZDA) in komercialnima kompletoma QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Nemčija) in MagMAX™ Viral RNA Isolation Kit (Ambion®, ZDA).

Uspešnost izolacije celokupne RNA smo ugotavljali s pomnoževanjem tarčne sekvence v genu za nukleokapsido (ORF7). Na ta način smo preverili občutljivost in zanesljivost metod za izolacijo celokupne RNA.

V nekaterih primerih smo za izolacijo celokupne RNA uporabili komercialni komplet NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Nemčija). Ker se je po obdelavi rezultatov preliminarne analize izkazalo, da je omenjena metoda manj občutljiva kot ostale tri, smo metodo izključili iz nadaljnjih primerjalnih študij.

3.2.5.1.1 Izolacija z reagentom TRIzol®

Celokupno RNA smo iz brisov sečnice izolirali na enak način kot celokupno RNA iz semena (3.2.4.1). Izolirano celokupno RNA smo raztopili v 100 µl H₂O-DEPC in jo do uporabe zamrznili pri -80 °C.

3.2.5.1.2 Izolacija s kompletom NucleoSpin® RNA II

Pufer za lizo celic vsebuje gvanidinijev tiocianat, ki denaturira proteine in hkrati inaktivira ribonukleazno aktivnost RNaz. Celokupna RNA se skupaj z DNA veže na silikatno membrano v koloni. Z raztopino, ki vsebuje DNazo I, razgradimo DNA, RNA pa speremo z H₂O-DEPC.

Izolacijo celokupne RNA smo izvajali po navodilih proizvajalca Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Nemčija).

Opis postopka

- V 1,5-mililitrsko epruveto (Eppendorf, Nemčija) smo prenesli 100 µl vzorca brisa sečnice, dodali 350 µl pufru RA1 in dobro premešali na vibracijskem mešalniku MS1 Minishaker (IKA Labortechnik, Nemčija).
- Dodali smo še 350 µl 70-odstotnega etanola in ponovno dobro premešali.
- Lizat smo prenesli v svetlo modro kolono »NucleoSpin® RNA II column«. Kolono smo vstavili v 1,5-mililitrsko epruveto in centrifugirali 30 sekund pri 8000 × g v centrifugi Biofuge 17RS (Heraeus, Nemčija).
- Po centrifugiranju smo filtrat zavrgli.
- Na membrano smo dodali 350 µl pufru MDB »Membrane Desalting Buffer«, s katerim smo iz silikatne membrane sprali odvečne soli, metabolite in druge makromolekule. Centrifugirali smo 1 minuto pri 11.000 × g.
- Po centrifugiranju smo filtrat zavrgli.
- Na membrano smo dodali 95 µl reakcijske mešanice z DNazo I (10 µl DNaze I + 90 µl pufru) in inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi.

- Sledilo je spiranje silikatne membrane. V kolono smo dodali 200 μ l pufra RA2 in centrifugirali 30 sekund pri $8000 \times g$.
- Po centrifugiranju smo zbirno epruveto zavrgli in kolono prenesli v novo 1,5-mililitrsko epruveto.
- V kolono smo dodali 600 μ l pufra RA3 in ponovno centrifugirali 30 sekund pri $8000 \times g$. Po centrifugiranju smo filtrat zavrgli in kolono ponovno vstavili v epruveto.
- V kolono smo dodali 250 μ l pufra RA3 in centrifugirali 2 minuti pri $11.000 \times g$.
- Po centrifugiranju smo kolono prenesli v čisto 1,5-mililitrsko epruveto in na membrano dodali 50 μ l H₂O-DEPC.
- Centrifugirali smo 1 minuto pri $11.000 \times g$ in vzorec shranili pri -80°C .

3.2.5.1.3 Izolacija s kompletom QIAamp® Viral RNA Mini Kit

Metoda je osnovana na selektivni vezavi RNA na membrano iz silikatnega gela »QIAamp Mini membrane«. Komplet vključuje pufer AVL, ki vsebuje nosilno RNA »Carrier RNA«. V primeru analize vzorcev, pri katerih je RNA prisotna v zelo majhnih količinah, lahko s pomočjo nosilne RNA pridobimo večji delež virusne RNA. Nosilna RNA izboljša vezavo virusne RNA na membrano. Poleg tega tudi ščiti virusno RNA pred razgradnjo z RNazami.

Izolacijo celokupne RNA smo izvajali po navodilih proizvajalca Qiagen (Nemčija).

Predpriprava reagentov

- 310 μ g liofilizirane nosilne RNA smo raztopili v 310 μ l pufra AVE in dobili raztopino nosilne RNA s končno koncentracijo 1 μ g/ μ l. Nosilno RNA smo razdelili v alikvote po 50 μ l in jo do uporabe shranili pri -20°C .
- Pred uporabo smo nosilno RNA odmrznili. 44,8 μ l nosilne RNA smo raztopili v 4480 μ l pufra AVL, kar je zadostovalo za izolacijo celokupne RNA iz osmih vzorcev.
- Pufer za spiranje AW1: koncentratu AW1 smo dodali 25 ml absolutnega etanola.
- Pufer za spiranje AW2: koncentratu AW2 smo dodali 30 ml absolutnega etanola.

Opis postopka

- V 1,5-mililitrsko epruveto (Eppendorf, Nemčija) smo prenesli 560 μ l pufru AVL, ki smo mu predhodno dodali nosilno RNA.
- Dodali smo 140 μ l vzorca in mešali 15 sekund na vibracijskem mešalniku.
- Liza virusnih delcev je potekala 10 minut pri sobni temperaturi.
- Sledilo je centrifugiranje (*angl. short spin*) 15 sekund, s čimer smo odstranili kapljice iz notranje strani pokrovčka.
- Po centrifugiranju smo vzorcu dodali 560 μ l absolutnega etanola in mešali 15 sekund na vibracijskem mešalniku in ponovno centrifugirali za nekaj sekund.

Da bi dobili dvojno količino celokupne RNA, smo vsak vzorec brisa sečnice obdelali ločeno v dveh ponovitvah, tako da je skupni volumen lizata, ki smo ga dobili pri obdelavi istega vzorca ($2 \times 140 \mu$ l), znašal 2520 μ l.

- 630 μ l pripravljene raztopine lizata smo prenesli v kolono »QIAamp Mini spin column«, ki smo jo vstavili v 2-mililitrsko zbirno epruveto.
- Sledilo je enominutno centrifugiranje pri $6000 \times g$.
- Po centrifugiranju smo zbirno epruveto s filtratom zavrgli, kolono pa prestavili v novo 2-mililitrsko zbirno epruveto.

Postopek smo ponovili še trikrat, dokler s centrifugiranjem nismo obdelali celotne količine lizata.

- Na membrano kolone smo dodali 500 μ l pufru za spiranje AW1 in centrifugirali 1 minuto pri $6000 \times g$.
- Po centrifugiranju smo zbirno epruveto s filtratom zavrgli, kolono pa prestavili v novo 2-mililitrsko zbirno epruveto.
- Na membrano kolone smo dodali 500 μ l pufru za spiranje AW2 in centrifugirali 3 minute pri $20.000 \times g$.
- Po centrifugiranju smo zbirno epruveto s filtratom zavrgli, kolono pa prestavili v novo 2-mililitrsko zbirno epruveto in ponovno centrifugirali 1 minuto pri $20.000 \times g$.
- Po centrifugiranju smo kolono prenesli v sterilno 1,5-mililitrsko epruveto in na membrano kolone dodali 40 μ l pufru AVE, ki smo ga predhodno ogreli na sobno temperaturo.

- Inkubirali smo 1 minuto pri sobni temperaturi. Vzorec smo nato centrifugirali 1 minuto pri $6000 \times g$.
- Na membrano kolone smo ponovno nanesti 40 μ l pufra AVE in ponovno inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi. Nato smo 1 minuto centrifugirali.
- Po centrifugiranju smo kolono zavrgli, 80 μ l filtrata pa shranili pri -80°C .

3.2.5.1.4 Izolacija s kompletom MagMAXTM Viral RNA Isolation Kit

V zadnjem času se poleg že omenjenih načinov izolacije celokupne RNA uveljavljajo tudi metode, ki poleg gvanidinijevega tiocianata in nosilne RNA v postopek izolacije vključujejo tudi paramagnetne delce (*angl. magnetic beads*).

Za hitrejšo izolacijo virusne RNA iz kužnin so pri ameriškem podjetju Ambion[®] razvili metodo, ki je primerna za izolacijo celokupne RNA iz kompleksnih bioloških materialov, kot so serum, plazma, urin, mekonij, mleko, brisi ali nosni sekret. Metoda se je izkazala za učinkovito in uspešno zlasti pri vzorcih, ki skoraj ne vsebujejo celic ali pa so popolnoma brez njih in vsebujejo zelo majhne količine virusne RNA.

Metoda je osnovana na paramagnetnih delcih. Jedro paramagnetnih delcev je sestavljeno iz feritov, med katerimi sta najbolj znana dva železova oksida – magnetit Fe_3O_4 in maghemit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Z obdelavo njihove površine vplivajo na spremembo naboja, funkcionalnost in reaktivnost površine. Paramagnetnim delcem ustrezno prilagajajo njihove lastnosti, kar jim omogoča široko uporabo za diagnostične namene v biomedicini.

Nukleinske kisline (RNA in/ali DNA) se skupaj z nosilno RNA vežejo na površino paramagnetnega delca, ki se zaradi svoje supermagnetne narave veže na magnet, ki ga privlači. V tem postopku izoliramo poleg virusne RNA tudi nukleinske kisline (RNA/DNA), ki so prisotne v celicah. Izmed vseh molekul RNA izoliramo največ nosilne RNA (2 μ g), s katero ostane povezana tudi RNA iz vzorca.

Predpriprava reagentov

- Dvema μ l nosilne RNA smo dodali 400 μ l koncentrirane raztopine za lizo in povezovanje »Lysis/Binding Solution Concentrate«. Tako pripravljeno raztopino z nosilno RNA smo premešali na vibracijskem mešalniku. Nato smo dodali 400 μ l izopropanola in ponovno premešali na vibracijskem mešalniku.

- Originalni raztopini za spiranje 1 »Wash Solution 1« smo dodali 12 ml izopropanola.
- Originalni raztopini za spiranje 2 »Wash Solution 2« smo dodali 44 ml absolutnega etanola.
- S to metodo smo naenkrat lahko analizirali le šest vzorcev. Ob tem smo vsakič znova pripravili ustrezno količino mešanice s paramagnetnimi delci »Bead Mix«. 66 µl paramagnetnih delcev smo dodali enako količino raztopine za pospeševanje lize in vezave »Lysis/Binding Enhancer«. Do uporabe smo raztopino s paramagnetnimi delci hranili na ledu.

Opis postopka

- V 1,5-mililitrske epruvete smo prenesli 802 µl pufra »Lysis/Binding Solution«, ki smo mu predhodno dodali nosilno RNA in izopropanol. Tako pripravljeni mešanici smo dodali 400 µl vzorca in mešali 30 sekund na vibracijskem mešalniku.
- Sledilo je kratko centrifugiranje.
- Mešanico s paramagnetnimi delci smo premešali na vibracijskem mešalniku, tako da so bili paramagnetni delci v raztopini »Lysis/Binding Enhancer« homogeno razporejeni.
- V vsako epruveto smo dodali po 20 µl mešanice s paramagnetnimi delci in mešali 4 minute pri 550 obr/min v stresalniku Thermomixer Compact (Eppendorf, Nemčija), da so se virusni delci popolnoma razgradili in se je virusna RNA vezala na površino paramagnetnih delcev.
- Sledilo je kratko centrifugiranje.
- Epruvete smo vstavili v magnetno stojalo za 5 minut. Magnet v stojalu privlači paramagnetne delce, ki se strnejo v pelet.
- Iz epruvet v magnetnem stojalu smo s pipeto odstranili supernatant in ga zavrgli.
- V vsako epruveto smo dodali po 300 µl raztopine za spiranje 1. Mešanico s paramagnetnimi delci smo premešali na vibracijskem mešalniku.
- Sledilo je kratko centrifugiranje.
- Epruvete smo ponovno vstavili v magnetno stojalo za 5 minut oziroma za toliko časa, da je mešanica postala bistra.
- Iz epruvet v magnetnem stojalu smo s pipeto odstranili supernatant in ga zavrgli. Epruvete smo odstranili iz magnetnega stojala in ponovili vse korake, ki sledijo spiranju s 300 µl raztopine za spiranje 1.

- Nato smo dodali 450 µl raztopine za spiranje 2. Mešanico s paramagnetnimi delci smo premešali na vibracijskem mešalniku.
- Sledilo je kratko centrifugiranje.
- Epruvete smo vstavili v magnetno stojalo za 5 minut.
- Iz epruvet v magnetnem stojalu smo s pipeto odstranili supernatant in ga zavrgli. Epruvete smo odstranili z magnetnega stojala in ponovili vse korake, ki sledijo spiranju s 450 µl raztopine za spiranje 2.
- Epruvete smo sušili približno 2 minuti na zraku v komori za sterilno delo pri maksimalnem pretoku zraka, da je izhlapel preostanek etanola iz raztopine za spiranje 2.
- Dodali smo 50 µl raztopine za spiranje RNA »Elution Buffer«, ki smo jo predhodno ogreli na sobno temperaturo.
- Izolirano celokupno RNA smo premešali na vibracijskem mešalniku.
- Sledilo je kratko centrifugiranje.
- Epruvete smo vstavili v magnetno stojalo za 5 minut. Supernatant, v katerem se je nahajala izolirana RNA, smo prenesli v novo 1,5-mililitrsko epruveto. Izolirano RNA smo do uporabe shranili pri -80°C .

Z omenjenim kompletom smo na enak način, kot smo to naredili pri izolaciji RNA iz brisov sečnice, izolirali virusno RNA iz vzorcev semen, ki so jih perzistentnim izločevalcem in nekaterim serološko pozitivnim žrebcom odvzeli po predhodnem odvzemu brisa.

3.2.5.2 Dokazovanje odseka v genu za nukleokapsido (ORF7)

3.2.5.2.1 Klasična metoda RT-PCR

Reverzno transkripcijo RNA s sledečim pomnoževanjem cDNA smo izvajali v eni stopnji. Uporabljali smo reagente iz komercialnega kompleta QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Nemčija), ki v eni reakcijski mešanici z dvema reverznima transkriptazama (»Omniscrypt™ Reverse Transcriptase« in »Sensiscrypt™ Reverse Transcriptase«) ter s *Taq* polimerazo DNA (»Hot StarTaq® DNA Polymerase«) združuje proces reverzne transkripcije in proces pomnoževanja. Reverzni transkriptazi Omniscrypt in Sensiscrypt sta rekombinantna encima, ki so ju pridobili z ekspresijo v *E. coli*.

Enojnoverižne nukleinske kisline lahko tvorijo sekundarne strukture, ki segajo od preprostih zgradb steblo-zanka do zapletenih oblik. Stabilne sekundarne strukture, ki se pogosto nahajajo v molekulah RNA, lahko ovirajo prepisovanje RNA pri nizkih temperaturah. Pufer »QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer«, v katerem se nahaja mešanica encimov, omogoča, da reverzni transkriptazi delujeta pri višji temperaturi (50 °C), ki destabilizira sekundarne strukture in izboljša učinkovitost prepisovanja RNA v cDNA.

Reverzna transkriptaza Omniscript je namenjena prepisovanju večjih količin RNA (> 50 ng), medtem ko reverzna transkriptaza Sensiscript omogoča prepisovanje izredno majhnih količin izhodne RNA, ki se v preiskovanih vzorcih nahaja v sledovih (< 50 ng).

Reakcijska mešanica s končnim volumnom 50 µl je vsebovala (1×) pufer QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer z 2,5 mM MgCl₂, 0,4 mM vsakega nukleotida iz mešanice nukleotidov (10 mM dNTP Mix), 0,6 µM posameznega začetnega oligonukleotida (EAV7.53F/12664N), 2 µl mešanice encimov QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix, 29 µl H₂O-DEPC in 4 µl celokupne RNA, ki smo jo izolirali iz brisov sečnice na štiri različne načine po postopkih, kot so bili opisani že v točkah 3.2.5.1.1, 3.2.5.1.2, 3.2.5.1.3 in 3.2.5.1.4 in iz vzorcev semena.

Pomnoževanje je potekalo v cikličnem termostatu T3 Thermocycler (Biometra, Nemčija) pod naslednjimi pogoji: reverzna transkripcija (30 minut pri 50 °C), začetna denaturacija (15 minut pri 95 °C), sledi 40 ciklov pomnoževanja v treh stopnjah [denaturacija (1 minuto pri 94 °C), prileganje začetnih oligonukleotidov (1 minuto pri 56 °C) in podaljševanje verige DNA (1 min pri 72 °C)] ter končno podaljševanje (10 minut pri 72 °C) in ohlajevanje pri 4 °C.

Uspešnost pomnoževanja smo nato dokazovali z elektroforezo v agaroznem gelu.

Identiteto nastalega produkta RT-PCR smo potrdili z določevanjem nukleotidnega zaporedja s sekvenčno reakcijo.

3.2.5.2.2 RT-PCR v realnem času

V preliminarinih poskusih smo preizkusili dva različna komercialna kompleta za pomnoževanje odseka v ORF7. Najprej smo uporabljali reagente iz komercialnega kompleta Superscript™ III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX (Invitrogen™, ZDA).

Nadaljnja testiranja (Gogala, 2007) so pokazala prednost kompleta QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit (Qiagen, Nemčija), za katerega proizvajalec zagotavlja učinkovitejše prepisovanje RNA v cDNA. V nadaljevanju smo v brisih sečnice in vzorcih semena dokazovali nukleinsko kislino virusa EAV z omenjenim kompletom.

Reakcijska mešanica s končnim volumnom 25 µl je vsebovala (1×) pufer RT-PCR Master Mix (*Taq* polimeraza DNA »Hot StarTaq® DNA Polymerase«, 2 mM MgCl₂, mešanica deoksinukleozidtrifosfatov vključno z dUTP »dNTP Mix«, pufer »QuantiTect Probe RT-PCR Buffer« in pasivno referenčno barvilo ROX), 0,8 µM posameznega začetnega oligonukleotida (EAV7.53F/EAV-R), 0,2 µM sonde EAVMGBpr (Tabela 3-2, Slika 3-1), 0,25 µl mešanice encimov (Omniscript in Sensiscript), 1,75 µl H₂O-DEPC in 4 µl celokupne RNA, ki smo jo izolirali iz vzorcev brisov sečnice in/ali iz vzorcev semena.

Reakcija RT-PCR v realnem času je potekala v aparaturi ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA): reverzna transkripcija (30 minut pri 50 °C), inaktivacija reverzних transkriptaz in aktivacija *Taq* polimeraze DNA (15 minut pri 95 °C), sledilo je 45 ciklov pomnoževanja v dveh stopnjah [denaturacija (15 sekund pri 94 °C), prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige DNA (60 sekund pri 60 °C)].

Vzorci, katerih vrednost Ct je bila manjša od 45, so bili pozitivni.

Spodnjo mejo detekcije izolirane RNA z RT-PCR v realnem času smo izvedli s pomočjo standardne krivulje tako, kot je opisano v točki 3.2.4.7.4. Za pripravo posamezne standardne krivulje smo uporabili celokupno RNA, ki smo jo izolirali na tri različne načine iz celične kulture RK-13 inficirane z referenčnim sevom Bucyrus, kot je opisano v točkah (3.2.4.1, 3.2.5.1.3 in 3.2.5.1.4).

Občutljivost metode RT-PCR v realnem času smo primerjali z občutljivostjo klasične metode RT-PCR.

3.2.5.3 Molekularna analiza vzorcev semena in brisov pri posameznih perzistentnih in domnevnih izločevalcih virusa EAV

Z metodo RT-PCR v realnem času smo v vzorcih semena in brisih določevali relativno količino virusne RNA. Vzorcem, ki smo jih naredili v dveh ponovitvah, smo izračunali povprečno vrednost in standardno deviacijo ter jih predstavili v grafih.

Ugotavljali smo, ali med vzorci semena in brisi istega izločevalca obstajajo razlike v relativni količini virusa EAV in ali vrsta kužnine vpliva na zgoraj omenjene molekularne analize za detekcijo virusne nukleinske kisline. Rezultate, dobljene z metodo RT-PCR v realnem času, smo primerjali z rezultati klasične metode RT-PCR.

3.2.6 Molekularna epidemiologija virusa EAV

3.2.6.1 Genotipizacija virusa EAV

Viruse EAV genotipiziramo z določanjem nukleotidnega zaporedja gena za poglobitni glikoprotein GP₅ (ORF5).

S pomočjo specifičnih začetnih oligonukleotidov ORF5s/ORF5a (Tabela 3-3) smo z metodo RT-»touchdown« PCR skušali pomnožiti 640 bp velik odsek.

Za metodo »touchdown« PCR, ki je različica klasične metode PCR za pomnoževanje nukleinskih kislin *in vitro*, velja, da se začetni oligonukleotidi prilegajo pri različnih temperaturah. Prvi cikli pomnoževanja potekajo pri višjih temperaturah prileganja, medtem ko se temperatura pri naslednjih ciklih postopno znižuje, vsak cikel za 1 °C do končne najnižje nastavljene temperature prileganja začetnih oligonukleotidov. Pri višjih temperaturah se pomnožujejo specifični tarčni odseki v virusnem genomu, pri nižjih temperaturah prileganja pa se z izbranimi začetni oligonukleotidi običajno pomnožujejo nespecifični produkti. Uporaba nastavitvenega območja različnih temperatur prileganja začetnih oligonukleotidov ima to prednost, da favorizira pomnoževanje specifičnih produktov PCR (Don in sod., 1991).

Reakcijo RT-»touchdown« PCR smo izvajali s kompletom QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Nemčija).

Reakcijska mešanica s končnim volumnom 50 μ l je vsebovala (1 $\times$) pufer QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer z 2,5 mM $MgCl_2$, 0,4 mM vsakega nukleotida iz 10 mM mešanice deoksinukleozidtrifosfatov (dNTP Mix), 0,6 μ M posameznega začetnega oligonukleotida, 2 μ l mešanice encimov QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix (mešanica vsebuje dve reverzni transkriptazi: Omniscript™ Reverse Transcriptase in Sensiscript™ Reverse Transcriptase ter Hot StarTaq® polimerazo DNA), 29 μ l H_2O -DEPC in 4 μ l celokupne RNA, ki smo jo izolirali iz vzorcev semena z reagentom TRIzol® po postopku, ki je opisan že v točki 3.2.4.8.4.

Pomnoževanje je potekalo v cikličnem termostatu T3 Thermocycler (Biometra, Nemčija): reverzna transkripcija (30 minut pri 50 °C), začetna denaturacija (15 minut pri 95 °C), sledi šest ciklov pomnoževanja v treh stopnjah [denaturacija (40 sekund pri 94 °C), prileganje začetnih oligonukleotidov (prvi cikel: 50 sekund pri 58 °C, vsak naslednji cikel: 50 sekund pri 58 °C – 1 °C/cikel) in podaljševanje verige DNA (1 minuto pri 72 °C)], sledi še 34 ciklov pomnoževanja v treh stopnjah [denaturacija (40 sekunde pri 94 °C), prileganje začetnih oligonukleotidov (50 sekund pri 52 °C) in podaljševanje verige DNA (1 minuto pri 72 °C)] ter končno podaljševanje (10 minut pri 72 °C) in ohlajevanje pri 4 °C.

V primeru, ko smo pri analizi produktov RT-PCR z elektroforezo v agaroznem gelu dobili negativen rezultat ali pa je bila ocenjena koncentracija produktov RT-PCR po prvem pomnoževanju prenizka (< 50 ng/ μ l), da bi lahko v sekvenčni reakciji produktom prvega pomnoževanja določili nukleotidno zaporedje, smo produkte RT-PCR še dodatno pomnožili z metodo »nested« PCR. S parom začetnih oligonukleotidov EAV32/CR2 smo dobili 519 bp velik produkt pomnoževanja.

Dodatno pomnoževanje smo izvajali z encimom Platinum® Taq polimeraza DNA (Invitrogen™, ZDA). Reakcijska mešanica je vsebovala (1 $\times$) pufer PCR, 2,5 mM $MgCl_2$ (Invitrogen™, ZDA), 0,2 mM mešanico nukleotidov (10 mM dNTP Mix, PE Applied Biosystems, ZDA), 0,4 μ M posameznega začetnega oligonukleotida, 2,5 enote Taq polimeraze DNA (Invitrogen™, ZDA) in 34 μ l H_2O -DEPC. V vsako reakcijo za dodatno pomnoževanje smo dodali 5 μ l produkta RT-PCR. Končni volumen reakcij »nested« PCR je bil 50 μ l.

Pomnoževanje je v cikličnem termostatu T3 Thermocycler (Biometra, Nemčija) potekalo po naslednji shemi: začetna denaturacija (15 minut pri 94 °C), sledilo je 40 ciklov pomnoževanja

[denaturacija (45 sekund pri 94 °C), prileganje (1 minuto pri 52 °C), podaljševanje (1,5 minute pri 72 °C)] in zaključno podaljševanje (5 minut pri 72 °C).

Produkte RT-PCR in produkte dodatnega pomnoževanja z metodo »nested« PCR smo izolirali in očistili iz 1,8-odstotnega agaroznega gela s komercialnim kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA), po postopku, ki je opisan že v točki 3.2.4.6.1.

Sekvenciranje nukleotidnega zaporedja v delu gena ORF5 je s paroma začetnih oligonukleotidov ORF5s/ORF5a in EAV32/CR2 izvedlo podjetje MacroGen (www.macrogen.com) po protokolu BigDye™ terminator (Applied Biosystems, ZDA) na avtomatskem sekvenatorju ABI3730XL (Applied Biosystems, ZDA).

3.2.6.1.1 Filogenetska analiza ORF5

Analiza nukleotidnih zaporedij ORF5

Nukleotidna zaporedja smo uredili s pomočjo programov Seqman, Editseq in DAMBE. V analizo smo vključili nukleotidna zaporedja izolatov virusa EAV, ki smo jih pridobili s pomnoževanjem nukleinske kisline v vzorcih semena perzistentno okuženih žrebcev pasme lipicanec, kasačev in toplokrvnih konjev. Slovenski izolati vključujejo 39 sevov izoliranih pri lipicancih, 2 seva določena pri toplokrvnih konjih in 17 sevov, ki smo jih določili pri kasačih. V primerjavo smo vključili tudi homologna nukleotidna zaporedja 80 izolatov iz treh različnih genetskih skupin (EAV-1, EAV-2 in EAV-3) ter 18 nukleotidnih zaporedij izolatov virusa EAV iz baze GenBank, ki niso bili uvrščeni v nobeno od omenjenih treh genetskih skupin (Tabele 3-6a, 3-6b, 3-6c in 3-6d).

Tako smo v analizi uporabili 495 nukleotidov dolgo poravnavo 156 nukleotidnih zaporedij ORF5. Homologna zaporedja smo poravnali s pomočjo programa MUSCLE (Edgar, 2004) in jih primerjali z nukleotidnim zaporedjem referenčnega seva Bucyrus.

Tabela 3-6a: Seznam devetindvajsetih sevov virusa EAV, ki jih uvrščamo v genetsko skupino EAV-1.

Genetska skupina	Ime seva	Država izvora	Oznaka seva	V GenBank dostopna številka (<i>angl. accession number</i>)
EAV-1	Vienna	Avstrija	Vienna	AF099811
	A6	Avstrija	A6	AY453279
	A7	Avstrija	A7	AY453280
	A165	Nemčija	D4	AF099820
	EAV 86 R	Francija	F1	AF099814
	EAV 86 P	Francija	F2	AF099815
	F4	Francija	F4	AY453283
	GB4	Velika Britanija	GB4	AY453284
	GB5	Velika Britanija	GB5	AY453285
	H1	Madžarska	H1	AY453286
	H3	Madžarska	H3	AY453288
	H12	Madžarska	H12	AY453297
	H16	Madžarska	H16	AY453301
	H23	Madžarska	H23	AY453308
	ITA92	Italija	I2	U38598
	1489V/96	Italija	I8	AF099829
	3308V/96	Italija	I9	AF099830
	874V/97	Italija	I10	AF099831
	I16	Italija	I16	AY453313
	I17	Italija	I17	AY453314
	I18	Italija	I18	AY453315
	I20	Italija	I20	AY453317
	I23	Italija	I23	AY453320
	S-436	Poljska	PL3	AF099839
	5499/94	Poljska	PL4	AF099840
	6547/96	Poljska	PL5	AF099841
	AZ87	ZDA	USA8	U38593
	S1512	ZDA	USA18	AF099850
	Q1	Katar	Q1	AY453329

Tabela 3-6b: Seznam sedemindvajsetih sevov virusa EAV, ki jih uvrščamo v genetsko skupino EAV-2.

Genetska skupina	Ime seva	Država izvora	Oznaka seva	V GenBank dostopna številka (<i>angl. accession number</i>)
EAV-2	Arvac	ZDA	Arvac	U38479
	ATCC	ZDA	ATCC	U38591
	A8	Avstrija	A8	AY453281
	Bucyrus	ZDA	Bucyrus	NC_002532
	Fallat	Kanada	CDN1	AF099812
	T1329	Kanada	CDN3	U46951
	15492	Kanada	CDN5	U46950
	19933	Kanada	CDN7	U46949
	93/25382	Velika Britanija	GB1	AF099844
	H2	Madžarska	H2	AY453287
	H7	Madžarska	H7	AY453292
	I15	Italija	I15	AY453312
	I22	Italija	I22	AY453319
	I26	Italija	I26	AY453323
	NEAV-1	Norveška	N1	AF099835
	NEAV-2	Norveška	N2	AF099836
	S-113	Nizozemska	NL1	AF099833
	S-544	Nova Zelandija	NZ1	AF099834
	PLD76	Poljska	PL1	U38608
	PA76	ZDA	USA3	U38607
	KY77	ZDA	USA4	U38600
	84KY-A1	ZDA	USA6	U46954
	MT89	ZDA	USA11	U38604
	IL93AB	ZDA	USA13	U38596
	S1368	ZDA	USA16	AF099848
	S1711	ZDA	USA21	AF099853
	USA24	ZDA	USA24	AY453346

Tabela 3-6c: Seznam štiriindvajsetih sevov virusa EAV, ki jih uvrščamo v genetsko skupino EAV-3.

Genetska skupina	Ime seva	Država izvora	Oznaka seva	V GenBank dostopna številka (<i>angl. accession number</i>)
EAV-3	A3	Avstrija	A3	AY453277
	A4	Avstrija	A4	AY453278
	CA97	ZDA	CA97	AF118783
	CW01	ZDA	CW01	AY349168
	CW96	ZDA	CW96	AY349167
	W877	Nemčija	D1	AF099817
	B076	Nemčija	D3	AF099819
	D526	Nemčija	D6	AF099822
	EAV 86 110	Francija	F3	AF099816
	96/7982	Velika Britanija	GB3	AF099846
	H13	Madžarska	H13	AY453298
	H14	Madžarska	H14	AY453299
	H15	Madžarska	H15	AY453300
	H24	Madžarska	H24	AY453309
	470VE1/95	Italija	I4	AF099825
	73VE2/95	Italija	I5	AF099826
	977VE/95	Italija	I6	AF099827
	1330VE/95	Italija	I7	AF099828
	1908V/97	Italija	I11	AF099832
	NEAV-3	Norveška	N3	AF099837
	S2	Švedska	S2	AY453340
	S5	Švedska	S5	AY453343
	S6	Švedska	S6	AY453344
	S7	Švedska	S7	AY453345

Tabela 3-6d: Seznam osemnajstih sevov virusa EAV, ki jih ne uvrščamo v nobeno od treh genetskih skupin.

Ime seva	Država izvora	Oznaka seva	V GenBank dostopna številka (<i>angl. accession number</i>)
Bibuna	Švica	Bibuna	AF099843
H5	Madžarska	H5	AY453290
H9	Madžarska	H9	AY453294
H10	Madžarska	H10	AY453295
H11	Madžarska	H11	AY453296
H19	Madžarska	H19	AY453304
H21	Madžarska	H21	AY453306
I192VE4/91	Italija	I1	AF099823
I35VE2/95	Italija	I3	AF099824
Wroclaw-2	Poljska	PL2	AF099838
RSA4	JAR	RSA4	AY453335
RSA6	JAR	RSA6	AY453337
RSA8	JAR	RSA8	AY453339
S-2506	Švedska	S1	AF099842
S3	Švedska	S3	AY453341
S4	Švedska	S4	AY453342
S197/02	Madžarska	S197 02	AY359201
KY63	ZDA	USA2	U38599

Analiza aminokislinskih zaporedij GP₅

Poravnana nukleotidna zaporedja ORF5 smo s programom SEAVIEW (Galtier in sod., 1996) prevedli v aminokislinska in jih primerjali z aminokislinskim zaporedjem referenčnega seva Bucyrus. V izpeljanih aminokislinskih zaporedjih smo ugotavljali ohranjenost in variabilnost aminokislin na treh nevtralizacijskih mestih B (61 aa), C (67–90 aa) in D (99–106 aa), ki se nahajajo v variabilnem področju V₁ [61–121 aa], saj točkovne mutacije v omenjenih področjih lahko privedejo do sprememb v aminokislinskem zaporedju, ki lahko vplivajo na nevtralizacijski fenotip virusa EAV.

Filogenetske analize

Filogenetske odnose med različnimi virusi EAV smo ugotavljali po metodi NJ, ML in po Bayesovi metodi (»Bayesian inference«, BI).

Drevo NJ smo poiskali s programom Phylip, verzija 3.68 (Felsenstein, 2008). V tem postopku smo za iskanje drevesa uporabili model F84 (Felsenstein in Churchill, 1996), ki je zelo podoben modelu HKY (»Hasegawa-Kishino-Yano 1985 model«) (Hasegawa in sod., 1985). Model HKY upošteva razlike v frekvenci nukleotidov ($\pi_A \neq \pi_C \neq \pi_G \neq \pi_T$), različno verjetnost tranzicijskih in transverzijskih substitucij ($\alpha \neq \beta$), enako verjetnost vseh tranzicijskih substitucij (α), enako verjetnost vseh transverzijskih substitucij (β), razmerje med tranzicijami in transverzijami (Ti/Tv). Statistične podpore posameznih cepitev na drevesu NJ smo izračunali z neparametričnim testom samovzorčenja s po 1000 ponovitvami.

Za iskanje drevesa največjega verjetja in Bayesovega drevesa smo najprej ugotovili substitucijski model po kriteriju testa razmerja verjetij (hLRTs, *angl. Hierarchical likelihood ratio tests*), ki je vgrajen v program Modeltest, verzija 3.7.c (Posada in Crandall, 1998). Po tem kriteriju se zaporedja ORF5 najverjetneje spreminjajo po modelu HKY + I + Γ . Poleg zgoraj omenjenih parametrov, model HKY + I + Γ upošteva tudi različno pogostost nukleotidnih zamenjav na različnih pozicijah vzdolž zaporedja (diskretna aproksimacija distribucije gama Γ , s 4 hitrostnimi razredi) in delež nukleotidnih mest, ki se ne spreminjajo (I).

Drevo BI smo poiskali s programom MrBayes, verzija 3.1.2 (Ronquist in Huelsenbeck, 2003). Tudi v tem postopku smo za iskanje drevesa BI uporabili model HKY + I + Γ . Posteriorne verjetnosti cepitev smo iskali z algoritmom MCMC (*angl. Markov Chain Monte Carlo*).

Model HKY smo uporabili tudi za iskanje drevesa ML s programom PhyML (Guindon in Gascuel, 2003), ki je prosto dostopen na strežniku <http://atgc.lirmm.fr/phyml/>. Statistične podpore posameznih cepitev smo izračunali z neparametričnim testom samovzorčenja s po 1000 ponovitvami.

3.2.6.1.2 Evolucija kraških sevov virusa EAV iz reje A

Analiza nukleotidnih zaporedij ORF5

Za ugotavljanje genetskih sprememb virusov EAV skozi čas smo določili nukleotidna zaporedja gena ORF5 pri virusih, ki smo jih določili v semenu perzistentno okuženih žrebcev več let zapored. V raziskavo smo vključili najstarejše perzistentne izločevalce (PI):

žrebec letnik 1986 (926), žrebec letnik 1983 (840), žrebec letnik 1981 (795) in žrebec letnik 1988 (987).

S programom za progresivno poravnavo več zaporedij Clustal X 1.83 smo nukleotidna zaporedja posameznega žrebca poravnali med seboj. Ugotavljali smo število nukleotidnih zamenjav, ki se je zgodila v ORF5 v razmiku približno enega leta. Prav tako smo določili število nukleotidnih zamenjav, ki so se zgodile v genomu virusa v obdobju med najstarejšim in najmlajšim odvzemom semena.

Vpliv selekcije na evolucijo gena ORF5

Preiskali smo vpliv selekcije na evolucijo virusa EAV pri perzistentno okuženih žrebcih. V analizo smo vključili nukleotidna zaporedja virusov iz vzorcev semen odvzetih pri istem PI.

Z metodo Li-Wu-Luo (Li in sod., 1985) smo s programom MEGA 4.0 (Tamura in sod., 2007) določevali razmerje med številom nesinonimnih nukleotidnih zamenjav na nesinonimno mesto in številom sinonimnih nukleotidnih zamenjav na sinonimno mesto (K_a/K_s). Razmerje nam pove, ali je del gena pod selekcijskim pritiskom. Ko je $K_a/K_s < 1$, je gen pod delovanjem negativne, prečiščujoče selekcije; v nasprotnem primeru, ko je $K_a/K_s > 1$, pa je gen pod delovanjem pozitivne selekcije. Če se v genu pojavi nesinonimna mutacija, ki izboljša funkcijo proteina, bo pozitivna selekcija takšno mutacijo tudi hitreje fiksirala (Leroux in sod., 1997; Li, 1997).

Na ta način smo skušali ugotoviti, ali se zaradi stabilizirajoče selekcije v ORF5 ohranja visok polimorfizem in ali so se nevtralizacijska mesta v poglavitnem glikoproteinu GP₅ med perzistentno okužbo spremenila pod vplivom selekcijskega pritiska zaradi delovanja nevtralizacijskih protiteles.

Analiza aminokislinskih zaporedij GP₅

Preverili smo, ali točkovna mutacija v nukleotidnem zaporedju vpliva na spremembo aminokislinskega zaporedja. Zanimalo nas je, ali nukleotidne zamenjave v kodonih dajo kot rezultat podobno aminokislino ali aminokislino s povsem drugačno fizikalno-kemijsko (hidrofobnost) lastnostjo, kot ga je imela prvotna. S programom Clustal X 1.83 smo poravnali aminokislinska zaporedja, ki smo jih prevedli iz nukleotidnih zaporedij ORF5 virusov, izoliranih iz perzistentno okuženih žrebcev iz reje A.

Napoved antigenskih determinant in sekundarne strukture glikoproteina GP₅

Vpliv spremembe v aminokislinskem zaporedju na antigenske lastnosti in sekundarno strukturo GP₅ smo analizirali s programom Protean (DNASTAR) in strežnikom PSIPRED (Jones, 1999). S pomočjo programov smo poizkušali napovedati določene lastnosti izbranih regij aminokislinskega zaporedja GP₅.

Za napoved antigenskih determinant smo uporabili metodo Jameson-Wolf (Jameson in Wolf, 1988) iz programa Protean. Program upošteva kombinacijo različnih metod napovedi sekundarne strukture, uporabi še fleksibilnost, hidrofilnost ter upošteva verjetnost, da je določena aminokislina na površini proteina.

PSIPRED (University of Warwick, Velika Britanija) je program za analizo aminokislinskih zaporedij, ki je prosto dostopen na medmrežju na naslovu: (<http://bioinf.cs.ac.uk/psipred/>).

Program kot vhod pripravi profil iz programa PSI-BLAST (*angl. Position-Specific Iterated BLAST*, Altschul in sod., 1997) in pri napovedi sekundarne strukture uporabi nevronske mreže. Rezultate aminokislinske analize smo v obliki grafične predstavitve α -vijačnic, β -struktur in zank prejeli na elektronski naslov. Zanesljivost napovedi je 76,5-odstotna (Q3, »three structural states«) za eno zaporedje.

Z omenjenim programom smo aminokislinskim zaporedjem kraških izolatov virusa EAV napovedali sekundarno strukturo in preverili njeno ohranjenost, tako da smo jo primerjali z napovedjo sekundarne strukture za referenčni sev Bucyrus.

Napoved glikozilacijskih mest v glikoproteinu GP₅

S programom Gene Runner verzija 3.01 (Hastings Software, 1994) smo v aminokislinskih zaporedjih kraških izolatov virusa EAV poiskali možna mesta glikozilacije.

Število glikozilacijskih mest in njihovo pozicijo v GP₅ pri kraških izolatih virusa EAV smo primerjali s tistimi v aminokislinskem zaporedju referenčnega seva Bucyrus in v vakcinalnem sevu Arvac.

3.2.7 Določevanje bioloških značilnosti slovenskih izolatov virusa EAV

3.2.7.1 Rast virusa EAV v celični kulturi RK-13

Vsi postopki poskusa izolacije virusa EAV iz semena so trajali tri tedne.

3.2.7.1.1 Metoda izolacije virusa EAV iz semena z vzdrževalnim gojiščem

Do leta 2007 smo metodo izolacije virusa EAV izvajali v 24 ur stari celični kulturi RK-13 s 5 odstotki FBS, ki smo jo pripravili po postopku, opisanem v točki 3.2.1.2. Izolacijo virusa EAV iz semena smo izvajali v mikrotitrskih ploščah.

Opis postopka

- Iz jamic na mikrotitrski plošči smo odvzeli rastno gojišče in ga zamenjali z vzdrževalnim, tako da smo v vse jamice nanegli po 100 μ l vzdrževalnega gojišča.
- V prvo jamico izbrane kolone smo nanegli po 100 μ l supernatanta preiskovanega semena, dobro premešali in v naslednjo jamico prenesli 100 μ l mešanice supernatanta semena in vzdrževalnega gojišča. Na ta način smo s prenašanjem 100 μ l mešanice supernatanta semena in gojišča pripravili dvakratne razredčine vzorcev semena od 1 : 2 do 1 : 256.
- Za pozitivno kontrolo smo uporabili referenčni sev Bucyrus. Neinokulirana celična kultura RK-13 pa nam je služila za negativno kontrolo.
- Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali sedem dni pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Celice smo dnevno opazovali z invertnim svetlobnim mikroskopom in ugotavljali, ali se je v jamicah s celično kulturo RK-13 pojavil citopatski efekt, ki se običajno pojavi v sedmih dneh po inokulaciji.
- Če po sedmih dneh nismo opazili citopatskega efekta, smo mikrotitrsko ploščo zamrznili pri –80 °C. Po eni uri smo mikrotitrsko ploščo odmrznili in vsebino inokuliranih jamic združili v 15-mililitrsko centrifugirko.
- Odmrznjeno suspenzijo vzorca supernatanta semena in gojišča smo centrifugirali 10 minut pri 1000 $\times$ g in 4 °C. Določeno količino supernatanta smo shranili v 2,5-

mililitrskih krioepruvetah pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, preostanek pa smo uporabili za pripravo prve pasaže, ki smo jo izvedli po enakem postopku kot izolacijo.

- Če tudi po sedmih dneh v prvi pasaži nismo opazili citopatskega efekta, smo ploščo ponovno zamrznili. Supernatant iz odmrznjene prve pasaže nam je služil za inokulum pri drugi pasaži. V času dveh tednov smo opravili dve pasaži.
- V primeru pojava citopatskega efekta smo prisotnost virusa EAV v semenu potrdili še s specifičnimi monoklonskimi protitelesi v indirektnem imunoperoksidaznem testu ali s pomnoževanjem odseka v nukleokapsidnem genu (ORF7) s klasično metodo RT-PCR ali z metodo RT-PCR v realnem času.

Indirektni imunoperoksidazni test

Z indirektnim imunoperoksidaznim testom smo v celični kulturi RK-13 dokazovali prisotnost virusnega antigena. Pri izvajanju testa smo uporabljali mišja monoklonska protitelesa, ki so uperjena proti proteinu nukleokapside virusa EAV.

Opis postopka

- Po drugi pasaži smo iz jamic mikrotitrne plošče odstranili vzdrževalno gojišče in celice fiksirali s 85-odstotnim acetonom, ohlajenim na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z multikanalno pipeto smo v vse jamice mikrotitrne plošče nanesti po 200 μl acetona in mikrotitrsko ploščo zamrznili za 30 minut pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Po končani fiksaciji celic RK-13 smo aceton odlili in mikrotitrsko ploščo posušili v zaščitni mikrobiološki komori M 12 (Iskra Pio, d. o. o., Slovenija).
- V jamice na mikrotitrski plošči smo nanesti 100 μl 1-odstotnega H_2O_2 , ki smo ga predhodno pripravili z redčenjem 30-odstotnega H_2O_2 (Merck, Nemčija) v ultra čisti vodi.
- Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo jamice sprali 3-krat z (1 $\times$) pufrom PBS-Tween (PBS-T), ki smo ga pripravili iz (20 $\times$) raztopine PBS-Tween Solution (Svanova[®] Biotech AB, Švedska).
- Mikrotitrsko ploščo smo posušili s papirnatimi brisačami.

- Mišja primarna monoklonska protitelesa proti virusnim proteinom nukleokapside BIO 278 (Bio X Diagnostics, Belgija) smo razredčili v pufru PBS-T v razmerju 1 : 20. V vsako jamico smo nanесли 50 μ l primarnih monoklonskih protiteles.
- Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 1 uro pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Po končani inkubaciji smo spiranje s PBS-T ponovili. Mikrotitrsko ploščo smo posušili in v jamice nanесли 50 μ l sekundarnih poliklonskih protiteles, ki so konjugirana z encimom hrenova peroksidaza. Proti mišjim primarnim monoklonskim protitelesom smo uporabili poliklonska protitelesa P0260 (Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP, DAKO, Danska). Koncentrirano raztopino protiteles P0260 smo razredčili v PBS-T v razmerju 1 : 100. Pred tem smo v pufer PBS-T dodali goveji serum s končno koncentracijo 5 %.
- Mikrotitrsko ploščo smo ponovno inkubirali 1 uro pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Po končani inkubaciji smo ponovili spiranje s pufrom PBS-T.
- V jamice smo nanесли 100 μ l substrata AEC.
- Mikrotitrsko ploščo smo ponovno inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi v temnem prostoru.
- Nadaljnji razvoj barvne reakcije smo zaustavili, tako da smo substrat odlili in v jamice nalili ultra čisto vodo.

Rezultate smo interpretirali na naslednji način:

- Ker se virus EAV razmnožuje v citoplazmi celic, se v primeru pozitivnega rezultata citoplazma celic RK-13 obarva rožnato.
- Če do obarvanja celic ne pride, je rezultat indirektnega imunoperoxidaznega testa negativen.

Peroksidazni substrat AEC

- Ena tableta AEC, ki vsebuje 20 mg [3-amino-9-etilkarbazol] (Sigma-Aldrich CO., Nemčija).

Tableto smo raztopili v 2,5 ml N,N-dimetilformamida (Merck, Nemčija) in raztopino prenesli v 47,5 ml 0,05 M acetatnega pufru, ki smo ga pripravili sami. Tako pripravljenemu substratu smo tik pred nanosom v jamice dodali 25 μ l 30-odstotnega H₂O₂.

Sestava acetatnega pufra

– 4,1 g natrijevega acetata (CH_3COONa).

2000-mililitrsko čašo smo dopolnili do 1000 ml z ultra čisto vodo in s pomočjo ledocetne kisline (CH_3COOH) umerili pH na 5,0.

V osmih vzorcih semen, ki smo jih leta 2006 odvzeli štirim žrebcom (150, 260, 388 in 282) iz reje A, smo z metodo RT-PCR in RT-PCR v realnem času dokazali virusni genom, nismo pa dokazali živega virusa, zato smo jih poslali v analizo v nemški laboratorij (Labor dr. Böse Harsum, Nemčija).

3.2.7.1.2 Metoda izolacije virusa EAV iz semena z gojiščem, ki vsebuje 0,75 odstotka soli CMC

Po strokovnem posvetu z dr. Gianlucom Autorinom iz italijanskega regionalnega raziskovalnega inštituta v Rimu (IZS Lazio e Toscana) smo od leta 2007 dalje pri izvajanju klasičnega postopka izolacije virusa EAV v celični kulturi RK-13 začeli uporabljati protokol, ki ga priporoča OIE. Protokol vključuje uporabo gojišča, ki vsebuje 0,75 odstotka soli CMC. Priprava in sestava gojišča je opisana v točki 3.1.4.2.

V svetu je med virologi razširjeno mnenje, da omenjeno gojišče poveča občutljivost metode izolacije virusa EAV v celični kulturi.

Po navodilih iz Diagnostičnega priročnika OIE (2004, peta izdaja, Poglavje 2.5.10. (1) (a)) preiskava zahteva predpripravo vzorca semena.

Supernatant vzorca semena smo do preiskave hranili v zamrzovalniku pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred začetkom izvajanja metode izolacije virusa EAV v celični kulturi RK-13 smo vzorec supernatanta semena odmrznili. Iz odmrznjenega supernatanta semena smo v vzdrževalnem gojišču, ki smo mu dodali ($100\times$) antibiotik z antimikotikom (Antibiotic/Antimycotic Solution, Gibco[®], Invitrogen Corporation[™], ZDA) s končno koncentracijo 10 %, pripravili serijo desetkratnih razredčitev od 10^{-1} do 10^{-3} .

Izolacijo virusa EAV iz supernatanta semena smo izvajali v 24 ur stari celični kulturi RK-13. Količino inokuluma in gojišča s CMC smo prilagodili glede na izbrano velikost rastne površine celičnega sloja RK-13, ki je odvisna od tipa gojitvene posode (Tabela 3-7).

Tabela 3-7: Lastnosti gojitvenih posod za celično kulturo, ki smo jih uporabili pri izvajanju metode izolacije virusa EAV v celični kulturi RK-13. Izbranemu tipu posode smo prilagodili količino inokuluma in količino gojišča s CMC.

Tip gojitvene posode za celično kulturo	Velikost rastne površine (cm ²)	Količina inokuluma (μl)	Količina gojišča s CMC (μl)
Plošča s šestimi jamicami (angl. 6-well plate, TPP, Švica)	1,5/jamico	500	3000
Steklenica T-25 (Švica, TPP)	25	1000	5000

Opis postopka

- Iz gojitvenih posod za celično kulturo smo odstranili rastno gojišče.
- Na sloj celic RK-13 smo inokulirali posamezne razredčine vzorca semena. Na plošči s šestimi jamicami smo vsako razredčino semena testirali v dveh ponovitvah, medtem ko smo pri izvajanju metode v steklenicah za celično kulturo T-25 vsako razredčino semena nanesli v posamezno steklenico T-25.
- Gojitveno posodo z inokulirano celično kulturo RK-13 smo inkubirali 1 uro pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Po končani inkubaciji smo v vsako jamico oziroma steklenico dodali ustrezno količino gojišča s CMC (Tabela 3-7) in posodo inkubirali 7 dni pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Celice smo dnevno opazovali z invertnim svetlobnim mikroskopom in ugotavljali, ali se je v jamicah s celično kulturo RK-13 pojavil citopatski efekt.

V primeru negativnega rezultata smo pri izvedbi prve in druge pasaže postopali tako, kot je opisano v točki 3.2.6.1.1.

Izolate, ki so se v celični kulturi RK-13 uspešno namnožili, smo potrdili s specifičnimi monoklonskimi protitelesi proti proteinu nukleokapside virusa EAV z indirektnim imunoperoksidaznim testom.

Prisotnost virusnega antigena smo dokazovali na predmetnih stekelcih z osmimi jamicami (*angl. 8-well chamber slide*, Nunc™, ZDA). Inokulum smo pripravili iz izolata virusa EAV, ki smo ga uspešno namnožili v prisotnosti gojišča s CMC. V ta namen smo inokulirano celično kulturo RK-13 v gojišču s CMC najprej zamrznili pri –80 °C.

Inficirano celično kulturo RK-13 smo odmrznili in jo centrifugirali 10 minut pri 1000 × g in 4 °C. Supernatant (200 μl) nam je služil kot vir inokuluma. Virus smo namnožili v 200 μl

običajnega vzdrževalnega gojišča. Prisotnost virusnega antigena smo dokazovali na enak način, kot smo ga opisali v točki 3.2.6.1.1. Količino reagentov smo prilagodili velikosti površine jamice ($0,9 \text{ cm}^2$) na predmetnih stekelcih. V jamice smo nanесли po 200 μl primarnih monoklonskih in enako količino sekundarnih poliklonskih protiteles. Jamice smo spirali s 400 μl pufra PBS-T. Za razvoj barvne reakcije pa smo potrebovali 400 μl substrata AEC.

Iz namnoženih izolatov virusa EAV smo z reagentom TRIzol[®] izolirali celokupno RNA, kot je opisano v poglavju 3.2.4.1.

S klasično metodo RT-PCR ali z metodo RT-PCR v realnem času smo z dokazom gena za nukleokapsido (ORF7) virusa EAV pozitiven izid metode izolacije virusa v celični kulturi še dodatno potrdili.

3.2.7.1.3 Metoda izolacije virusa EAV z gojiščem, ki vsebuje 1 odstotek agaroze tipa VII

Naš namen je bil ugotoviti, ali slovenski izolati virusa EAV povzročajo v celični kulturi RK-13 spremembe v obliki plakov.

Opis postopka

- Slovenske izolate, ki smo jih uspešno namnožili v celični kulturi RK-13 z gojiščem s CMC do prve pasaže, smo zamrznili pri $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$, odmrznili in centrifugirali 10 minut pri $1000 \times g$ in $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 1 ml supernatanta inficiranih celičnih kultur smo nanесли v dan staro celično kulturo RK-13, ki smo jo gojili v steklenici T-25.
- Steklenico T-25 z inokulirano celično kulturo RK-13 smo inkubirali 1 uro pri $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in s 5 odstotki CO_2 .
- Po končani inkubaciji smo v vsako steklenico dodali 5 ml prej pripravljenega gojišča z 1 odstotkom agaroze tipa VII. Steklenico smo inkubirali 7 dni pri $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in s 5 odstotki CO_2 .
- Celice smo fiksirali tako, da smo v vsako steklenico na plast agaroze odpipetirali po 4 ml 1-odstotnega kristalno vijoličnega barvila.
- Steklenico smo inkubirali 2 uri pri $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in s 5 odstotki CO_2 .

- Plast agaroze smo odstranili pod curkom vode iz vodovodne pipe.
- Ugotavljali smo, ali so se v sloju celic RK-13 pojavile spremembe v obliki plakov. Plake smo opazovali z invertnim svetlobnim mikroskopom in s prostim očesom. Velikost plakov, ki so jih v celični kulturi RK-13 povzročili slovenski izolati virusa EAV, smo primerjali z velikostjo plakov, ki jih je povzročil referenčni sev Bucyrus.

3.2.7.2 Kinetika rasti izolatov virusa EAV v celični kulturi RK-13

V celični kulturi RK-13 smo spremljali rast dveh različnih genotipov virusa EAV. Za primerjavo smo uporabili ameriški sev Bucyrus, ki ga uvrščamo v genetsko skupino EAV-2, in slovenski sev 087-02, ki smo ga izolirali iz semena perzistentno okuženega žrebca 087 iz reje A.

3.2.7.2.1 Spremljanje rasti izolatov virusa EAV

Obema izolatoma smo določili titer z metodo po Reed-Muenchu. Po inokulaciji virusa v celično kulturo RK-13 smo z invertnim svetlobnim mikroskopom dnevno spremljali spremembe v morfologiji celic. Sprememba morfologije epitelnih celic RK-13 v okroglo, pojav vakuol v citoplazmi in odstopanje od podlage so značilnosti, po katerih prepoznamo CPE, ki ga virus EAV povzroča v celični kulturi RK-13.

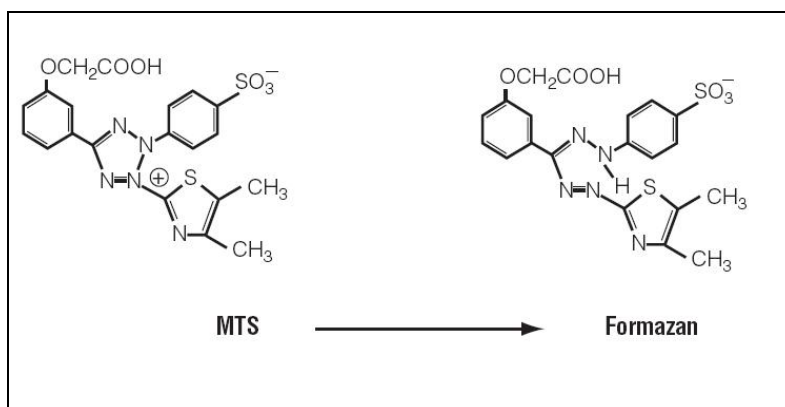
Poleg tega smo obema izolatoma virusa EAV določili titer. Rezultate, ki predstavljajo, kako se titer virusa EAV spreminja s časom, smo tudi grafično prikazali.

Kinetiko rasti smo spremljali tudi z določitvijo proteina nukleokapside v indirektnem imunoperoksidaznem testu. Po obsegu obarvanosti fiksiranega celičnega sloja s peroksidaznim substratom AEC smo lahko ocenili obsežnost CPE.

3.2.7.2.2 Spremljanje živosti celic RK-13

Za oceno živosti in metabolne aktivnosti celic RK-13 smo uporabili komercialni komplet CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, ZDA).

Metoda temelji na ugotavljanju respiracijske aktivnosti celic. Ob dodatku reagenta, ki vsebuje tetrazolijevo sol (MTS) [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium] in fenazin etosulfat (PES), se v metabolično aktivnih celicah ob prisotnosti NADPH ali NADH tvori po redukciji barvni produkt iz formazana (Barltrop in sod., 1995; Berridge in Tan, 1993) (Slika 3-4). Količina barvnega produkta je sorazmerna s številom živih celic v celični kulturi.



Slika 3-4: Struktura tetrazolijeve soli (MTS) in njen produkt iz formazana.

Da bi ugotovili, ali se slovenski izolat 087-02 po patogenosti razlikuje od virulentnega seva Bucyrus, smo z omenjeno metodo dnevno spremljali živost celic RK-13. Na ta način smo skušali dobiti enostaven vpogled v to, ali so individualne razlike v pojavu in obsežnosti CPE med virusi EAV, ki se uvrščajo v različne genetske skupine, pogojene z genotipom virusa EAV.

Inokulacija celične kulture RK-13

Opis postopka

- Po encimski obdelavi s tripsinom smo celice RK-13 v koncentraciji 200.000 celic/ml nasadili v jamice mikrotitrne plošče.
- Po enem dnevu smo na isto mikrotitrsko ploščo v celično kulturo RK-13 inokulirali oba izolata virusa EAV. Obe suspenziji virusa, ki sta bili vključeni v poskus, sta imeli enako koncentracijo. Le-ta je vsebovala 100 infektivnih enot TCID₅₀ v 25 µl inokuluma.

- Po enourni adsorbciji virusa pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂ smo v celično kulturo dodali še 75 µl vzdrževalnega gojišča.

Za negativno kontrolo smo v celično kulturo RK-13 nanesti 100 µl vzdrževalnega gojišča.

Ocena živosti celic RK-13

Opis postopka

- Po enem dnevu smo v celično kulturo RK-13 v mikrotitrskih ploščah dodali 20 µl reagenta »CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent«, ki smo ga predhodno ogreli na sobno temperaturo.
- Sledila je inkubacija dve uri pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Inficiranim celicam RK-13 smo s spektrofotometrom pri valovni dolžini 492 nm določili optično gostoto.

Za vse tri vzorce (referenčni sev Bucyrus, izolat 087-02, celična kultura RK-13) smo testiranje izvedli vsak dan v dveh ponovitvah. Rezultate testiranja, ki smo ga izvajali devet dni zapored, smo prikazali v grafikonu.

3.2.7.3 Dokazovanje virusa EAV v modih

Virus EAV smo ugotavljali v modih žrebca 282 iz reje A. Žrebcu 282 (letnik 1999), ki je v enoti šole jahanja, so pred kastracijo (leta 2006) odvzeli seme, po kastraciji (marca 2007) pa tudi bris sečnice.

Tkivo mod smo s sterilnimi škarjami razrezali na drobne koščke. V terilnico smo dodali gojišče Advanced D-MEM z dodatkom (100×) antibiotika z antimikotikom (Gibco[®], Invitrogen Corporation[™], ZDA) in kremenčev pesek. Zmes smo dobro strli s pestilom, da smo dobili homogeno suspenzijo mod s koncentracijo 10 % m/v. Tako pripravljeno suspenzijo mod smo centrifugirali 10 minut pri 1000 × g in 4 °C.

Virus EAV smo dokazovali v supernatantu z metodo izolacije v celični kulturi RK-13 z gojiščem, ki vsebuje CMC. Virusni antigen smo potrdili s specifičnimi monoklonskimi protitelesi v indirektnem imunoperoksidaznem testu.

Iz supernatanta smo z reagentom TRIzol[®] izolirali celokupno RNA (opisano v poglavju 3.2.4.1) in nato virusno RNA potrdili s klasično metodo RT-PCR in metodo RT-PCR v realnem času.

Patohistološko preiskavo mod je opravila prof. dr. Polona Juntos iz Inštituta za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo na Veterinarski fakulteti v Ljubljani.

3.2.7.4 Nevtralizacija kraškega izolata (087-02) virusa EAV

V okviru programa izkoreninjenja KAK so v reji A leta 2006 začeli s cepljenjem serološko negativnih žrebčkov proti KAK. V ta namen uporabljajo živo oslajeno vakcino Arvac[®]. Da bi lahko podali oceno o učinkovitosti cepljenja z omenjeno vakcino, smo cepljene žrebčke testirali na prisotnost nevtralizacijskih protiteles proti virusu EAV. Titer nevtralizacijskih protiteles smo določili z NT, pri izvedbi katerega smo uporabili slovenski sev 087-02, ki smo ga izolirali v celični kulturi RK-13 iz semena perzistentno okuženega plemenskega žrebca iz reje A (letnik 1992). Slovenskemu izolatu 087-02 smo z metodo po Reed-Muenchu določili titer. Vzporedno smo serume cepljenih žrebčkov testirali tudi v NT, ki smo ga izvedli z znano koncentracijo referenčnega seva Bucyrus. Ker smo v obeh testih uporabili enako koncentracijo virusa, smo lahko rezultate seroloških testiranj primerjali med seboj. Na ta način smo želeli ugotoviti, ali med ameriškim sevom, iz katerega je narejeno cepivo Arvac[®], in slovenskim izolatom 087-02, ki kroži med konji v reji A že vrsto let, obstaja navzkrižna imunost in ali je cepljenje z ameriškim tipom virusa EAV v reji A sploh smiselno.

Najprej smo NT izvedli v mikrotitrskih ploščah z ravnim dnom (TPP, Švica) v skladu z navodili iz Diagnostičnega priročnika OIE (2004, peta izdaja, Poglavje 2.5.10. (2) (a)) in kot rezultat zabeležili titer protiteles v preiskovanih serumih. Postopek je opisan v točki 3.2.3.1.

Primerjava rasti med referenčnim sevom Bucyrus in slovenskim izolatom 087-02 je pokazala, da slovenski sev 087-02 po tretji pasaži še ni bil prilagojen za rast v celični kulturi RK-13 z običajnim vzdrževalnim gojiščem (2 % FBS) brez CMC. Zato smo oba NT izvedli po

nekoliko modificiranem protokolu. V vzporedno analizo z obema testnima virusoma (referenčni sev Bucyrus in slovenski izolat 087-02) smo vključili 12 serumskih vzorcev žrebčkov (letnik 2007), ki so vključeni v program sanacije KAK.

Opis postopka

- Preiskovane vzorce smo segrevali v vodni kopeli (Sutjeska, Beograd, SČG) 30 minut pri 56 ± 1 °C, da smo inaktivirali komplement.
- Iz jamic mikrotitrne plošče, v katerih je bila en dan stara celična kultura RK-13 (z gojitveno gostoto 200.000 celic/ml) v rastnem gojišču, smo odstranili gojišče.
- Serumske vzorce smo razredčili v gojišču Advanced D-MEM z dodatkom (100×) antibiotika z antimikotikom (Gibco[®], Invitrogen Corporation[™], ZDA). Pripravili smo serijo dvakratnih razredčin (od začetne razredčine 1 : 2 pa do končne 1 : 4096). 25 µl vsake razredčine smo nanесли v jamice na mikrotitrski plošči.
- Serumskim vzorcem smo dodali po 25 µl delovne razredčine vsakega testnega virusa. Delovna razredčina je vsebovala 100 infektivnih enot TCID₅₀ virusa v 25 µl inokuluma. Delovni razredčini virusa smo dodali še serum budre (10 % v končni delovni razredčini) kot vir komplementa.
- Mešanico preiskovanega vzorca in virusa smo inkubirali 1 uro pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Po inkubaciji smo v vsako jamico nanесли po 100 µl gojišča s CMC.
- Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 48 do 72 ur pri 37 °C in s 5 odstotki CO₂.
- Po inkubaciji smo celice dnevno opazovali z invertnim svetlobnim mikroskopom.
- Rezultat smo imeli za pozitiven, če smo v preiskovanem vzorcu določili titer protiteles IgG, ki je bil večji ali enak razmerju 1 : 4.

Rezultate obeh testiranj smo primerjali med seboj.

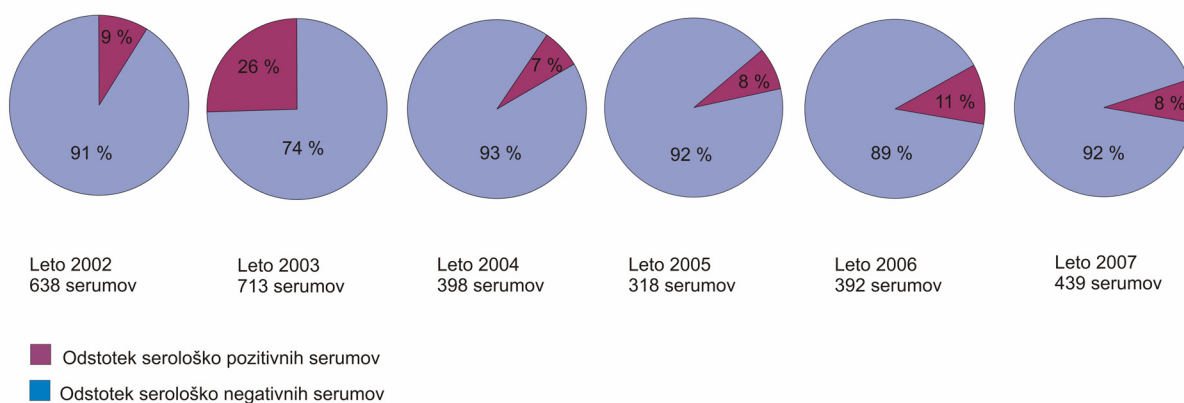
4. REZULTATI

4.1 SEROLOŠKE PREISKAVE

4.1.1 Serološke preiskave zasebnih rej

V šestletnem obdobju smo z nevtralizacijskim testom (NT) pregledali 2898 serumskih vzorcev konjev iz zasebnih rej. Tega je bilo 2121 (73,2 %) vzorcev žrebcev, 463 (16 %) vzorcev kobil in 314 (10,8 %) vzorcev žrebčkov in žrebic.

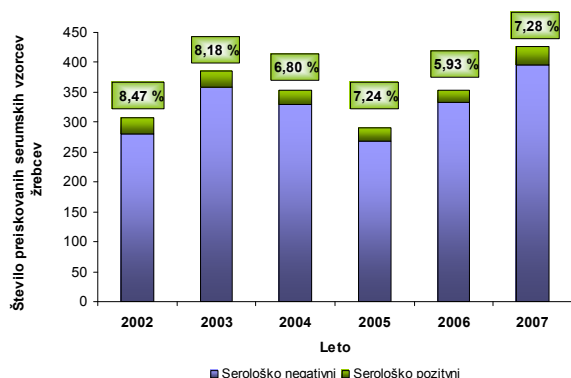
Leta 2002 smo protitelesa proti virusu EAV določili v 57 vzorcih serumov (9 %), leta 2003 v 183 (26 %), leta 2004 v 29 (7 %), leta 2005 v 25 (8 %), leta 2006 v 42 (11 %) in leta 2007 v 34 vzorcih serumov (8 %) (Slika 4-1).



Slika 4-1: Grafični prikaz rezultatov testiranja z NT v obdobju od leta 2002 do leta 2007.

Rezultate seroloških testiranj smo prikazali tudi ločeno za oba spola (Sliki 4-2 in 4-5).

V raziskavi smo ugotovili, da je bilo leta 2002 med 307 žrebci 26 (8,5 %) serološko pozitivnih, leta 2003 je bilo med 391 žrebci 32 (8,2 %) pozitivnih, leta 2004 med 353 žrebci 24 (6,8 %) pozitivnih, leta 2005 med 290 žrebci 21 (7,2 %) pozitivnih, leta 2006 med 354 žrebci 21 (5,9 %) pozitivnih in leta 2007 je bilo med 426 žrebci 31 (7,3 %) pozitivnih na protitelesa proti virusu EAV.

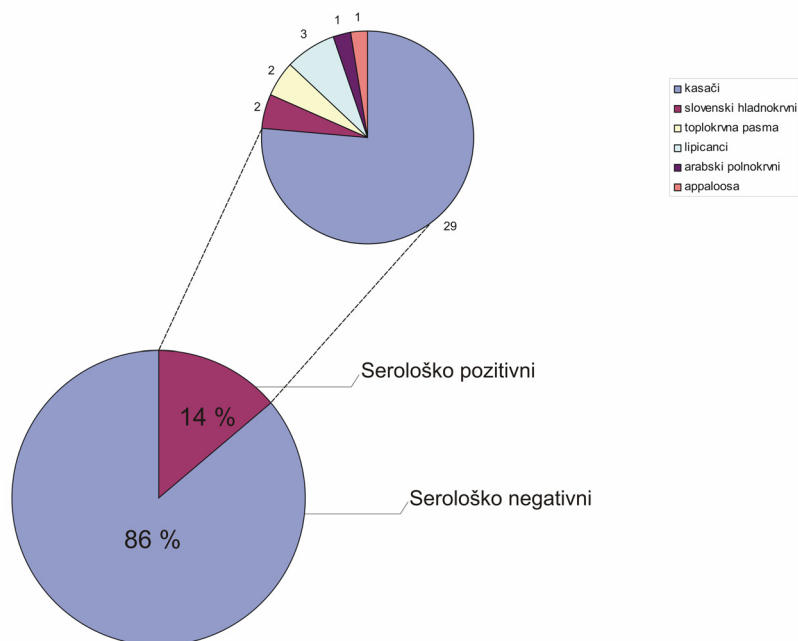


Slika 4-2: Serumski vzorci žrebcev iz zasebnih rej v obdobju od leta 2002 do leta 2007.

Največ serološko pozitivnih žrebcev (8,5 %) smo določili leta 2002 (Slika 4-2), ko smo v skladu z Odredbo o izvajanju preventivnih cepljenj in drugih diagnostičnih preiskav živali v letu 2002 (Ur. l. RS, št. 6/02) in Pravilnikom o pogojih in trajanju karantene za uvožene živali, valilna jajca, živalsko seme, jajčne celice in zarodke (Ur. l. RS, št. 55/99) pregledali 307 žrebcev, med katerimi so bili tudi uvoženi plemenski žrebci, ki so bili med karanteno pregledani na KAK.

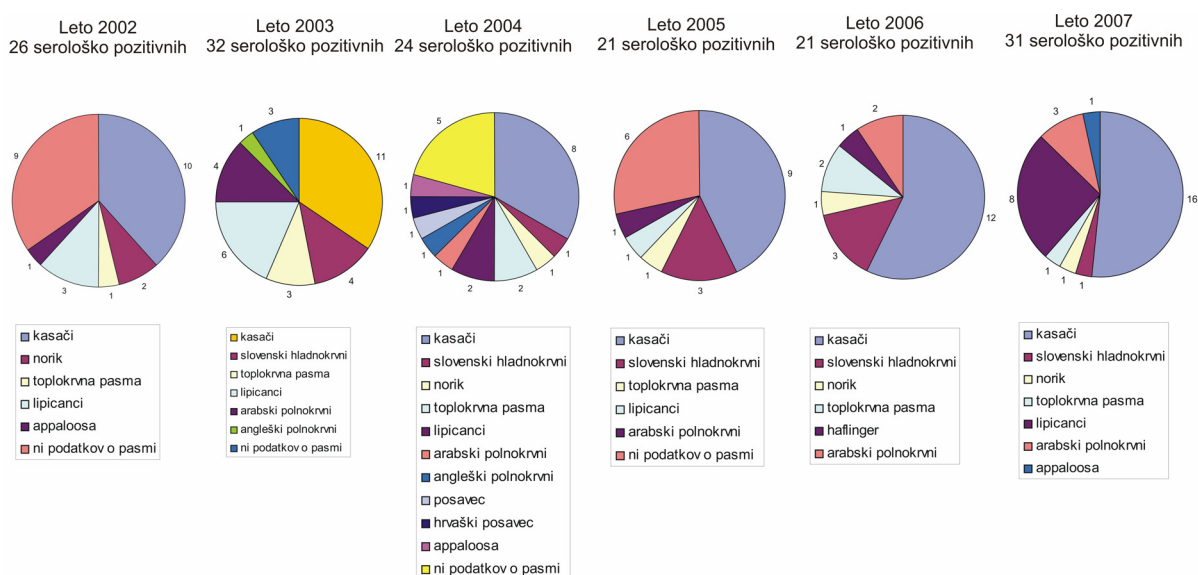
Istega leta smo v raziskavo vključili tudi za plemenilno sezono 2002 priznane plemenjake, pri katerih smo ugotovili kar za 5,5 % večjo okuženost z virusom EAV. Od 273 pregledanih plemenskih žrebcev je bilo serološko pozitivnih 38 (14 %) (Slika 4-3).

V Sloveniji redimo 11 pasem konj (<http://kazalci.arso.gov.si/>). Na podlagi rezultatov raziskave v letu 2002, ki so prikazani na Sliki 4-3, lahko vidimo, da je med šestimi različnimi pasmami konj okužba z virusom EAV najbolj razširjena med kasači (76,3 %), najmanj pa med arabskimi polnokrvnimi konji in konji pasme appaloosa (0,05 %).



Slika 4-3: Grafikon prikazuje število serološko pozitivnih plemenskih žrebcev pri posameznih pasmah.

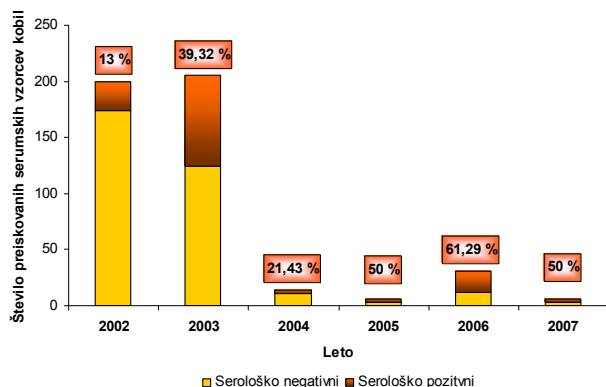
V obdobju od leta 2002 do leta 2007 so bile v preiskavah zastopane vse pasme, ki jih redimo v Sloveniji (Slika 4-4).



Slika 4-4: Število serološko pozitivnih žrebcev po pasmah.

Protitelesa proti virusu EAV smo največkrat ugotovili pri kasačih, slovenski hladnokrvni pasmi konj in pri lipicancih.

Obstaja tudi razlika v okuženosti z virusom EAV med spoloma. Odstotek serološko pozitivnih kobil je bil višji (Slika 4-5) kot pri žrebcih. Med kobilami je bilo največ plemenskih in tekmovalnih kobil pasme kasač, ki so bile vzrejene v tujini in uvožene v Slovenijo.

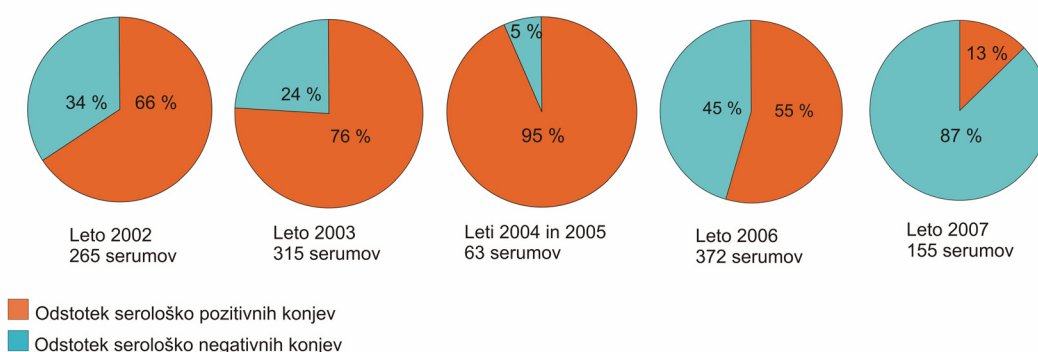


Slika 4-5: Serumski vzorci kobil iz zasebnih rej v obdobju od leta 2002 do leta 2007.

4.1.2. Serološke preiskave živali v reji A

V reji A, kjer je vsako leto od 300 do 350 konj lipicanske pasme, smo v šestletnem obdobju pregledali skupno 1170 serumov. Leta 2002 je bilo serološko pozitivnih 174 (66 %) konj, leta 2003 239 (76 %), v letih 2004 in 2005 61 (95 %), leta 2006 203 (55 %) konji in leta 2007 20 (13 %) konj. Rezultati seroloških preiskav so prikazani na sliki 4-6. Celotna populacija konj je bila vključena v serološko preiskavo le leta 2006.

Ker so bile leta 2007 serološke preiskave narejene le na serumskih vzorcih treh žrebcev, dobljeni rezultati ne odražajo dejanskega stanja okuženosti žrebcev z virusom EAV, saj vzorec ni bil reprezentativen.



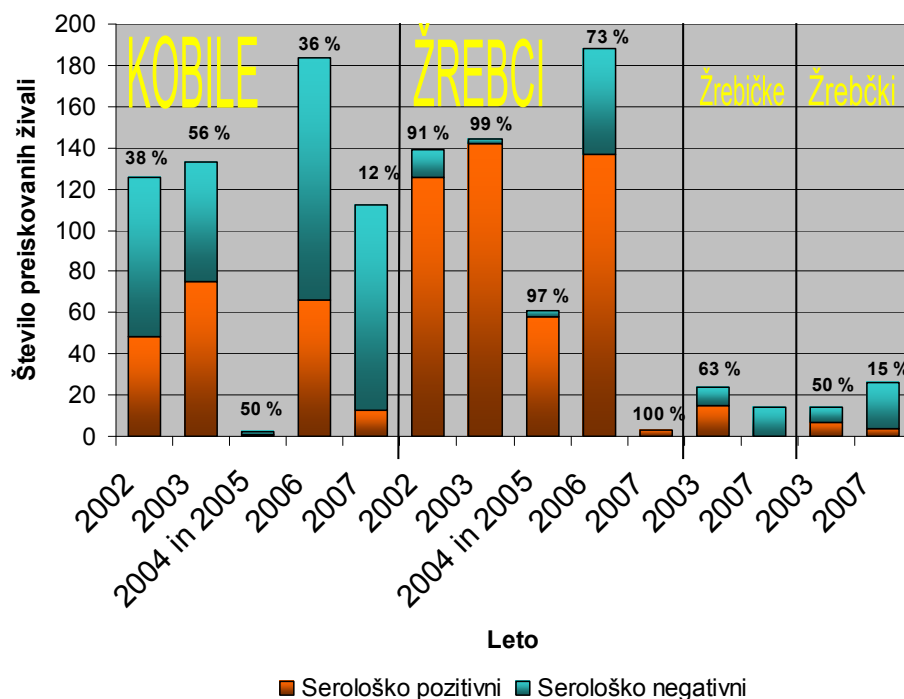
Slika 4-6: Grafični prikaz rezultatov seroloških testiranj v reji A v obdobju od leta 2002 do leta 2007.

Rezultate seroloških preiskav smo prikazali ločeno za oba spola (Slika 4-7).

Ugotovili smo, da je odstotek serološko pozitivnih žrebcev večji kot odstotek pozitivnih kobil. Okuženost žrebcev je bila najnižja leta 2006, ko jih je izmed 188 pregledanih 137 (73 %) imelo protitelesa proti virusu EAV. Največji odstotek okuženih žrebcev smo ugotovili leta 2003 (99 %, 142 žrebcev).

Protitelesa proti virusu EAV smo dokazali tudi pri žrebičkah in žrebčkih.

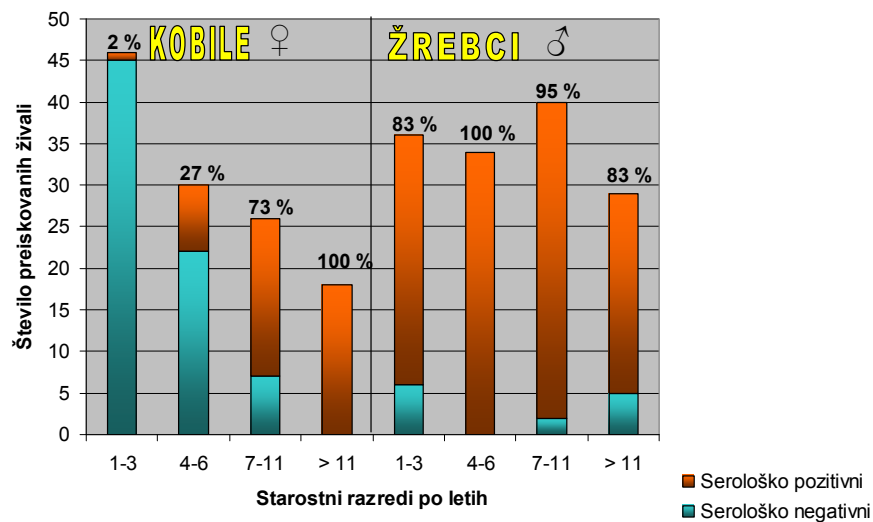
V letu 2003 smo preiskali 24 žrebičk in 14 žrebčkov starih 6 mesecev. Serološko pozitivnih je bilo 15 (63 %) žrebičk in 7 (50 %) žrebčkov. V letu 2007 smo preiskali 14 žrebičk in 13 žrebčkov, starih od 8 do 10 mesecev, ter 13 žrebčkov, starih od 5 do 7 mesecev. Pri slednjih smo dokazali protitelesa proti virusu EAV v štirih primerih (15 %) (Slika 4-7). Najverjetneje gre za pasivna nevtralizacijska protitelesa, ki so jih žrebčki pridobili s kolostrumom po porodu.



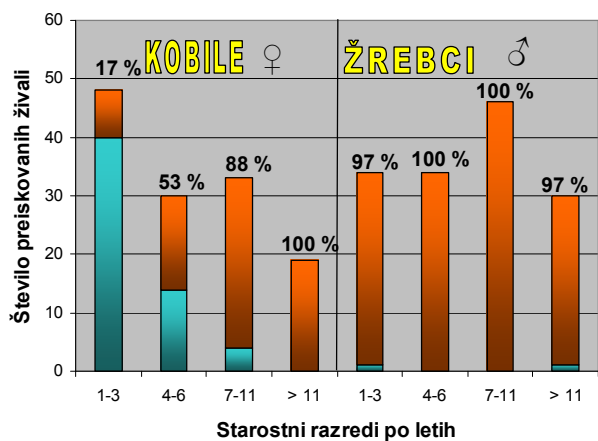
Slika 4-7: Prikaz serološko pozitivnih živali in primerjava med spoloma.

Med konji, ki so v reji lipicancev serološko pozitivni, so zastopane vse starostne skupine od žrebičk in žrebčkov do plemenskih kobil in žrebcev.

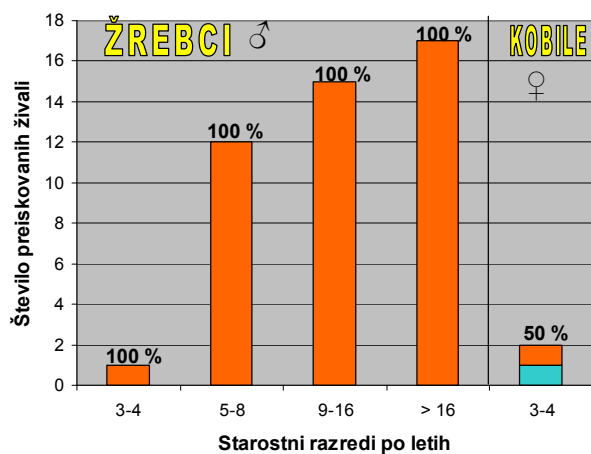
Za različne starostne skupine smo rezultate seroloških preiskav prikazali ločeno za oba spola. Iz rezultatov (Od slike 4-8 do 4-12) je razvidno, da se okuženost z virusom EAV večja s starostjo ne glede na spol. Najpogosteje, od 83 do 100 odstotkov, smo protitelesa proti virusu EAV našli pri kobilah starih več kot 11 let. V kategoriji žrebičk od prvega do tretjega leta je imelo protitelesa proti virusu EAV od 2 do 17 % živali, medtem ko je bil odstotek okuženih moških živali iste starostne skupine leta 2002 in 2003 mnogo višji, znašal je 83 % oziroma 97 % (Sliki 4-8 in 4-9). Izjema je leto 2006, ko smo pri žrebčkih od prvega do tretjega leta starosti, protitelesa proti virusu EAV našli le pri 4 % (Slika 4-11).



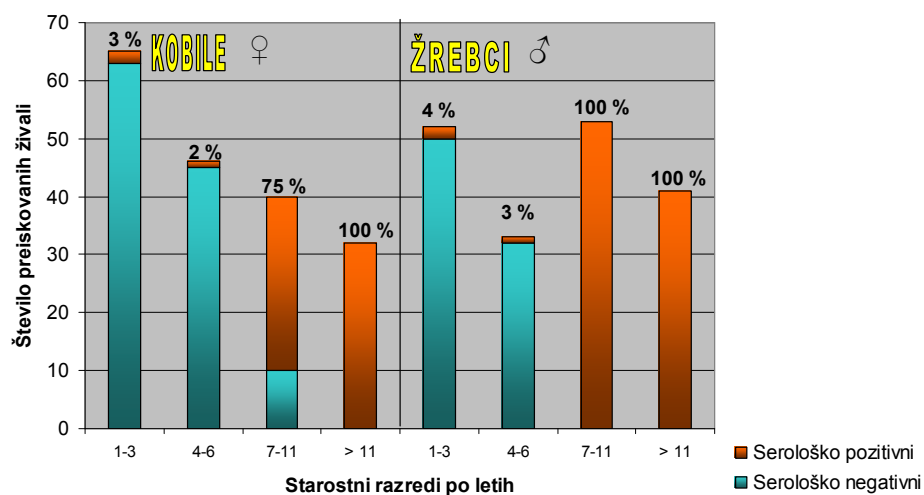
Slika 4-8: Odstotek serološko pozitivnih živali po starostnih razredih v reji A leta 2002.



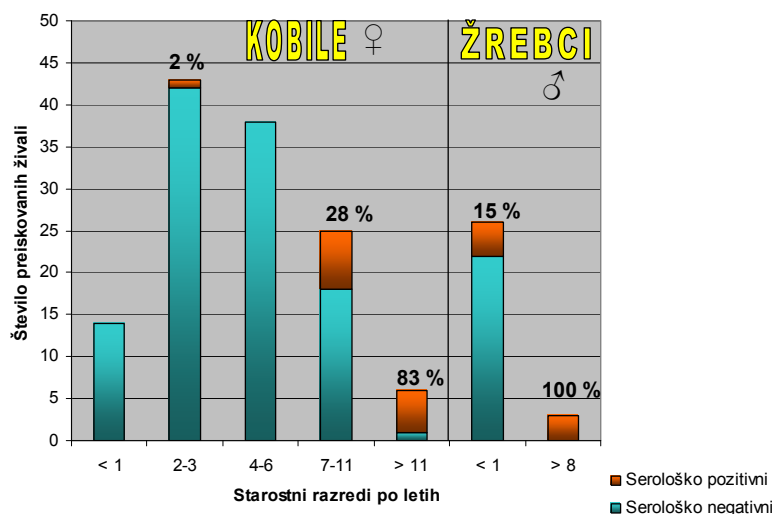
Slika 4-9: Odstotek serološko pozitivnih živali po starostnih razredih v reji A leta 2003.



Slika 4-10: Odstotek serološko pozitivnih živali po starostnih razredih v reji A leta 2004 in 2005.



Slika 4-11: Odstotek serološko pozitivnih živali po starostnih razredih v reji A leta 2006.



Slika 4-12: Odstotek serološko pozitivnih živali po starostnih razredih v reji A leta 2007.

4.1.2.1 Okvirna časovna opredelitev prve okužbe z virusom EAV pri posameznih žrebcih

Štiriinsedemdesetim žrebcom (Tabeli 4-1 in 4-2) so v letih od 1995 do 2006 večkrat odvzeli kri. Dokazovali smo jim protitelesa proti virusu EAV. Serumske vzorce posameznih moških živali smo testirali z NT po dopolnjenem prvem letu starosti, da bi se izognili morebitnim lažno pozitivnim rezultatom zaradi maternalnih protiteles.

Serološko pozitivnim žrebcom so pri starosti pet let in več odvzeli seme, v katerem smo z molekularnimi metodami ugotavljali virus EAV. Na podlagi rezultatov molekularnih preiskav smo žrebce razvrstili v tri kategorije:

1. Perzistentni izločevalec (PI) je žrebec, pri katerem smo z molekularnimi metodami v vzorcih semena, odvzetih v razmiku enega ali več let, dvakrat ali večkrat zapored dokazali virus EAV.
2. Domnevni izločevalec je žrebec, za katerega domnevamo, da izloča virus EAV s semenom, vendar tega ne moremo zagotovo potrditi, saj mu je bilo seme, v katerem smo z molekularnimi metodami dokazali virus EAV, v obdobju od leta 2001 do 2007 odvzeto le enkrat.

3. Žrebec, ki ne izloča virusa EAV s semenom in pri katerem v proučevanem obdobju v odvzetih vzorcih semena z molekularnimi metodami nismo nikoli dokazali virusa EAV.

Tabela 4-1: Rezultati seroloških testiranj žrebcev, pri katerih smo v vzorcih semena virus EAV dokazali z molekularnimi metodami.

	Oznaka žrebca	Leto rojstva	Rezultat serološkega testiranja z NT								
			1995	1996	1997	1998	1999	2000	2002	2003	2006
Perzistentni izločevalci virusa EAV	795	1981	/	/	/	/	/	/	+	+	+
	840	1983	+	+	+	-	+	-	+	+	/
	987	1988	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	990†	1988	+	+	/	+	+	+	+	+	/
	031	1990	+	+	+	+	/	+	+	+	+
	068	1991	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	085	1992	/	/	/	+	/	+	+	+	+
	087	1992	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	1995	/	-	/	-	+	-	+	+	+
	167	1995	/	-	-	-	+	+	+	+	+
	168	1996	/	/	-	-	+	+	+	+	+
	213	1997	/	/	/	-	+	+	+	+	+
Domneveni izločevalci virusa EAV	926	1986	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	042	1990	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	122	1994	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	161	1995	/	-	-	-	+	+	+	+	+
	188	1996	/	/	-	-	+	+	+	+	+
	191	1996	/	/	-	-	/	+	+	+	+
	219	1997	/	/	/	-	+	+	+	+	+
	260	1999	/	/	/	/	/	-	+	+	+
	261	1999	/	/	/	/	/	-	+	+	+
	282	1999	/	/	/	/	/	-	+	+	+
	289	2000	/	/	/	/	/	/	+	+	+
	299	2000	/	/	/	/	/	/	+	+	+
	344	2002	/	/	/	/	/	/	/	+	+
	388	2003	/	/	/	/	/	/	/	/	+

(-) = Negativno, (+) = Pozitivno, (/) = Ni podatka; s sivo barvo je označeno leto, ko so se žrebci predvidoma prvič okužili z virusom EAV, (†) = Žrebec so usmrtili.

Čeprav tabeli 4-1 in 4-2 prikazujeta, da se je največ žrebcev okužilo z virusom EAV med tretjim in četrtem letom starosti, ko so bili v preizkusu delovne sposobnosti, menimo, da so se nekateri žrebci z virusom EAV okužili že prej (po prvem oziroma drugem letu starosti). To velja predvsem za žrebce, ki so bili v letu 2001, ko serološkega testiranja nismo izvedli, stari eno ali dve leti, in žrebce, ki so bili na protitelesa proti virusu EAV prvič pregledani šele pri starosti dveh ali treh let.

Tabela 4-2: Rezultati seroloških testiranj žrebcev, pri katerih v vzorcih semena virusa EAV z molekularnimi metodami nismo dokazali.

Oznaka žrebca	Leto rojstva	Rezultat serološkega testiranja z NT								
		1995	1996	1997	1998	1999	2000	2002	2003	2006
742†	1979	+	/	+	+	+	+	+	/	/
764†	1980	-	/	-	-	+	-	+	/	/
843†	1983	+	/	+	-	/	/	+	/	/
847	1983	/	-	+	-	+	+	+	+	+
857	1984	/	/	+	-	+	-	+	+	+
859	1984	/	/	+	+	/	+	/	/	/
898	1985	-	/	+	-	+	+	+	+	/
919	1986	+	/	+	+	+	+	/	+	/
947	1987	/	-	+	-	/	+	/	/	+
973	1988	/	-	+	-	+	-	-	+	+
001	1989	/	/	/	/	/	/	+	+	+
070	1991	+	+	+	+	+	+	+	/	+
103	1993	-	-	/	-	/	-	+	+	+
132	1994	-	-	-	+	+	+	+	+	+
144	1995	/	-	-	-	+	-	-	+	+
146	1995	/	-	-	-	+	-	+	+	+
165	1995	/	-	-	-	+	+	+	+	+
179	1996	/	/	-	-	+	+	+	+	+
182	1996	/	/	-	-	+	+	+	+	+
183	1996	/	/	-	-	+	+	+	+	+
202	1997	/	/	/	-	+	+	+	+	+
209	1997	/	/	/	/	/	/	+	+	+
218	1997	/	/	/	-	+	+	+	+	+
222	1997	/	/	/	-	+	+	+	+	+
225	1998	/	/	/	/	+	+	+	+	+
235	1998	/	/	/	/	-	+	/	+	+
239	1998	/	/	/	/	-	-	+	+	+
246	1998	/	/	/	/	+	-	+	+	+
250	1998	/	/	/	/	/	/	+	+	/
270	1999	/	/	/	/	/	-	+	+	+
273	1999	/	/	/	/	/	-	+	+	+
274	1999	/	/	/	/	/	-	+	+	+
275	1999	/	/	/	/	/	-	+	+	+
276	1999	/	/	/	/	/	-	+	+	+
281	1999	/	/	/	/	/	-	+	+	+
742	1999	/	/	/	/	/	/	+	/	/
303	2000	/	/	/	/	/	/	+	+	+
310	2001	/	/	/	/	/	/	+	+	+
311	2001	/	/	/	/	/	/	+	+	+
312	2001	/	/	/	/	/	/	+	+	+
317	2001	/	/	/	/	/	/	+	+	+
330	2001	/	/	/	/	/	/	+	+	+
331	2001	/	/	/	/	/	/	-	+	+
332	2001	/	/	/	/	/	/	+	+	+
341	2002	/	/	/	/	/	/	/	+	+
353	2002	/	/	/	/	/	/	/	+	+
363	2002	/	/	/	/	/	/	/	+	+
392	2003	/	/	/	/	/	/	/	/	+
397	2003	/	/	/	/	/	/	/	/	-

(-) = Negativno, (+) = Pozitivno, (/) = Ni podatka; s **sivo** barvo je označeno leto, ko so se žrebci predvidoma prvič okužili z virusom EAV, (†) = Žrebce so usmrtili.

Za žrebce, stare od 16 do 26 let, ne moremo podati natančne starosti živali, kdaj je po prvem srečanju z virusom prišlo do imunskega odziva in nastanka protiteles, saj smo v Laboratoriju za virologijo NT prvič uporabili leta 1995.

4.1.2.2 Okvirna časovna opredelitev okužbe z virusom EAV pri plemenskih kobilah

Iz rezultatov seroloških testiranj kobil, za katere je bilo znano, da so jih zaplodili PI, smo poskušali oceniti okvirni čas okužbe z virusom EAV.

Zanimalo nas je tudi, ali pojav serokonverzije pri posamezni kobili sovпада s pripustom pod plemenjaka, ki je dokazano PI virusa EAV s semenom. Poskušali smo ugotoviti, ali sta pripust in pojav serokonverzije v medsebojni časovni in vzročno/posledični zvezi.

Iz podatkov v tabeli 4-3 je razvidno, da v reji A začnejo večino kobil pripuščati med 4. in 5. letom starosti. Pri 45 % vseh pripuščenih kobil je čas primarne okužbe z virusom EAV vezan na spolni stik s PI. Zagotovo lahko trdimo, da je kobile 160, 135, 099, 151 in 140 ob zaskoku okužil PI 087, medtem ko je kobile 134, 185 in 957 ob zaskoku okužil PI 990. Pri obeh PI smo z molekularnimi metodami dokazali virus EAV v več vzorcih semena, ki so ga odvzeli zaporedoma v razmiku enega leta (Tabela 4-4).

Iz seroloških rezultatov za kobilo 203, ki so jo leta 2001 pripustili pod PI 087, leta 2002 pa pod žrebca 204 C VI, ne moremo natančno ugotoviti, kateri od žrebcev jo je okužil. Žrebca 204 C VI so si v reji A izposodili iz slovaške kobilarne Topol'čianky. Njegovega semena nismo dobili v virološko preiskavo, zato virološkega statusa žrebca 204 C VI nismo ugotavljali.

Pri kobilah 086, 014, 985, 043, 110, 129, 158, 205 in 166 neposredne povezave med pripustom pod PI in pojavom serokonverzije nismo dokazali. Za starejšo kobilo 934 (leto rojstva 1986), pri kateri v serumu protiteles proti virusu EAV nismo dokazali vse do leta 2002, ko je kobila dopolnila 16 let, ne moremo trditi, da se je okužila ob pripustu pod PI. Da se je okužila preko spolnega stika pa lahko trdimo za 20 let staro kobilo 975, saj jo je leta 1993 zaplodil PI 987, pri katerem smo v semenu dokazali virus EAV.

Tabela 4-3: Rezultati seroloških testiranj kobil, ki so jih pripuščali pod PI in/ali žrebce, v semenu katerih virusa EAV nismo dokazali.

Oznaka kobile	Leto rojstva	Rezultat serološkega testiranja z NT											
		1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
203	1997	/	/	/	-	-	-	/	+ (30.05.2002)	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	/	/	/	/	887 (maj 2001)	204 C VI*? (april 2002)	990	973	/	2696 SC*?
160	1995	/	-	/	-	-	-	/	+ (30.05.2002)	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	/	/	/	764	887 (junij 2001)	/	/	990	103	273
135	1994	-	-	/	-	+	-	/	+ (30.05.2002)	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	/	/	973	764	887 (junij 2001)	887 (21.05.2002)	213	973	/	2696 SC*?
099	1993	-	-	+	-	+	+	/	+ (30.05.2002)	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	738?	/	596?	898	887 (junij 2001)	204 C VI*? (junij 2002)	/	103	/	103
151	1995	/	-	/	-	-	-	/	+ (30.05.2002)	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	/	/	/	898	/	887 (marec 2002)	990	990	103	837
140	1994	-	-	/	-	-	-	/	- (30.05.2002)	+ (25.09.2003)	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	/	/	973	898	837	887 (26.05.2002)	887 (maj 2003)	/	SC X-6*?	233
975	1988	+	+	+	+	+	+	/	/	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	973	/	/	973	/	/	/	887	103	103	837
086	1992	-	-	-	-	-	-	/	- (30.05.2002)	+ (25.09.2003)	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	/	/	/	/	/	/	/	213	973	103
014	1989	-	-	-	-	-	-	/	+ (30.05.2002)	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	973	/	/	738?	/	/	/	204 C VI*? (junij 2002)	/	213	/	973
985	1988	-	+	/	-	+	+	/	/	+ (27.03.2003)	/	/	+
	Pripust pod žrebca	837	/	/	/	901	/	/	973	213 (junij 2003)	213	/	233
134	1994	-	-	/	-	-	-	/	+ (30.05.2002)	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	/	/	/	/	/	887 (april 2002)	990	990	973	837
043	1990	/	/	/	-	/	-	/	+ (30.05.2002)	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	/	/	/	898	/	204 C VI*? (junij 2002)	990	990	103	103
110	1993	-	-	-	-	+	+	/	+	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	738?	/	/	764	919	990	901	/	SC X-6*?	837
185	1996	/	/	/	-	-	-	/	+ (30.05.2002)	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	/	/	/	/	837	887 (april 2002)	990	103	103	837
129	1994	-	-	/	-	-	-	/	+ (30.05.2002)	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	/	/	/	901	/	/	990	990	/	273
158	1995	/	-	/	-	-	+	/	+	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	/	/	/	/	/	990	/	990	233	233
934	1986	-	-	-	-	-	-	/	+ (30.05.2002)	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	837	843	596?	898	837	/	/	/	/	SC X-6*?
957	1987	-	-	+	-	-	-	/	+ (30.05.2002)	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	/	738?	596?	910	837	887 (maj 2002)	990	990	947	1837
205	1997	/	/	/	-	-	-	/	+ (30.05.2002)	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	/	/	/	/	/	990 (junij 2002)	990	103	233	233
166	1995	/	-	/	-	-	-	/	+ (30.05.2002)	+	/	/	+
	Pripust pod žrebca	/	/	/	/	/	/	919	/	990	990	947	233

(*) = Uvoz iz tujine, (?) = Virološki status ni znan, (-) = Negativno, (+) = Pozitivno, (/) = Ni podatka. Z **zeleno** barvo so označeni žrebci, pri katerih v vzorcih semena z molekularnimi metodami nismo dokazali virusa EAV, z **rožnato** so označeni PI, z **modro** barvo so označeni žrebci, ki so plemenske kobile najverjetneje okužili ob pripustu, polja označena z **rumeno** barvo nakazujejo, da so se kobile najverjetneje okužile že pred pripustom.

4.2 MOLEKULARNE PREISKAVE

4.2.1 Dokaz genoma virusa EAV v semenu žrebcev

Skupno smo z molekularnimi metodami pregledali 427 vzorcev semena. Od teh je bilo 112 vzorcev odvzetih žrebcom v zasebni lasti, pri teh je bila najpogosteje zastopana pasma kasač. Manjše število vzorcev so odvzeli žrebčkom slovenske hladnokrvne pasme iz žrebetišča na Brigi. Največje število ejakulatov, ki smo jih pregledali na virus EAV, je bilo odvzeto žrebcom pasme lipicanec iz reje A (Tabeli 4-4 in 4-5).

Tabela 4-4: Dokazovanje genoma virusa EAV v semenu PI iz reje A.

Oznaka žrebca	Leto rojstva	Molekularna metoda						
		RT-PCR 2001	RT-PCR 2002	RT-PCR 2003	RT-PCR 2004	RT-PCR 2005	RT-PCR 2006	RT-PCR v realnem času 2007
795	1981	/	/	/	+	+	/	+
840	1983	/	/	/	/	+	/	+
987	1988	+	/	/	+	+	/	/
990	1988	+	+	+	+	/	/	/
031	1990	/	/	+	+	+	/	/
068	1991	/	/	+	+	+	/	/
085	1992	/	/	+	/	/	/	+
087	1992	/	+	+	+	+	/	/
150	1995	/	/	/	/	/	+	+
167	1995	/	/	+	+	+	/	/
168	1996	+	/	+	/	/	+	+
213	1997	/	+	+	+	+	/	+

(+) = Pozitivno, (/) = Ni podatka.

Tabela 4-5: Dokazovanje genoma virusa EAV v semenu domnevnih izločevalcev iz reje A.

Oznaka žrebca	Leto rojstva	Molekularna metoda						
		RT-PCR 2001	RT-PCR 2002	RT-PCR 2003	RT-PCR 2004	RT-PCR 2005	RT-PCR 2006	RT-PCR v realnem času 2007
926	1986	/	/	/	/	/	/	+
042	1990	/	/	/	/	/	/	+
122	1994	/	/	+	/	/	/	/
161	1995	/	/	/	/	/	+	/
188	1996	/	/	/	/	/	+	/
191	1996	/	/	+	/	/	/	/
219	1997	/	/	/	/	/	+	/
260	1999	/	/	/	/	/	+	/
261	1999	/	/	/	/	/	+	/
282	1999	/	/	/	/	/	+	/
289	2000	/	/	/	/	/	+	/
299	2000	/	/	/	/	/	+	/
344	2002	/	/	/	/	/	/	+
388	2003	/	/	/	/	/	+	/

(+) = Pozitivno, (/) = Ni podatka.

4.2.1.2 Vpeljava in primerjava klasičnih metod PCR

Pri vpeljavi in primerjavi različnih molekularnih metod smo se omejili na 40 vzorcev semena, ki so jih odvzeli 23 serološko pozitivnim žrebce. Seme jim je bilo odvzeto v obdobju od leta 1999 do vključno z letom 2005.

V tabeli 4-6 so povzeti rezultati dokazovanja odseka v ORF1b, v tabeli 4-7 pa rezultati dokazovanja odseka v ORF7.

Tabela 4-6: Rezultati dokazovanja odseka v genu za polimerazo (ORF1b) z metodo RT-PCR, »semi-nested« PCR in testom RT-PCR-ELISA.

Oznaka žrebca	Leto vzorčenja	Oznaka vzorca	Nukleotidno zaporedje na mestu vezave sonde EAVpr (5'→3') ^a	Število nukleotidnih zamenjav	RT-PCR (EAV7/8)	RT-PCR-ELISA (Vrednost OD pri 450 nm) ^c	RT-PCR (EAV11/12)	RT-PCR-ELISA (Vrednost OD pri 450 nm) ^c	
AGCCGTGTAGGCTTATGGTGTGGA				Neprečiščen produkt RT-PCR		Neprečiščen produkt RT-PCR			Prečiščen produkt RT-PCR ^d
087	2002	087-02	AGCCGTGTAGGCTTATGGTGTGGA	0	+ ^b	- (0,205)	+	+ (0,536)	/
	2003	087-03	AGCCGTGTAGGCTTATGGTGTGGA	0	+	- (0,124)	+	+ (0,705)	/
	2004	087-04	/	/	/	/	+	- (0,087)	+ (1,232)
	2005	087-05	/	/	/	/	+	- (0,083)	+ (0,929)
213	2002	213-02	AGCCGTGTAGGCTTATGGTGTGGA	0	+	+ (0,292)	+	- (0,082)	+ (0,229)
	2003	213-03	/	/	+	+ (0,861)	+	+ (0,958)	/
	2004	213-04	/	/	/	/	+	- (0,102)	+ (1,234)
	2005	213-05	/	/	/	/	+	- (0,056)	+ (1,588)
990	2001	990-01	/	/	-	- (0,053)	+	+ (0,461)	+ (3,606)
	2002	990-02	AGCCGTGTAGGCTTATGGTGTGGA	0	+	+ (0,81)	+	+ (0,96)	/
	2003	990-03	AGCCGTGTAGGCTTATGGTGTGGA	0	+	+ (0,8)	+	+ (1,166)	/
	2004	990-04	/	/	/	/	+	+ (0,263)	+ (3,647)
168	2001	168-01	/	/	+	+ (0,663)	+	+ (2,605)	/
	2003	168-03	AGCCGTGTAGGCTTATGGTGTGGA	0	+	- (0,118)	+	+ (0,421)	+ (2,817)
TA	2001	TA-01	AGCCGTGTAGGCTTATGGTGTGGA	0	+ ^b	- (0,094)	+	+ (0,501)	/
AM	2001	AM-01	AGCCGTGTAGGCTTATGGTGTGGA	0	+	+ (0,549)	+	+ (0,702)	/
410/99-3	1999	410/99-3	AGCCGTGTAGGCTTATGGTGTGGA	0	+	+ (0,791)	+	+ (1,130)	/
1273-10	2000	1273-10-00	AGCCGTGTAGGCTTATGGTGTGGA	0	+	+ (0,645)	+	+ (1,685)	/
987	2001	987-01	AGCCGTGAGGCTTATGGTGTGGA	1	+	+ (0,675)	+	+ (0,982)	/
	2004	987-04	/	/	/	/	+	- (0,060)	+ (0,719)
410/99-9	1999	410/99-9	AGCCGTGAGGCTTATGGTGTGGA	1	+	+ (0,893)	+	+ (1,291)	/
379/00-4	2000	379/00-4	AGCCGTGAGGCTTATGGTGTGGA	1	+	+/- (0,22)	+	+ (1,125)	/
LA-1	2000	LA-1-00	AGCCGTGAGGCTTATGGTGTGGA	1	+	+ (0,487)	+	+ (1,843)	/
068	2003	068-03	AGCCGTGAGGCTTATGGTGTGGA	1	+	- (0,137)	+	+ (0,492)	+ (3,372)
	2004	068-04	/	/	/	/	+	- (0,056)	+ (3,661)
167	2003	167-03	AGCCGTGAGGCTTATGGTGTGGA	1	-	- (0,062)	+	+ (0,509)	/
	2004	167-04	/	/	/	/	+	- (0,062)	+ (2,364)
	2005	167-05	/	/	/	/	+	+ (0,330)	+ (3,644)
031	2003	031-03	AGCCGTGAGGCTTATGGTGTGGA	1	+	- (0,163)	+	+ (0,503)	/
	2004	031-04	/	/	/	/	+	+ (0,263)	+ (2,576)
SL	2002	SL-02	AGCCATGAGGCTTATGGTGTGGA	2	+	+ (0,272)	+	+ (0,712)	+ (1,226)
	2003	SL-03	AGCCATGAGGCTTATGGTGTGGA	2	+	+ (1,913)	+	+ (1,262)	/
SM	2002	SM-02	AGCCATGAGGCTTATGGTGTGGA	2	-	- (0,060)	+	+/- (0,243)	+ (1,748)
	2003	SM-03	AGCCATGAGGCTTATGGTGTGGA	2	-	- (0,067)	+	+ (0,46)	+ (1,229)
410/99-2	1999	410/99-2	AGCCATGAGGCTTATGGTGTGGA	2	+	+ (0,599)	+	+ (0,722)	/
122	2003	122-03	AGCCATGAGGCTTATGGTGTGGA	2	+	- (0,141)	+	+ (0,634)	/
410/99-4	1999	410/99-4	/	/	+ ^{sn}	- (0,064)	-	- (0,072)	/
410/99-7	1999	410/99-7	/	/	+ ^{sn}	- (0,071)	-	- (0,063)	/
LB-1	2000	LB-1-00	/	/	+	+ (1,193)	+	+ (0,679)	/
085	2003	085-03	/	/	-	- (0,057)	+	- (0,126)	+ (1,607)

(-) = Negativno, (+) = Pozitivno, (/) = Ni podatka, (+^{sn}) = Pozitivno z metodo »semi-nested« PCR.^a Nukleotidno zaporedje sonde EAVpr ustreza nukleotidnemu zaporedju referenčnega seva Bucyrus (NC_002532). V nukleotidnih zaporedjih slovenskih sevov virusa EAV so z zeleno barvo označena polimorfna mesta.^b Šibka jakost sevanja UV-svetlobe.^c Rezultate testa ELISA smo interpretirali na naslednji način: (+) = Pozitivno: OD > CO + 10 %, (-) = Negativno: OD > CO - 10 %, (+/-) = Nejasno: OD = CO ± 10 %. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev.^d Po elektroforezi v 1,8-odstotnem agaroznem gelu smo iz gela izrezane specifične produkte RT-PCR očistili s komercialnim kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA).

Tabela 4-7: Rezultati dokazovanja odseka v genu za nukleokapsido (ORF7) z metodo RT-PCR, testom RT-PCR-ELISA in RT-PCR v realnem času.

Oznaka žrebca	Leto vzorčenja	Oznaka vzorca	RT-PCR (EAV7.53F/EAV7.256R)	RT-PCR (EAV7.53F/12664N)	RT-PCR-ELISA (Vrednost OD pri 450 nm) ^b	RT-PCR v realnem času (EAV7.53F/EAV-R)
					Neprečiščen produkt RT-PCR	(Vrednost Ct) ^d
087	2002	087-02	+	+	+ (3,791)	25,87; 25,49
	2003	087-03	+	+	+ (0,414)	25,55; 25,74
	2004	087-04	+	+	+ (3,514)	20,75; 21,21
	2005	087-05	+ ^a	+ ^a	- (0,059) ^c	31,57; 30,12
213	2002	213-02	+	+	+ (2,445)	25,98; 25,45
	2003	213-03	+	+	- (0,214) ^c	17,73; 17,32
	2004	213-04	+	+	+ (1,508)	18,96; 19,8
	2005	213-05	+	+	- (0,122) ^c	25,97; 25,75
990	2001	990-01	+	+	+ (3,794)	18,81; 18,6
	2002	990-02	+	+	+ (3,640)	17,96; 17,39
	2003	990-03	+	+	- (0,231) ^c	18,79; 18,56
	2004	990-04	+	+	+ (3,516)	13,32; 13,58
168	2001	168-01	+	+	+ (4,014)	18,18; 18,22
	2003	168-03	+	+	+ (0,789)	21,69; 21,61
TA	2001	TA-01	+	+	+ (3,242)	33,87; 30,52
AM	2001	AM-01	+	+	+ (1,278)	25,93; 25,3
410/99-3	1999	410/99-3	+	+	+ (3,895)	18,93; 19,05
1273-10	2000	1273-10-00	+	+	+ (1,191)	18,46; 18,46
987	2001	987-01	+	+	+ (3,990)	19,38; 19,22
	2004	987-04	+	+	+ (3,707)	14,16; 14,24
410/99-9	1999	410/99-9	+	+	+ (1,054)	19,39; 19,2
379/00-4	2000	379/00-4	+	+	+ (0,452)	21,38; 21,42
LA-1	2000	LA-1-00	+	+	+ (0,463)	17,13; 17,02
068	2003	068-03	+	+	+/- (0,265) ^c	21,14; 21,19
	2004	068-04	+	+	+ (3,345)	15,66; 15,39
167	2003	167-03	+	+	+ (0,584)	20,75; 20,75
	2004	167-04	+	+	+ (3,016)	14,48; 14,54
	2005	167-05	+	+	- (0,173) ^c	21,57; 21,36
031	2003	031-03	+	+	+ (1,092)	16,59; 16,05
	2004	031-04	+	+	+ (2,968)	13,15; 13,39
SL	2002	SL-02	+	+	+ (0,303) ^c	24,43; 24,67
	2003	SL-03	+	+	+ (1,441)	18,76; 18,84
SM	2002	SM-02	+	+	+ (0,370) ^c	27,17; 27,01
	2003	SM-03	+	+	- (0,201) ^c	26,18; 25,79
410/99-2	1999	410/99-2	+	+	+ (3,959)	17,93; 17,81
122	2003	122-03	+	+	+ (0,485)	17,77; 17,6
410/99-4	1999	410/99-4	+ ^a	-	- (0,056)	38,14; 37,74
				+ ^{sn}	+ (1,963)	
410/99-7	1999	410/99-7	+ ^a	-	+ (0,513)	35,35; 35,19
				+ ^{sn}	/	
LB-1	2000	LB-1-00	+	+	+/- (0,221) ^c	20,72; 20,8
085	2003	085-03	+	+	+ (0,613)	21,54; 21,04

(-) = Negativno, (+) = Pozitivno, (/) = Ni podatka, (+^{sn}) = Pozitivno z metodo »semi-nested« PCR.

^a Šibka jakost sevanja UV-svetlobe.

^b Rezultate testa ELISA smo interpretirali na naslednji način: (+) = Pozitivno: OD > CO + 10 %, (-) = Negativno: OD < CO - 10 %, (+/-) = Nejasno: OD = CO ± 10 %. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev.

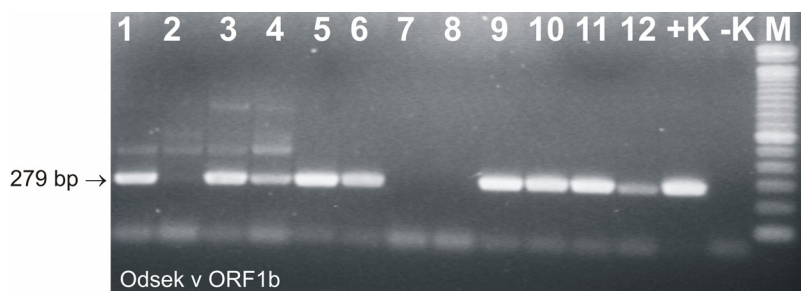
^c Po elektroforezi v 1,8-odstotnem agaroznem gelu smo iz gela izrezane specifične produkte RT-PCR očistili s komercialnim kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA).

^d Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev.

4.2.1.2.1 Pomnoževanje odseka v genu za polimerazo (ORF1b)

Pomnoževanje z začetnima oligonukleotidoma EAV7/EAV8

Z začetnima oligonukleotidoma EAV7/EAV8 smo pomnoževali 279 bp dolg odsek na 3' koncu ORF1b (Slika 4-13).



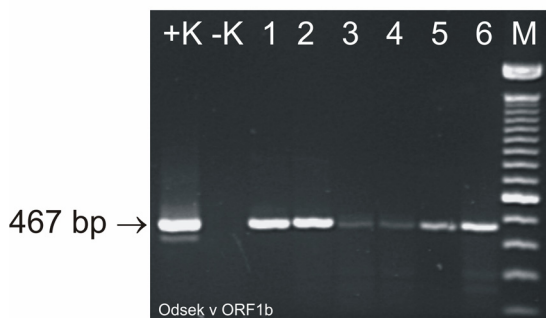
Slika 4-13: Primer elektroforetske ločitve produktov pomnoževanja z RT-PCR in začetnima oligonukleotidoma EAV7/EAV8. Vzorci semena: 1 – AM-01, 2 – 087-02, 3 – 990-02, 4 – 213-02, 5 – 410/99-2, 6 – 410/99-3, 7 – 410/99-4, 8 – 410/99-7, 9 – 410/99-9, 10 – 1273-10-00, 11 – 987-01, 12 – SL-02. + K – pozitivna kontrola (referenčni sev Bucyrus), - K – negativna kontrola reakcijske mešanice RT-PCR (H₂O-DEPC), M – standard DNA velikosti 100 bp.

V 21/30 (70 %) vzorcih semena smo določili virusno RNA, medtem ko v sedmih vzorcih semena (990-01, 167-03, SM-02, SM-03, 410/99-4, 410/99-7 in 085-03) nukleinske kisline virusa EAV nismo dokazali (Tabela 4-6).

Pri analizi produktov RT-PCR iz dveh vzorcev semena (087-02 in TA-01) smo na agaroznem gelu zaznali šibko jakost sevanja UV-svetlobe.

Pomnoževanje z začetnima oligonukleotidoma EAV11/EAV12

Z začetnima oligonukleotidoma EAV11/EAV12 smo pomnoževali 467 bp dolg odsek na 3' koncu ORF1b (Slika 4-14).



Slika 4-14: Primer elektroforetske ločitve produktov pomnoževanja z RT-PCR in začetnima oligonukleotidoma EAV11/EAV12. + K – pozitivna kontrola (referenčni sev Bucyrus), - K – negativna kontrola (celična kultura RK-13). Vzorci semena: 1 – 990-01, 2 – 990-04, 3 – 213-04, 4 – 087-04, 5 – 031-04, 6 – 795-04. M – standard DNA velikosti 100 bp.

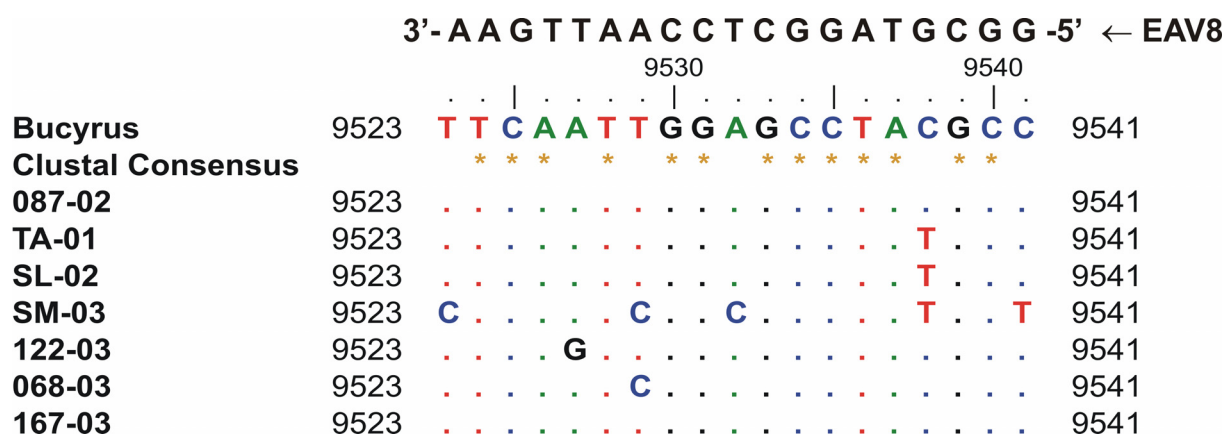
S parom EAV11/EAV12 smo virus EAV dokazali skupno v 38/40 (95 %) vzorcih semena. Pri 21 vzorcih semena smo pozitivne rezultate RT-PCR, ki smo jih dobili pri pomnoževanju z začetnima oligonukleotidoma EAV7/EAV8, še dodatno potrdili.

Od devetih vzorcev semena, pri katerih so bili z začetnima oligonukleotidoma EAV7/EAV8 rezultati reakcije RT-PCR negativni ali šibko pozitivni, le v dveh primerih (410/99-4, 410/99-7) tudi z drugim parom začetnih oligonukleotidov EAV11/EAV12 nismo določili RNA virusa EAV. V obeh vzorcih smo po dodatnem pomnoževanju odseka v genu za polimerazo (ORF1b) s parom začetnih oligonukleotidov EAV11/EAV8 dokazali RNA virusa EAV (Tabela 4-6).

Primerjava rezultatov, ki smo jih z RT-PCR z enim in drugim parom začetnih oligonukleotidov dobili pri vzorcih 990-01, 167-03, SM-02, SM-03, 085-03, 087-02 in TA-01 (negativni s parom EAV7/EAV8 in pozitivni s parom EAV11/EAV12), je nakazovala na neujemanje med tarčnimi nukleotidnimi zaporedji nekaterih slovenskih izolatov virusa EAV in protismiselnim začetnim oligonukleotidom EAV8 (Slika 3-1), katerega komplementarno nukleotidno zaporedje je v smeri 5'-3' popolnoma identično zaporedju referenčnega seva Bucyrus.

Analiza nukleotidnih zaporedij

Da bi ugotovili, ali med nukleotidnimi zaporedji slovenskih izolatov virusa EAV in začetnim oligonukleotidom EAV8 obstajajo neujemanja, smo produktom pomnoževanja odseka v ORF1b s parom začetnih oligonukleotidov EAV11/EAV12 določili nukleotidna zaporedja. Uporabili smo pristop direktnega sekvenciranja z začetnimi oligonukleotidi EAV11/EAV12. Ugotovljena nukleotidna zaporedja smo primerjali z zaporedjem referenčnega seva Bucyrus.



Slika 4-15: Poravnava nukleotidnih zaporedij v odseku gena za polimerazo, kamor se prilega začetni oligonukleotid EAV8.

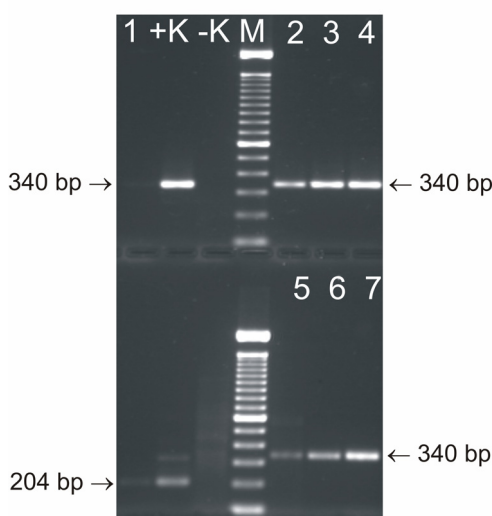
Na analiziranem odseku smo med nukleotidnimi zaporedji TA-01, SL-02, 122-03 in 068-03 ter EAV8 odkrili le eno razliko. Med nukleotidnima zaporedjema SM-03 in EAV8 pa smo vključno z zadnjim nukleotidom na 3' koncu odkrili kar pet razlik. Iz rezultatov sklepamo, da bi bila neujemanja lahko vzrok za neuspešno pomnoževanje, ko smo izbrani odsek v ORF1b pomnoževali s parom začetnih oligonukleotidov EAV7/EAV8. Te domneve pa ne podpirajo rezultati analize nukleotidnih zaporedij 087-02 in 167-03. Pri teh na analiziranem odseku nismo zasledili nobenih neujemanj, a je bilo pomnoževanje s parom EAV7/EAV8 kljub temu neuspešno.

Tudi pri zaporedjih 122-03 in 068-03 smo zasledili po eno neujemanje (9527 A>G in 9529 T>C), a je bilo v obeh primerih pomnoževanje s parom EAV7/EAV8 uspešno.

4.2.1.2.2 Pomnoževanje odseka v genu za nukleokapsido (ORF7)

Pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi EAV7.53F/EAV7.256R in EAV7.53F/12664N

Za pomnoževanje smo uporabili para začetnih oligonukleotidov EAV7.53F/EAV7.256R in EAV7.53F/12664N. Po pomnoževanju smo produkte RT-PCR dokazali z elektroforezo v agaroznem gelu (204 bp oziroma 340 bp dolge odseke ORF7) (Slika 4-16).



Slika 4-16: Primer elektroforetske ločitve produktov pomnoževanja z RT-PCR in začetnimi oligonukleotidi EAV7.53F/EAV7.256R in EAV7.53F/12664N. + K – pozitivna kontrola (referenčni sev Bucyrus), - K – negativna kontrola (celična kultura RK-13). Vzorci semena: 1 – 087-05, 2 – 087-02, 3 – 990-01, 4 – 168-01, 5 – SM-03, 6 – 990-03, 7 – 213-03. M – standard DNA velikosti 100 bp.

Pri pomnoževanju z začetnima oligonukleotidoma EAV7.53F/EAV7.256R smo virusno RNA določili v dveh vzorcih več (410/99-4 in 410/99-7) kot s pomnoževanjem z začetnima oligonukleotidoma EAV7.53F/12664N (Tabela 4-7). Pri analizi produktov pomnoževanja pri teh vzorcih smo v agaroznem gelu zaznali šibko pozitiven rezultat, zato smo v vseh nadaljnjih poskusih virusno nukleinsko kislino najprej pomnoževali s parom EAV7.53F/12664N, nato pa še s parom EAV7.53F/EAV7.256R (»semi-nested« PCR).

4.2.1.2.3 Primerjava občutljivosti klasičnih metod RT-PCR za pomnoževanje ORF1b in ORF7

Med preiskovanimi vzorci, pri katerih je bilo pomnoževanje ORF7 z obema paroma začetnih oligonukleotidov uspešno, je bilo pet vzorcev semena (990-01, 167-03, SM-02, SM-03 in 085-03), pri katerih je bilo pomnoževanje izbranega odseka v ORF1b s parom EAV7/EAV8 neuspešno. V omenjenih vzorcih smo virusno nukleinsko kislino dokazali s parom EAV11/EAV12.

Primerjava obeh klasičnih metod RT-PCR, pri katerih smo s paroma začetnih oligonukleotidov EAV11/EAV12 in EAV7.53F/12664N dokazovali različna gena (ORF1b oziroma ORF7) virusa EAV, je pokazala, da sta metodi enako občutljivi, saj so se rezultati med njima popolnoma ujemali (Tabela 4-6 in Tabela 4-7).

4.2.1.3 RT-PCR-ELISA

Pri izvajanju testa RT-PCR-ELISA smo uporabljali dve sondi, za ORF1b (EAVpr) in za ORF7 (EAV7.29P). S specifičnimi biotiniliranimi sondami smo še dodatno potrdili specifičnost produktov RT-PCR pri tistih vzorcih, ki so bili z metodo RT-PCR pozitivni. Pri vzorcih, ki na gelu niso pokazali pozitivnega signala, pa smo s specifičnimi sondami želeli povečati občutljivost dokazovanja virusnega genoma.

4.2.1.3.1 Hibridizacija s produkti pomnoževanja odseka v genu za polimerazo (ORF1b)

V osmih primerih (087-02, 087-03, 168-03, TA-01, 379/00-4, 068-03, 031-03 in 122-03) je bilo pomnoževanje z RT-PCR in parom EAV7/EAV8 uspešno, hibridizacija s sondo EAVpr v testu RT-PCR-ELISA pa ne. Pri omenjenih vzorcih so bile povprečne vrednosti optične gostote OD nižje od 0,221 (CO – 10 %) in so se gibale v območju od 0,094 (TA-01) do 0,22 (379/00-4) (Tabela 4-6).

Sprva smo menili, da je neujemanje med sondo in tarčno DNA poglavitni vzrok za negativne rezultate hibridizacije. Da to ni tako, je pokazala analiza nukleotidnih zaporedij, ki smo jih s sekvenciranjem izbranega odseka ORF1b določili pri vseh osmih vzorcih, ki smo jih uspeli pomnožiti tudi s parom EAV11/EAV12.

Pri večini vzorcev (087-02, 087-03, 168-03 in TA-01) znotraj mesta prilaganja sonde EAVpr (9342-9365) nismo našli nobenega variabilnega nukleotidnega mesta. V nukleotidnih zaporedjih treh vzorcev (379/00-4, 068-03 in 031-03) smo na mestu 9349 odkrili eno tranzicijo (T>C). Med nukleotidnima zaporedjema vzorca 122-03 in sondo EAVpr pa smo odkrili dve razliki, od tega eno tranzicijo na mestu 9343 (G>A) in drugo na mestu 9349 (T>C) (Tabela 4-6).

Pri vseh osmih vzorcih smo produkte pomnoževanja s parom EAV11/EAV12 ponovno testirali s testom RT-PCR-ELISA. Vsi produkti pomnoževanja so hibridizirali s sondo EAVpr s povprečnimi vrednostmi OD od 0,421 do 1,125 (Tabela 4-6). Njihove povprečne vrednosti OD so bile višje od vrednosti CO + 10 %, ki smo jih določili pri vsakem poskusu in so pri danih pogojih hibridizacije znašale (0,227; 0,274 in 0,241).

Manjše razlike v nukleotidnih zaporedjih slovenskih sevov EAV, kažejo na to, da so bili rezultati hibridizacije produktov pomnoževanja s parom EAV7/EAV8 lažno negativni.

S sondo EAVpr so hibridizirali tudi produkti pomnoževanja vzorcev (990-01, 167-03 in SM-03), ki smo jih pomnožili le s parom EAV11/EAV12.

Pri vzorcih (410/99-4 in 410/99-7), pri katerih produkta pomnoževanja nismo dobili ne s parom EAV7/8 in ne s parom EAV11/12, tudi hibridizacija s sondo EAVpr ni bila uspešna. V omenjenih vzorcih je bilo virusne RNA tako malo, da je tudi z imunsko-encimskim detekcijskim sistemom nismo zaznali.

V desetih primerih (087-04, 087-05, 213-02, 213-04, 213-05, 987-04, 068-04, 167-04, SM-02 in 085-03), pri katerih je bilo pomnoževanje s parom EAV11/EAV12 uspešno in so bili produkti pomnoževanja na gelu vidni, sonda EAVpr produktov ni zaznala. Njihove vrednosti OD so bile od 0,056 do 0,243.

Med nukleotidnimi zaporedji večine slovenskih izolatov na mestu prilaganja sonde EAVpr in referenčnim sevom Bucyrus nismo ugotovili večjih nukleotidnih razlik. Želeli smo ugotoviti, ali detergenti (Triton X[®]-100, Nonidet P40, Tween 20) v komercialnem kompletu Access RT PCR Core Reagents vplivajo na hibridizacijo. Test RT-PCR-ELISA smo izvedli z 18 produkti RT-PCR, ki smo jih po uspešnem pomnoževanju s parom EAV11/EAV12 najprej očistili iz gela. Pri vseh vzorcih smo dobili pozitivne rezultate z vrednostmi OD od 0,719 do 3,661 (Tabela 4-6).

4.2.1.3.2 Hibridizacija s produkti pomnoževanja odseka v genu za nukleokapsido (ORF7)

Pri 30 vzorcih od 38, pri katerih je bilo pomnoževanje odseka v ORF7 s parom začetnih oligonukleotidov EAV7.53F/12664N uspešno, smo specifičnost produktov RT-PCR z biotinilirano sondo EAV7.92P še dodatno potrdili. Sonda EAV7.92P ni zaznala neprečiščenih produktov RT-PCR pri osmih vzorcih (087-05, 213-03, 213-05, 068-03, 167-05, SM-03, 990-03 in LB-1-00). Neprečiščena produkta pomnoževanja sta le pri dveh vzorcih (SL-02 in SM-02) hibridizirala s sondo EAV7.92P, toda vrednosti OD sta bili nizki (0,303 in 0,370) (Tabela 4-7).

Postopek čiščenja produktov RT-PCR je bil ključen, da smo pri ponovnem testiranju v vseh desetih primerih zaznali močan barvni signal, ki je ustrezal vrednostim $OD \geq 1,285$.

Le pri enem izmed obeh vzorcev (410/99-7), ki sta bila pozitivna šele po dodatnem pomnoževanju v »semi-nested« PCR (410/99-4 in 410/99-7), je bila občutljivost detekcije z metodo RT-PCR-ELISA večja od detekcije produkta RT-PCR v agaroznem gelu. Produkt pomnoževanja vzorca 410/99-7, ki ga na gelu nismo videli, je z vrednostjo OD 0,513 v testu RT-PCR-ELISA reagiral pozitivno (Tabela 4-7).

4.2.1.4 Določanje nukleotidnih zaporedij odsekov v genih ORF1b in ORF7

Z določanjem nukleotidnih zaporedij genov ORF1b in ORF7 pri slovenskih sevih virusa EAV smo želeli ugotoviti, kateri izmed njiju je med različnimi sevi virusa EAV bolj ohranjen in primeren za načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sonde za metodo RT-PCR v realnem času.

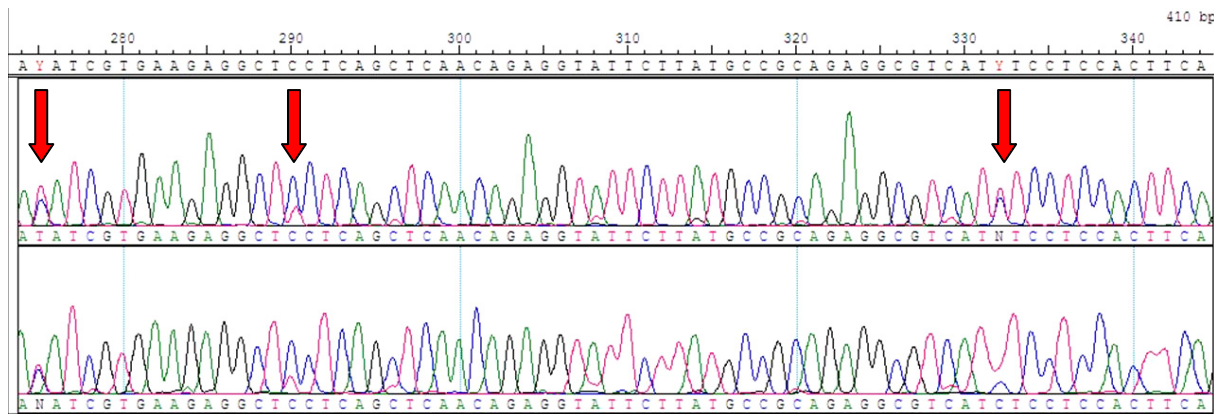
Želeli smo tudi ugotoviti filogenetske odnose med slovenskimi izolati in različnimi geografsko in časovno oddaljenimi sevi virusa EAV iz baze GenBank (Tabeli 3-4 in 3-5).

4.2.1.4.1 Nukleotidna zaporedja odseka v genu za polimerazo (ORF1b)

Nukleotidno zaporedje odseka ORF1b smo določili 15 sevom virusa EAV. Za vsak produkt RT-PCR smo imeli po dva kromatogramska zapisa. Prvi zapis je predstavljal nukleotidno zaporedje, ki smo ga pridobili z začetnim oligonukleotidom EAV11, drugi pa zapis, ki smo ga pridobili z začetnim oligonukleotidom EAV12. Na podlagi primerjave obeh zapisov smo

določili 348 nukleotidov dolga zaporedja, ki smo jih shranili v gensko bazo GenBank pod kodami od EF444897 do EF444908 in od EF566825 do EF566827.

Pri nekaterih sevih smo dobili več prekrivajočih se nukleotidnih zaporedij (Slika 4-17).



Slika 4-17: Primer primerjave dveh kromatogramov nukleotidnih zaporedij slovenskega seva EAV iz vzorca semena 990-03. Sev je z imenom SLOpol22 v genski banki GenBank dostopen pod kodo EF566826. Prikazana sta zapisa s končnega dela odseka v ORF1b. Zaporedji smo analizirali s programom Seqman. Mesta s prekrivajočimi vrhovi (275, 290 in 332) predstavljajo enotočkovne mutacije (Y = T ali C).

Na mestih z dvojno prekrivajočimi vrhovi smo se pri določitvi nukleotidnega zaporedja odločili za »višji« vrh (Slika 4-18).

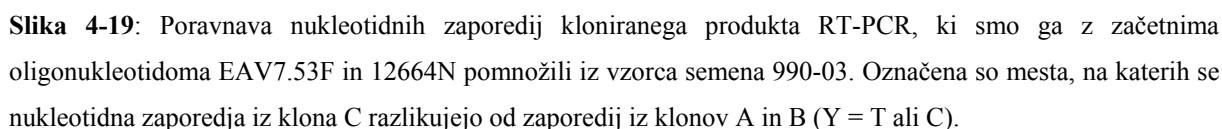
```

1: EF566826. Reports Equine arteritis ...[gi:148373466]
>gi|148373466|gb|EF566826.1| Equine arteritis virus isolate SLOpol22 viral replicase gene, partial cds
TATAAAATCATGATAGATTTCAGCCGTGTAGGCTTATGGTGTGGAGAAACGCGACTTTCTATATCCAGG
AGGGTGTGATATGGTCACAAACAGCACTAGCAGCTGTGTCTAAACTAGTTAAGGTGCCAGCCAATACACC
CGTTTCTTTTCATCTAGCATCAGGGTACAGAACCAACGCTTTGGTAGCGCCTCAGGCAGAGATTTCGAATT
GGAGCCTACGCCGCCGAATGGGCCTTGTCCACAGAACCGCCGCCGCTGGCTATGCGATTGTTCCGACGCT
ATATCGTGAAGAGGCTCTCAGCTCAACAGAGGTATTCTTATGCCGACAGGGCGTCATTCTCTCCACT
    
```

Slika 4-18: Nukleotidno zaporedje seva SLOpol22 iz GenBank v formatu FASTA. Z rdečo barvo so označeni nukleotidi, ki so v kromatogramu imeli »višji« vrh.

4.2.1.4.2 Nukleotidna zaporedja odseka v genu za nukleokapsido (ORF7)

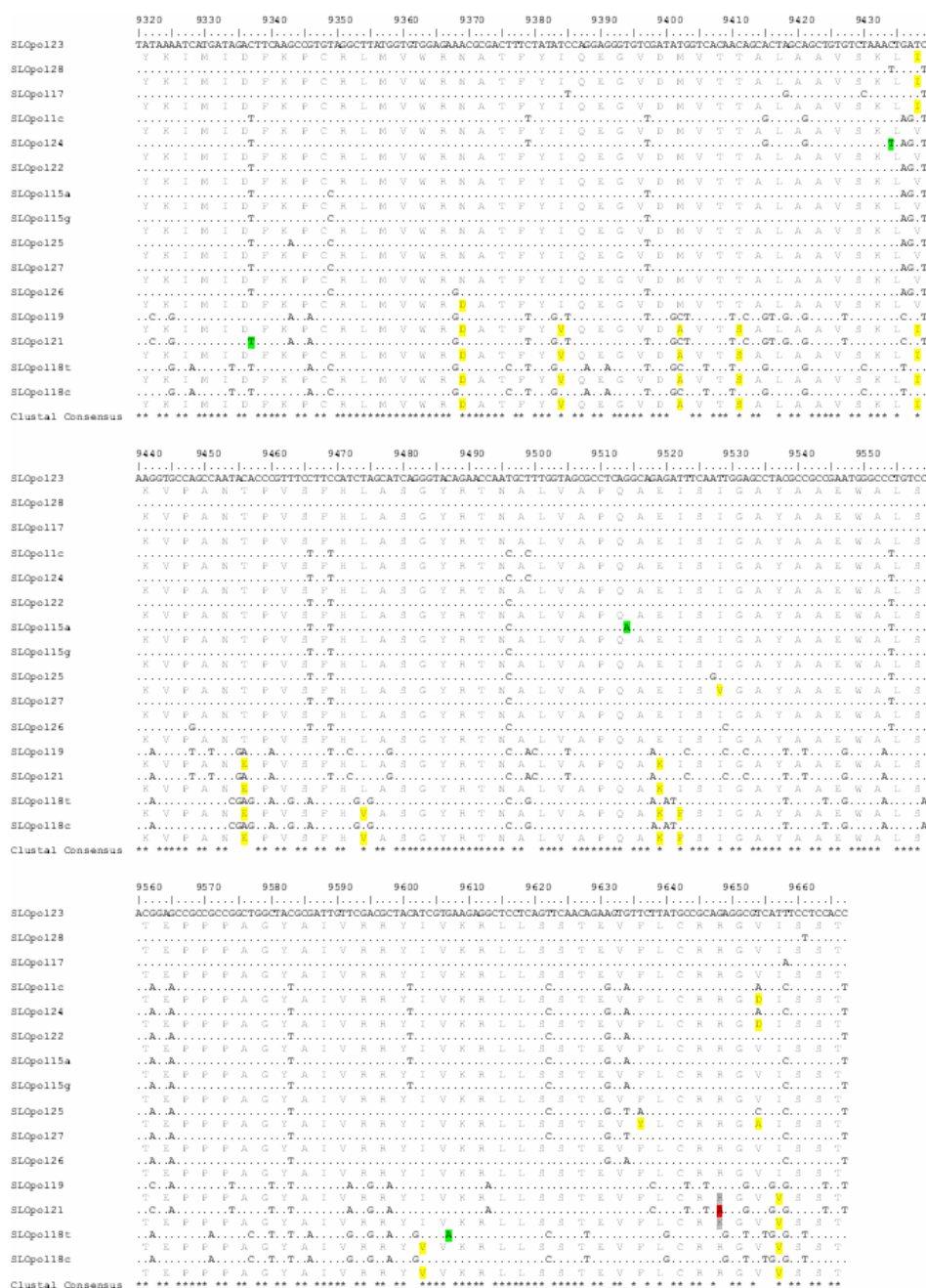
Pri večini vzorcev s postopkom direktnega sekvenciranja nismo uspeli določiti nukleotidnega zaporedja odseka v ORF7, zato smo produkt RT-PCR klonirali in mu nato določili nukleotidno zaporedje. Pri posameznih klonih smo ugotovili enotočkovne mutacije (Slika 4-19).



Določili smo 22 zaporedij dolgih 238 nukleotidov, ki so v genski banki GenBank dostopna pod kodami EF444881-EF444896 in EF566819-EF566824.

4.2.1.5.1 Odsek v genu za polimerazo (ORF1b)

Iz poravnave nukleotidnih zaporedij slovenskih sevov virusa EAV vidimo (Slika 4-20), da se zamenjave enega nukleotida najpogosteje pojavljajo na tretjem mestu v kodonu, sledijo jim zamenjave na prvem mestu, medtem ko so zamenjave na drugem mestu redke. Nukleotidna zaporedja smo prevedli v aminokislinska, dolga 116 aminokislin.



Slika 4-20: Primerjava delnih nukleotidnih zaporedij ORF1b slovenskih sevov virusa EAV. Poravnava 15 nukleotidnih zaporedij smo izvedli s programom Clustal X. Posamezna mesta v genomu so oštevilčena glede na genom referenčnega seva Bucyrus (NC_002532). Z zeleno barvo so označeni nukleotidi, ki se med paroma zaporedij iz istega vzorca semena razlikujejo, z rumeno barvo pa neujemanja med aminokislinskimi zaporedji. Z rdečo barvo je na drugem mestu v kodonu AAA zaporedja SLOpol19 označena nesinonimna nukleotidna zamenjava, ki je privedla do zamenjave aminokislina (K > R, označene s sivo barvo).

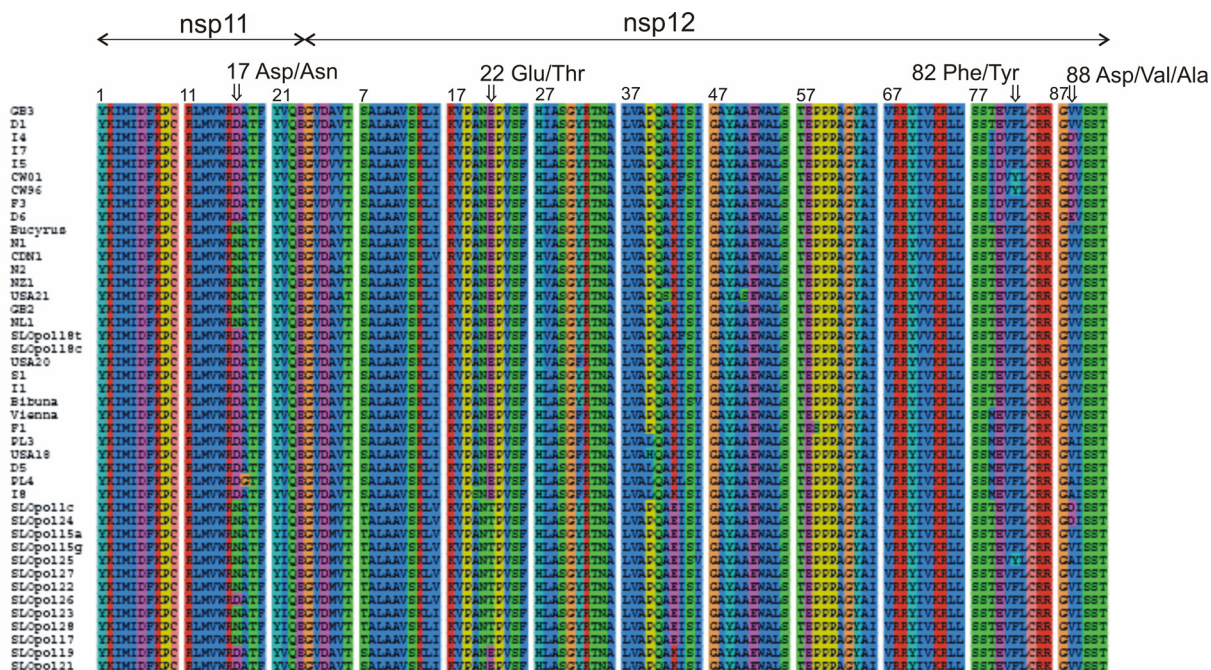
Iz primerjave nukleotidnih zaporedij SLOpol15a in SLOpol15g iz vzorca semena 379/00-4 ter SLOpol18t in SLOpol18c iz vzorca semena SL-02 vidimo, da se zaporedji posameznega para razlikujeta le za en nukleotid. Zaporedji SLOpol15a in SLOpol15g se razlikujeta na mestu 9514 (R = A ali G), zaporedji SLOpol18t in SLOpol18c pa na mestu 9607 (R = A ali G). Omenjene razlike ne vplivajo na aminokislinska zaporedja.

Med nukleotidnima zaporedjema SLOpol19 in SLOpol21 iz vzorcev semena SM-02 in SM-03, ki so jih žrebci SM, pasme finski kasač, odvzeli v razmiku približno enega leta, smo opazili dve nukleotidni zamenjavi. Tranzicija na tretjem mestu v kodonu GAT (9338 C>T) je tiha mutacija, medtem ko je tranzicija na drugem mestu v kodonu AAA (9648 G>A) nesinonimna mutacija, ki je privedla do zamenjave aminokisline arginin (R) v lizin (K). Obe aminokislini sta polarni.

Med nukleotidnima zaporedjema SLOpol1c in SLOpol24 iz vzorcev semena 087-02 in 087-03 žrebca 087, je v razmiku enega leta prišlo le do ene sinonimne nukleotidne zamenjave (9435 C>T).

Prevedena aminokislinska zaporedja odsekov nestrukturnih proteinov nsp11 (24 aminokislinskih ostankov) in nsp12 (92 aminokislinskih ostankov) se pri slovenskih sevih virusa EAV razlikujejo na 15 mestih. V nekaterih zaporedjih se na določenih mestih nahajajo aminokisline s povsem drugačnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi, ki jih pri ostalih zaporedjih iz poravnave ne opazimo. V aminokislinskih zaporedjih vzorcev SLOpol26, SLOpol19, SLOpol21, SLOpol18t in SLOpol18c je na 17. mestu v nsp11 polarna, nabita aminokislina aspartat (D), medtem ko je na enakem mestu pri drugih zaporedjih asparagin (N), ki ga uvrščamo v skupino polarnih, nenabitih aminokislin. Zaporedja SLOpol19, SLOpol21, SLOpol18t in SLOpol18c se od ostalih še dodatno razlikujejo v nestrukturnem proteinu nsp12, kjer je na 22. mestu polarna, nabita aminokislina glutamat (E), pri ostalih zaporedjih pa polarna, nenabita aminokislina treonin (T). V zaporedju SLOpol25 je na 82. mestu v nsp12 polarna, nenabita aminokislina tirozin (Y). Na 88. mestu na C-terminalnem koncu nsp12 pri zaporedjih SLOpol1c in SLOpol24 se nahaja polarna, nabita aminokislina aspartat (D). Pri vseh ostalih zaporedjih na omenjenih mestih (82 in 88) najdemo aminokisline fenilalanin (F) oziroma valin (V) ali alanin (A), ki jih uvrščamo med nepolarne aminokisline. Aspartat (D) ali asparagin (N) na 17. mestu, fenilalanin (F) ali tirozin (Y) na 82. mestu in aspartat (D), valin (V) ali alanin (A) na 88. mestu v nsp11 so aminokisline, ki se pojavljajo tudi pri izolatih iz drugih genetskih skupin. Treonin (T) na 22. mestu v nsp12 je značilen le za

slovenske izolate virusa EAV, izjema so zaporedja SLOpol18t, SLOpol18c, SLOpol19 in SLOpol21, ki imajo tako kot vsi izolati iz genske banke na tem mestu glutamat (E) (Slika 4-21).



Slika 4-21: Poravnava prevedenih aminokislinskih zaporedij nsp11 in nsp12. Poravnano 43 zaporedij smo izvedli s programom Clustal X in jo prikazali s programom Seaview. Barva aminokislin ustreza fizikalno-kemijskim lastnostim njihovih stranskih verig pri fiziološkem pH = 7,4.

Legenda:

- KR – hidrofilne, polarne, pozitivno nabite
- AFILMVW – hidrofobne, nepolarne
- NQST – hidrofilne, polarne, nenabite
- HY – aromatske stranske verige
- C – hidrofilna, polarna, nenabita, -SH tiolna skupina
- DE – hidrofilne, polarne, negativno nabite
- P – aromatska stranska veriga, hidrofobna, nepolarna
- G – hidrofobna, nepolarna, majhna

Figure 1: Schematic representation of protein structure prediction. The figure shows four examples of protein sequences with predicted secondary structure elements (SSEs) and confidence scores. Each example includes a 'Conf:' bar at the top showing confidence scores for different SSEs, a 'Pred:' bar showing the predicted SSEs, and the corresponding amino acid sequence (AA). The sequences are: 1) CHHHHHHHHHHHHHHECCCCCEEEEECCCCCCECC, 2) CCHHHHHHHHHHHHHHECCCCCEEEEECCCCCCECC, 3) CCEHHHHHHHHHHHHHCCCCCCHHHHHHHHHHHHCCCE, and 4) EEEEECCCCCCC. The sequences are aligned with a reference sequence: GVDMVTTLAALAVSKLVKVPANTPVSFHLASGYRTNALVAP, GVDAVTSALAAVSKLIKVPANEPVVSFHVASGYRTNALVAP, QAEISIGAYAAEWALSTEP PPAGYAIVRRYIVKRLLSSTE, and VFLCRRRGDISSST. The legend indicates: Green bar = Vijačnica α , Yellow bar = List β , Blue bar = Naključno navitje, and Blue bar with '+' = Zanesljivost napovedi.

Dobljena rezultata se za obe aminokislinski zaporedji SLOpol1c in Bucyrus popolnoma skladata. Iz tega sklepamo, da aminokislina treonin (T) v zaporedju SLOpol1c ne vpliva na spremembo sekundarne strukture, saj na sliki 4-22 vidimo, da je v tem delu proteina naključno navitje napovedano z visoko stopnjo zanesljivosti za obe primerjani zaporedji.

4.2.1.5.2 Odsek v genu za nukleokapsido (ORF7)

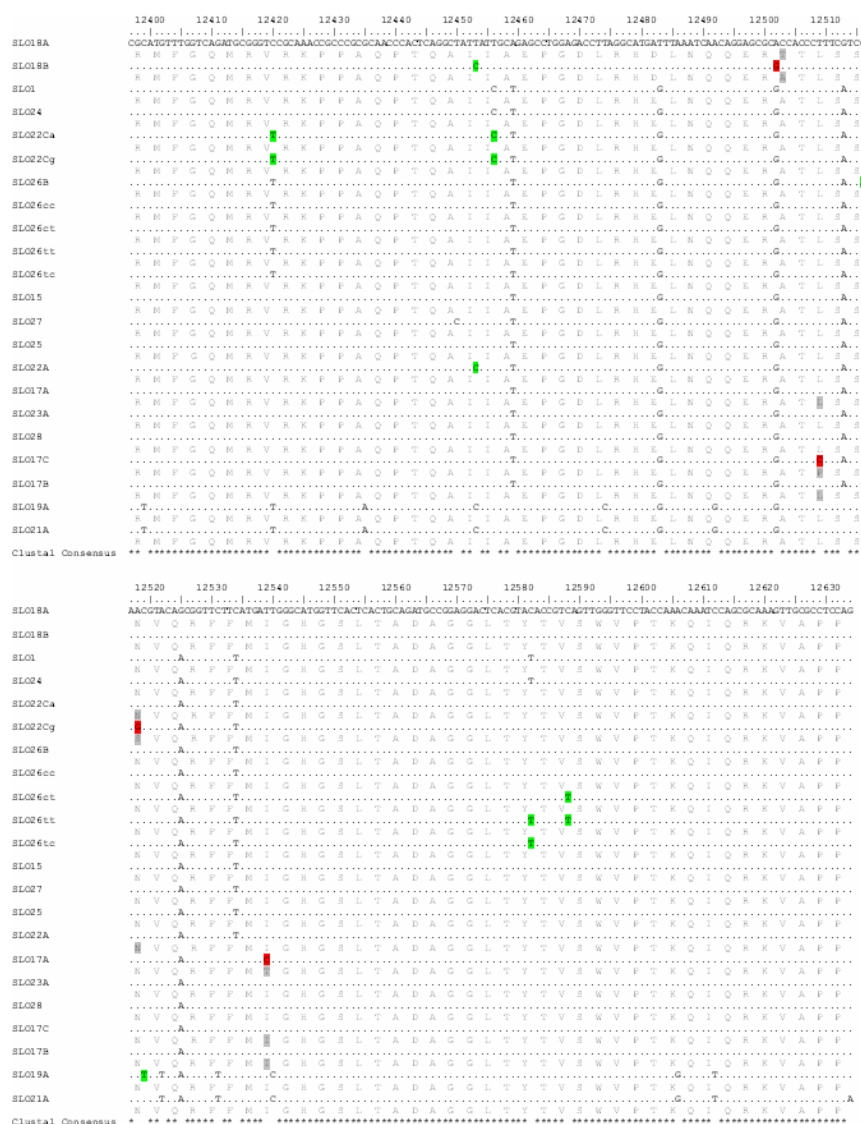
Nukleotidni zaporedji SLO1 in SLO24 iz vzorcev semena 087-02 in 087-03 sta popolnoma identični. Tudi seva virusa EAV iz vzorcev semena 379/00-4 in 122-03 sta na ravni nukleotidnih zaporedij SLO15 in SLO25 identična. Ravno tako smo popolno ujemanje

ugotovili med nukleotidnimi zaporedji SLO23A, SLO17B in SLO28 iz vzorcev semena 213-03, LB-1-00 in 168-03.

Analiza prevedenih 79 aminokislinskih ostankov je razkrila, da med zaporedji virusov iz istih vzorcev semena obstajajo neujemanja v aminokislinskih ostankih. Aminokislinski zaporedji SLO18A in SLO18B iz vzorca semena SL-02 se razlikujeta za en aminokislinski ostanek. V aminokislinskem zaporedju SLO18A je polarna, nabita aminokislina treonin (T), medtem ko je na enakem mestu pri SLO18B nepolarna aminokislina alanin (A).

Nukleotidna zaporedja klonov SLO22Ca, SLO22A in SLO22Cg iz istega vzorca 990-03 se razlikujejo na štirih mestih. Neujemanje na drugem mestu v kodonu A(12518 A>G)C se odraža tudi v različnih aminokislinskih zaporedjih. Kodon AAC v zaporedjih SLO22Ca in SLO22A kodira aminokislino asparagin (N), medtem ko kodon AGC v zaporedju SLO22Cg kodira aminokislino serin (S). Obe aminokislini razvrščamo v skupino polarnih, nenabitih aminokislin.

Med aminokislinskima zaporedjema klonov SLO17A in SLO17C iz vzorca LB-1-00 smo neujemanje opazili na dveh mestih. Neujemanje nukleotidov na mestu 12509 T>C in mestu 12539 T>C se odraža tudi v prevedenih aminokislinskih zaporedjih. Pri obeh klonih opazimo nepolarni aminokislini levцин (L) in prolin (P), medtem ko se neujemanje med nukleotidi na drugem mestu v kodonu A(12539 T>C)T odraža z različno fizikalno-kemijsko lastnostjo aminokislinskih ostankov. V zaporedju SLO17A opazimo polarno, nenabito aminokislino treonin (T), na istem mestu pa je v zaporedju SLO17C nepolarna aminokislina izolevцин (I).

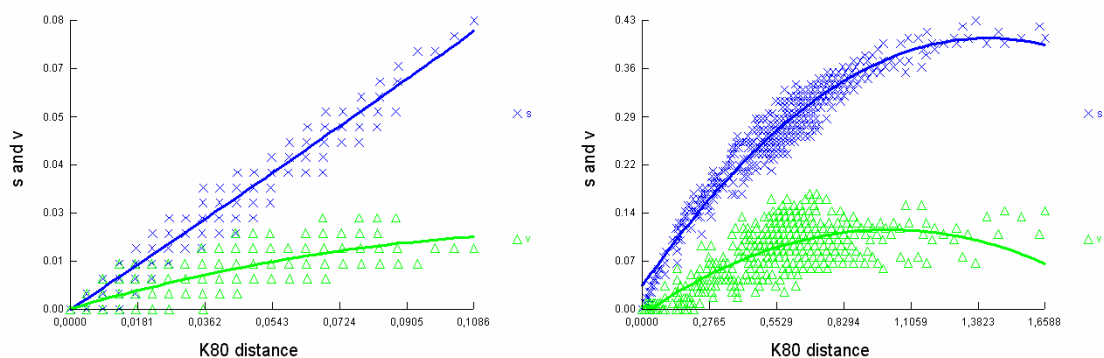


Slika 4-23: Primerjava delnih nukleotidnih zaporedij ORF7 slovenskih sevov virusa EAV. Poravnava 22 nukleotidnih zaporedij smo izvedli s programom Clustal X. Posamezna mesta v genomu so oštevilčena glede na genom referenčnega seva Bucyrus (NC_002532). Z zeleno barvo so označeni nukleotidi, ki se med zaporedji iz istih vzorcev semena razlikujejo. S sivo barvo so označena neujemanja med aminokislinskimi ostanki.

4.2.1.6 Ugotavljanje evlucijskih odnosov med sevi virusa EAV

4.2.1.6.1 Filogenetska analiza ORF1b

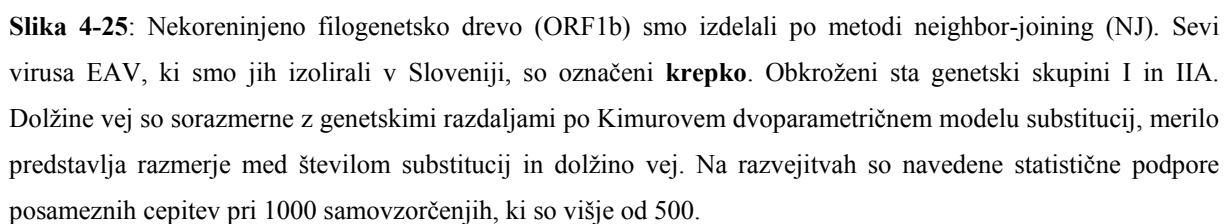
Filogenetski drevesi smo izračunali na podlagi 43 poravnanih nukleotidnih zaporedij, ki so vključevala tudi 15 zaporedij virusov EAV iz vzorcev semena okuženih žrebcev v Sloveniji. S programom DAMBE smo preverili, ali je Kimurov dvoparametrični model (K80), ki upošteva, da so tranzicije bolj pogoste kot transverzije, dober približek napovedi poteka evolucije virusa EAV.

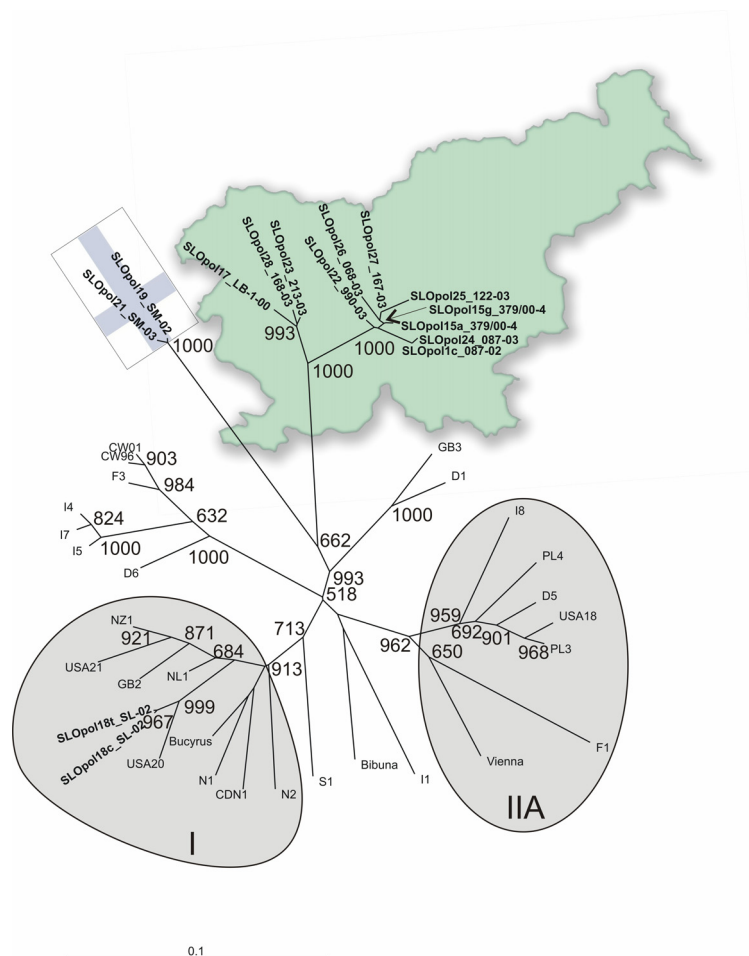


Slika 4-24: Grafa prikazujeta razlike med posameznimi pari nukleotidnih zaporedij, ki so nastale zaradi tranzicij in transverzij na prvem in drugem mestu v kodonih (levo) in na tretjem mestu v kodonih (desno). »s« je delež tranzicijskih razlik med zaporedjema, »v« je delež transverzijijskih razlik med zaporedjema in »K80 distance« je genetska, evolucijska razdalja.

Iz grafa na levi razberemo, da imata prvo in drugo mesto v kodonih »ohranjen« filogenetski signal, saj z naraščanjem genetske razdalje narašča tudi število nukleotidnih zamenjav. Na tretjem mestu v kodonih (graf desno) pa z večanjem genetskih razdalj ($> 0,8294$) med bolj divergentnimi zaporedji, tranzicije in transverzije dosežejo plato in je zato informativnost teh mest vprašljiva (Slika 4-24).

Iz obeh grafov je razvidno, da je število nukleotidnih zamenjav največje na tretjem mestu v kodonih, kar kaže na to, da mutacije niso enakomerno porazdeljene po vseh mestih. Najhitreje se spreminjajo tretja mesta v kodonih, zaradi česar pride na teh mestih pri večjih genetskih razdaljah do nasičenja s substitucijami.





Slika 4-26: Nekoreninjeno filogenetsko drevo (ORF1b) smo izdelali po metodi Fitch-Margoliash (FM). Sevi virusa EAV, ki smo jih izolirali v Sloveniji, so označeni **krepko**. Obkroženi sta genetski skupini I in IIA. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po Kimurovem dvoparametričnem modelu substitucij, merilo predstavlja razmerje med številom substitucij in dolžino vej. Na razvejitevah so navedene statistične podpore posameznih cepitev pri 1000 samovzorčenjih, ki so višje od 500.

Filogenetski drevesi smo izdelali z dvema različnima metodama (Sliki 4-25 in 4-26) in ugotovili, da se topologiji obeh med seboj ujemata. Na obeh so nukleotidna zaporedja SLOpol1c, SLOpol15a, SLOpol15g, SLOpol22, SLOpol24, SLOpol26, SLOpol25 in SLOpol27 združena v eno monofiletsko skupino, zaporedja SLOpol17, SLOpol23 in SLOpol28 se uvrščajo v drugo monofiletsko skupino, zaporedji SLOpol19 in SLOpol21 se združujeta v tretjo monofiletsko skupino z visokimi statističnimi podporami.

Znotraj skupine slovenskih zaporedij je nekoliko nižjo podporo dobila skupina zaporedij SLOpol17, SLOpol23 in SLOpol28 (991 na drevesu NJ in 993 na drevesu FM) iz vzorcev semena 213-03 in 168-03 dveh žrebcev lipicanske pasme iz reje A na slovenskem Krasu, ki sta bila ob jemanju semena leta 2003 stara 6 in 7 let in sta mlajša od žrebcev 068, 087, 990, 122 in 167, katerih zaporedja uvrščamo v prvo skupino.

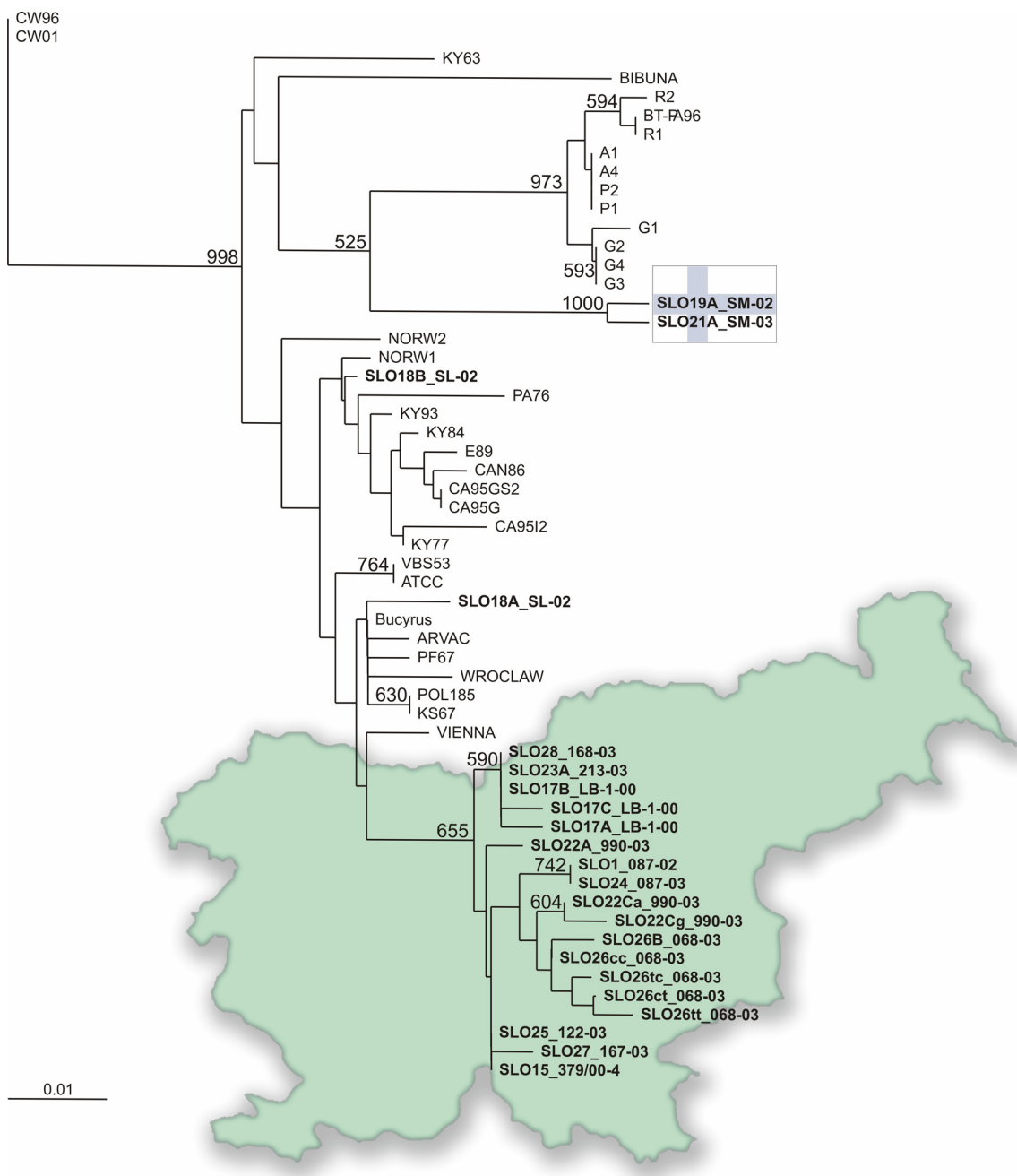
Vzorci se združujejo v skupine glede na njihov zemljepisni izvor. Zaporedja SLOpol1c – SLOpol28, ki smo jih pridobili iz vzorcev semena žrebcev iz reje A, tvorijo posebni monofiletski skupini. Zaporedja iz omenjenih skupin se očitno ločijo od zaporedij SLOpol19 in SLOpol21 žrebca SM, ki se je leta 1988 rodil v Helsinkih in so ga leta 1992 uvozili iz Finske v Slovenijo.

Nukleotidna zaporedja sevov virusa EAV iz reje A (kraški sevi) (SLOpol1c, SLOpol15a, SLOpol15g, SLOpol22, SLOpol24, SLOpol26, SLOpol25, SLOpol27, SLOpol17, SLOpol23 in SLOpol28) smo primerjali z zaporedjema SLOpol19 in SLOpol21. Izkazalo se je, da so si zaporedja iz reje A med seboj od 93,1- do 99,7-odstotno identična, medtem ko so si z zaporedjema iz vzorcev semena finskega kasača SM (SLOpol19 in SLOpol21) od 82,2- do 83,6-odstotno identična.

Vsa zaporedja kraških sevov in zaporedja iz vzorcev semena finskega kasača si delijo najbližjega skupnega prednika z izolatoma GB3 (96/7982) in D1 (W877). Izolat GB3 so izolirali leta 1996 v Veliki Britaniji, izolat D1 pa leta 1994 v Nemčiji. Kljub sorodnosti pa obe monofiletski liniji sevov in linija sevov iz Finske kažejo na relativno dolgo obdobje samostojnega in ločenega razvoja od GB3 in D1.

Nukleotidni zaporedji iz semena ameriškega kasača SL (SLO18t in SLO18c) sodita v skupino I, ki zajema predvsem izolate iz področja Severne Amerike.

4.2.1.6.2 Filogenetska analiza ORF7



Slika 4-27: Nekoreninjeno filogenetsko drevo (ORF7) smo izdelali po metodi neighbor-joining (NJ). Sevi virusa EAV, ki smo jih izolirali v Sloveniji, so označeni **krepko**. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po Kimurovem dvoparametričnem modelu substitucij, merilo predstavlja razmerje med številom substitucij in dolžino vej. Na razvejitvah so navedene statistične podpore posameznih cepitev pri 1000 samovzorčenjih, ki so višje od 500.

Delna nukleotidna zaporedja kraških sevov virusa EAV se po metodi povezovanja sosedov ravno tako združujejo v svoj klad (Slika 4-27), ki pa je statistično slabše podprt (655) kot na drevesih ORF1b. Med posameznimi pari delnih nukleotidnih zaporedij ORF7 kraških sevov je identičnost nukleotidov od 98,3- do 100-odstotna, medtem ko je razlika med nukleotidnimi zaporedji kraških sevov in izolatom Vienna iz Avstrije nekoliko večja. Na nukleotidnem nivoju so slovenska zaporedja od 97,1- do 98,3-odstotno identična s starim evropskim virusom Vienna, ki so ga izolirali leta 1964.

S filogenetsko analizo ORF7 smo z visoko statistično podporo (1000) še dodatno potrdili obstoj samostojne monofiletske linije iz Finske. Nukleotidni zaporedji SLO19A in SLO21A sta najbolj sorodni zaporedjem klonov A1 in A4 ter zaporedjem klonov G1-G4 iz semena dveh perzistentnih izločevalcev A in G, ki so ju leta 1995 uvozili iz Evrope v ZDA. Žrebec A je leto kasneje v reji toplokrvnih konj v Pensilvaniji povzročil izbruh KAK. Od 23 konjev, pri katerih se je KAK pojavil v klinično zaznavni obliki, sta žrebca P in R postala PI. Virus BT so izolirali iz pljuč poginulega žrebčka (Balasuriya in sod., 1999a).

Zaporedji SLO18A in SLO18B sta homologni z izolati virusa EAV iz Severne Amerike. Zaporedji smo dokazali v vzorcu semena ameriškega kasača SL, ki se je z virusom EAV okužil predvidoma že v tujini in so ga leta 1992 uvozili iz New Jerseyja v Slovenijo. Iz tega lahko sklepamo, da ameriški genotip virusa EAV v Sloveniji ni avtohton, temveč so ga rejci kasaških konj uvozili iz tujine.

Protismiselni začetni oligonukleotid EAV-R ima eno degenerirano mesto 12435 (Y = C ali T) in omogoča prepoznavo vseh sekvenc, ki smo jih določili v vzorcih semena pri slovenskih

žrebcih. S sekvenčno analizo smo v zaporedjih SLO19A in SLO21A iz vzorca semena SM-02 ugotovili, da med protismiselnim začetnim oligonukleotidom EAV-R in omenjenima zaporedjema na degeneriranem mestu 12435 obstaja eno neujemanje (G>A). Kljub enemu neujemanju je bilo pomnoževanje izbranega odseka ORF7 virusa EAV z RT-PCR v realnem času uspešno (Tabeli 4-7 in 4-8).

4.2.1.7.2 Določanje nukleinske kisline virusa EAV v vzorcih semena

Z metodo RT-PCR v realnem času smo nukleinsko kislino virusa EAV dokazali v vseh štiridesetih vzorcih semena (Tabela 4-7). Sonda EAVMGBpr je specifično prepoznala vsa tarčna zaporedja slovenskih sevov virusa EAV v vzorcih semena, v katerih smo celokupno RNA določili pri vrednostih Ct manjših od 27.

Izjema sta vzorca semena 410/99-4 in 410/99-7 z vrednostmi Ct od 35,19 do 38,14 (Tabela 4-7). V obeh primerih je bil rezultat reakcije s klasično metodo RT-PCR negativen. Pomnoževanje izbranega odseka v ORF7 je bilo uspešno šele po dodatnem pomnoževanju s »semi-nested« PCR, iz tega bi lahko sklepali, da je koncentracija virusa EAV v teh vzorcih semena majhna.

Ujemanje rezultatov, ki smo jih dobili z metodo RT-PCR v realnem času in metodo RT-PCR-ELISA na prečiščenih produktih RT-PCR, je bilo 100-odstotno.

Ponovljivost reakcij RT-PCR znotraj posameznih testov smo preverjali v dveh ponovitvah. Rezultati v tabeli 4-8 prikazujejo standardni odklon (SD) in koeficient variacije (KV) izračunan iz vrednosti Ct obeh ponovitev, ki smo ju zabeležili za posamezen vzorec semena.

Tabela 4-8: Rezultati pomnoževanja odseka v ORF7 z RT-PCR v realnem času.

Oznaka žrebca	Leto vzorčenja	Oznaka vzorca semena	RT-PCR v realnem času (EAV7.53F/EAV-R in EAVMGBpr)		
			Vrednost Ct ^a		
			Povprečje	SD	KV (%)
087	2002	087-02	25,68	0,27	1,05
	2003	087-03	25,65	0,13	0,52
	2004	087-04	20,98	0,33	1,55
	2005	087-05	30,85	1,03	3,32
		Vrednost Ct ^b	25,79	4,0	15,63
213	2002	213-02	25,72	0,37	1,46
	2003	213-03	17,53	0,29	1,65
	2004	213-04	19,38	0,59	3,06
	2005	213-05	25,86	0,16	0,60
		Vrednost Ct ^b	22,12	4,3	19,45
990	2001	990-01	18,71	0,15	0,79
	2002	990-02	17,68	0,40	2,28
	2003	990-03	18,68	0,16	0,87
	2004	990-04	13,45	0,18	1,37
		Vrednost Ct ^b	17,10	2,48	14,48
168	2001	168-01	18,2	0,03	0,16
	2003	168-03	21,65	0,06	0,26
		Vrednost Ct ^b	19,91	2,4	12,11
987	2001	987-01	19,3	0,11	0,59
	2004	987-04	14,2	0,06	0,4
		Vrednost Ct ^b	16,75	3,61	21,53
068	2003	068-03	21,17	0,04	0,17
	2004	068-04	15,53	0,19	1,23
		Vrednost Ct ^b	18,35	3,99	21,73
167	2003	167-03	20,75	0	0
	2004	167-04	14,51	0,04	0,29
	2005	167-05	21,47	0,15	0,69
		Vrednost Ct ^b	18,91	3,83	20,24
031	2003	031-03	16,32	0,38	2,34
	2004	031-04	13,27	0,17	1,28
		Vrednost Ct ^b	14,8	2,16	14,58
SL	2002	SL-02	24,55	0,17	0,7
	2003	SL-03	18,8	0,06	0,3
		Vrednost Ct ^b	21,68	4,07	18,76
SM	2002	SM-02	27,09	0,11	0,42
	2003	SM-03	25,99	0,28	1,06
		Vrednost Ct ^b	26,54	0,78	2,93

^a Vsako RNA iz posameznega vzorca semena smo analizirali v dveh ponovitvah. Iz dveh ponovitev znotraj ene same reakcije (angl. intra-assay) smo za vsak vzorec semena izračunali povprečno vrednost Ct, SD in KV.

^b Za zaporedne vzorce semena so povprečne vrednosti Ct, SD in KV izračunane iz različnih, neodvisnih reakcij RT-PCR v realnem času.

Rezultati kažejo, da je bila ponovljivost reakcije RT-PCR v realnem času med identičnima vzorcema celokupne RNA znotraj posameznega testa dobra. Standardni odklon (SD) je za vse vzorce semena zavzemal vrednosti od 0,03 do 1,03, medtem ko je bil koeficient variacije (KV) manjši od 3,32 %.

Za zaporedne vzorce semena, ki so jih posameznim PI odvzeli v razmiku približno enega leta, je bil KV pod 22 %. To pa pomeni, da je koncentracija virusa EAV v semenu PI dokaj konstantna.

4.2.1.7.3 Meja detekcije in učinkovitost pomnoževanja odseka genoma referenčnega seva Bucyrus

Rezultate RT-PCR v realnem času, ki smo jih dobili iz razredčin celokupne RNA z znanimi koncentracijami virusa, smo uporabili za izdelavo standardne linearne regresijske krivulje. Vsako razredčino RNA (10^{-1} do 10^{-7}) smo v eni reakciji analizirali v dveh ponovitvah. Učinkovitost pomnoževanja posamezne reakcije smo izračunali iz naklona standardne krivulje.

Najboljša učinkovitost pomnoževanja (1,069) je bila v primeru, ko je bil naklon krivulje – 3,1675, vrednost koeficienta linearne krivulje R^2 pa je znašala 0,999 (Slika 4-29 C).

Referenčnemu sevu Bucyrus smo določili koncentracijo s štetjem plakov. Koncentracija referenčnega seva Bucyrus je znašala $6,8 \times 10^6$ PFU/ml. Razredčina 10^{-7} je s preračunano koncentracijo virusa 1,7 PFU/ml predstavlja teoretično spodnjo mejo detekcije.

4.2.1.8 Primerjava molekularnih metod za detekcijo odseka v ORF7

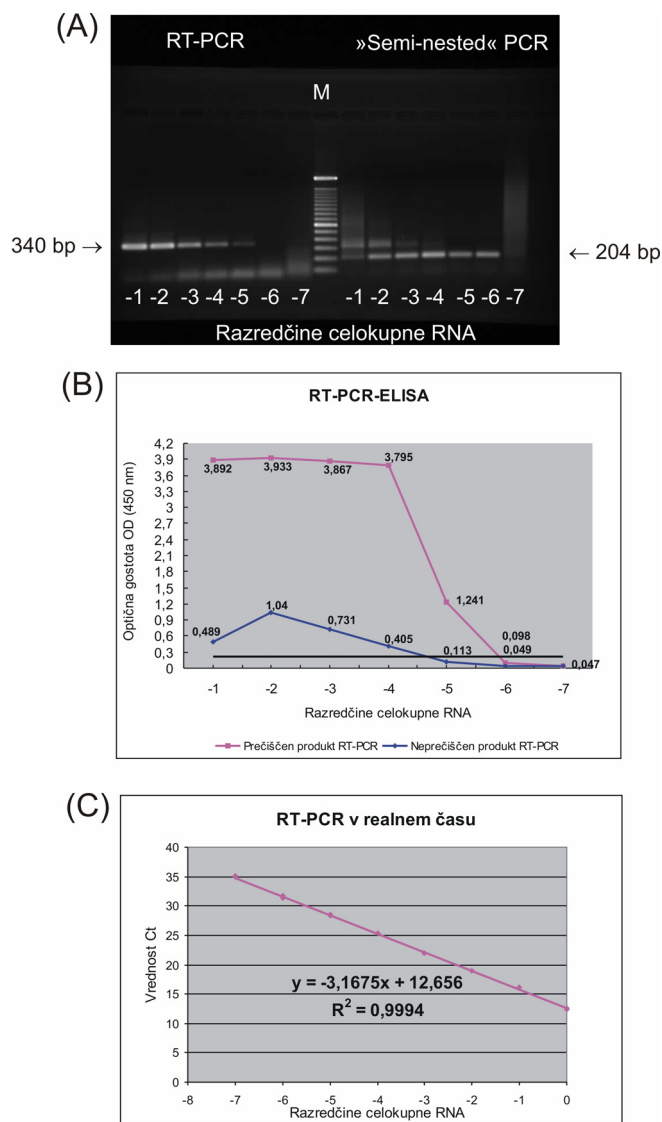
Primerjali smo občutljivost klasične metode RT-PCR, »semi-nested« PCR, metode RT-PCR-ELISA in RT-PCR v realnem času.

Velikost produktov RT-PCR, ki smo jih s parom začetnih oligonukleotidov EAV7.53F/12664N v reakciji RT-PCR uspešno pomnožili, smo preverili z elektroforezo v agaroznem gelu. Produkta pričakovane velikosti 340 bp smo določili do razredčine 10^{-5} , ki ustreza preračunani koncentraciji referenčnega seva Bucyrus 170 PFU/ml. Z dodatnim pomnoževanjem z metodo »semi-nested« PCR, smo s parom začetnih oligonukleotidov EAV7.53F/EAV7.256R referenčni sev določili do razredčine 10^{-6} (17 PFU/ml) (Slika 4-29 A).

Produkta RT-PCR smo določali tudi s hibridizacijsko metodo RT-PCR-ELISA. Pri dokazovanju neprečiščenih produktov se je barvna reakcija substrata razvila le do razredčine 10^{-4} , ki ji je ustrezala vrednost OD 0,405 (Slika 4-29 B).

Pri hibridizaciji očiščenih produktov RT-PCR smo dosegli vsaj tolikšno občutljivost kot s klasično metodo RT-PCR (Slika 4-29 B).

Primerjava občutljivosti obeh hibridizacijskih metod je pokazala, da je bila metoda RT-PCR v realnem času za 2 reda velikosti ($2 \log_{10}$) bolj občutljiva od metode RT-PCR-ELISA (Slika 4-29 C).



Slika 4-29: Primerjava molekularnih metod za dokazovanje razredčin nukleinske kisline referenčnega seva Bucyrus (prikazane so logaritemske vrednosti razredčin celokupne RNA od -1 do -7). (A) Dokazovanje produktov RT-PCR (340 bp) in »semi-nested« PCR (204 bp) v agaroznem gelu, M – standard DNA velikosti 100 bp. (B) RT-PCR-ELISA (prikazane so vrednosti OD za produkte RT-PCR pred in po čiščenju iz agaroznega gela). (C) RT-PCR v realnem času (v enačbi linearne regresijske krivulje sta prikazana naklon krivulje in koeficient R^2).

4.2.2 Dokaz genoma virusa EAV v brisih sečnice

Skupno smo pregledali 66 vzorcev brisov sečnice naključno izbranih serološko pozitivnih žrebcev iz reje A. Pomnoževanje odseka v ORF7 s klasično metodo RT-PCR v večini primerov ni bilo uspešno, zato smo se v nadaljevanju osredotočili na 10 PI, pri katerih smo v vzorcih semena po večkratnih odvzemih dokazali virus EAV. Njihove vzorce semena in brisov sečnice smo uporabili za iskanje najprimernejše metode izolacije virusne RNA.

4.2.2.1 Primerjava metod za izolacijo in dokazovanje RNA referenčnega seva Bucyrus

Med seboj smo primerjali tri metode za izolacijo celokupne RNA, reagent TRIzol[®] in kompleta reagentov QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit ter MagMax[™] Viral RNA Isolation Kit. Uspešnost izolacije celokupne RNA iz vzorcev smo preverjali s pomnoževanjem odseka v ORF7.

4.2.2.1.1 Klasična metoda RT-PCR

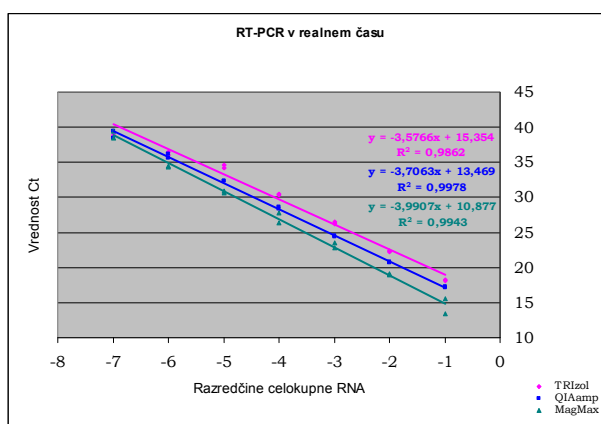
Kot najbolj učinkovit se je za izolacijo celokupne RNA izkazal komercialni komplet reagentov MagMax[™] Viral RNA Isolation Kit, ki nam je omogočil, da smo s klasično metodo RT-PCR določili virusno RNA do razredčine 10^{-6} . Temu sta sledila komplet QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit in reagent Trizol. Rezultati kažejo, da smo z omenjenima metodama uspešno izolirali in pomnožili virusno RNA do razredčine 10^{-5} . Izkoristek izolirane RNA je bil nekoliko slabši s Trizolom. Produkta RT-PCR iz razredčin 10^{-1} do 10^{-4} smo na agaroznem gelu videli kot ostre pasove, medtem ko je bila intenziteta sevanja UV-svetlobe produkta RT-PCR iz razredčine 10^{-5} šibka (Slika 4-30).



Slika 4-30: Elektroforetska ločitev produktov RT-PCR iz serije sedmih desetkratnih razredčin celokupne RNA (prikazane so logaritemske vrednosti razredčin od –1 do –7) v 1,8-odstotnem agaroznem gelu. Celokupno RNA smo iz referenčnega seva Bucyrus izolirali s tremi različnimi metodami.

4.2.2.1.2 RT-PCR v realnem času

Po primerjavi standardnih krivulj smo ugotovili, da je bila učinkovitost reakcije najboljša (0,904) v primeru izolacije RNA s Trizolom. Pri dokazovanju virusne RNA, ki smo jo izolirali s komercialnima kompletoma QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit in MagMax[™] Viral RNA Isolation Kit, sta naklona linearnih krivulj znašala –3,71 in –3,99 in učinkovitosti obeh reakcij sta bili posledično manjši (0,861 in 0,781) (Slika 4-31).



Slika 4-31: Standardne linearne krivulje iz rezultatov RT-PCR v realnem času, ki smo jih dobili za serijo razredčin celokupne RNA (prikazane so logaritemske vrednosti razredčin od –1 do –7), izolirane iz referenčnega seva Bucyrus s tremi metodami. Učinkovitost pomnoževanja smo izračunali po formuli, opisani v točki 3.2.4.7.

Območje relativne kvantifikacije je bilo za vse tri serije razredčin enako. Z mejo detekcije pri razredčini 10^{-7} je obsegalo 7 logaritemskih območij (od –1 do –7).

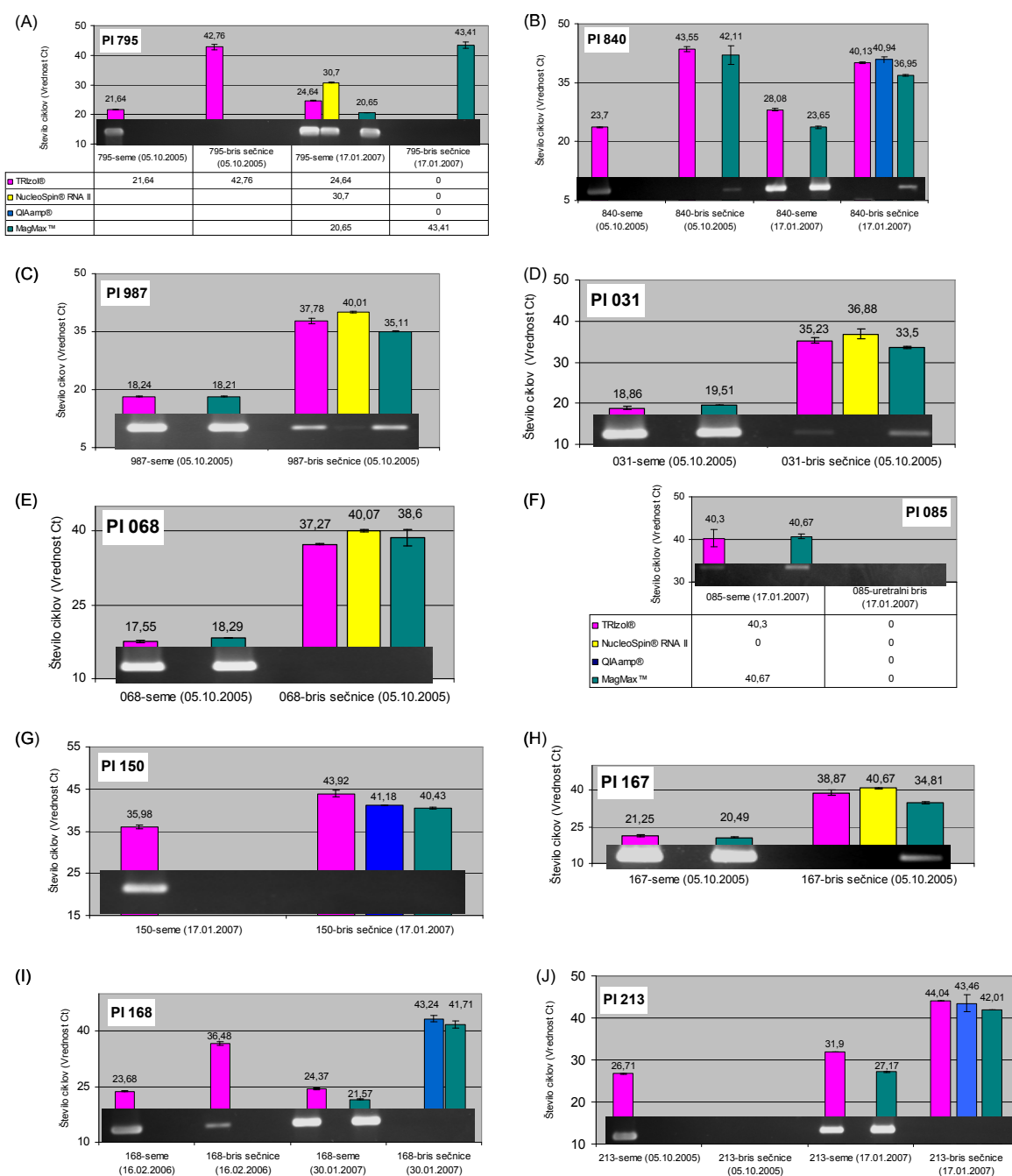
Na osnovi vrednosti Ct smo izpeljali relativne primerjave v količinah virusne RNA, ki smo jih dobili s tremi različnimi metodami izolacije. Iz standardnih krivulj vidimo (Slika 4-31), da so vrednosti Ct serije razredčin celokupne RNA, ki smo jo izolirali s kompletom MagMax™ Viral RNA Isolation Kit, manjše od vrednosti Ct desetkratnih razredčin celokupne RNA, ki smo jo izolirali z reagentom Trizol ali s kompletom QIAamp® Viral RNA Mini Kit. V območju kvantifikacije, ki obsega štiri logaritemska območja (od -1 do -4), je razlika v vrednostih Ct približno 2,5 cikla, zato lahko sklepamo, da je v vzorcu celokupne RNA, ki smo jo izolirali s kompletom MagMax™ Viral RNA Isolation Kit, približno 5,5-krat večja koncentracija virusne RNA.

4.2.2.1.3 Primerjava klasične metode RT-PCR in RT-PCR v realnem času

RT-PCR v realnem času je v primerjavi s klasično metodo RT-PCR bolj občutljiv. Z RT-PCR v realnem času smo pri vseh treh primerjanih metodah izolacije celokupne RNA določili virus EAV do razredčine 10^{-7} , kar je za 2 reda velikosti več kot s klasično metodo RT-PCR.

4.2.2.2 Dokazovanje virusa EAV v semenu in brisih sečnice pri perzistentnih izločevalcih

Virusno nukleinsko kislino smo s klasično metodo RT-PCR in RT-PCR v realnem času dokazali v semenu vseh PI. Pri posameznih vzorcih semena, pri katerih smo RNA izolirali s Trizolom in s kompletom MagMax™ Viral RNA Isolation Kit, so bile v večini primerov vrednosti Ct približno enake. Izjema so bili vzorci semena štirih perzistentnih izločevalcev (PI 795, PI 840, PI 168 in PI 213), pri katerih se je metoda izolacije s paramagnetnimi delci izkazala za bolj uspešno (Slike 4-32 A, B, I in J). Povprečne vrednosti Ct, ki smo jih dobili po pomnoževanju celokupne RNA izolirane s kompletom MagMax™ Viral RNA Isolation Kit, so bile večje za približno 4 cikle. Iz tega sklepamo, da je v celokupni RNA izolirani s paramagnetnimi delci približno 16-krat več virusne RNA. Rezultate prikazujejo slike 4-32 od A do J.

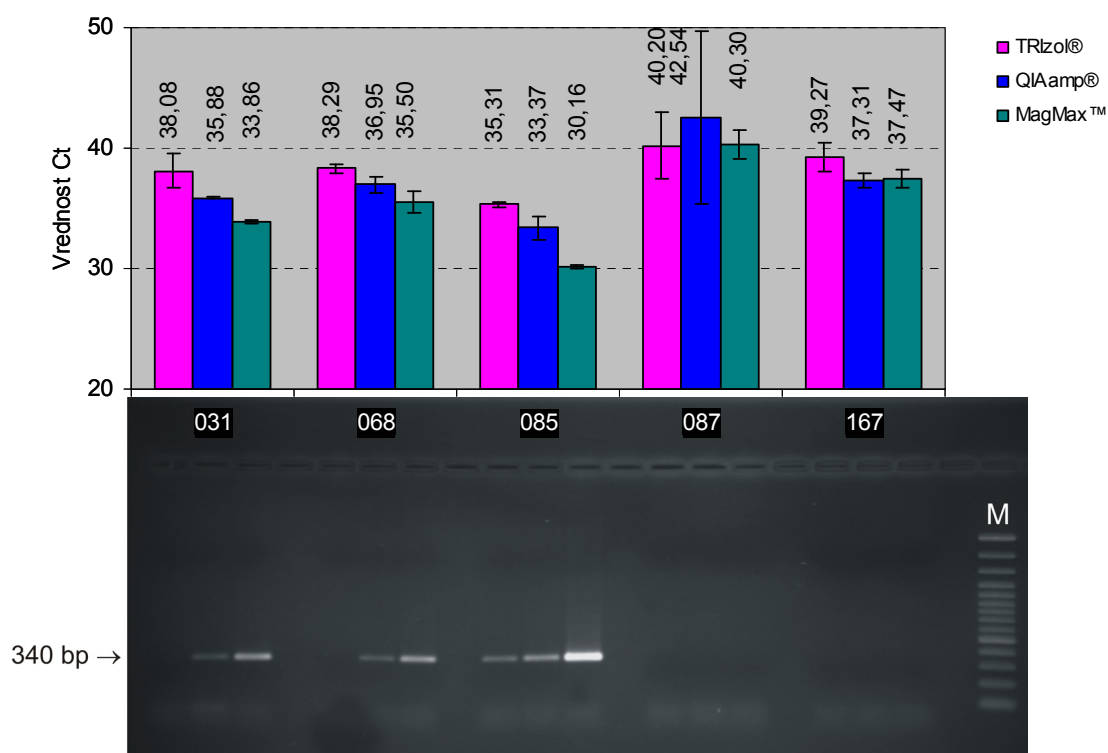


Slika 4-32 od A do J: Primerjava klasične metode RT-PCR in RT-PCR v realnem času za dokazovanje virusne RNA, ki smo jo iz vzorcev semena in vzorcev brisov sečnice PI izolirali z različnimi metodami za izolacijo celokupne RNA.

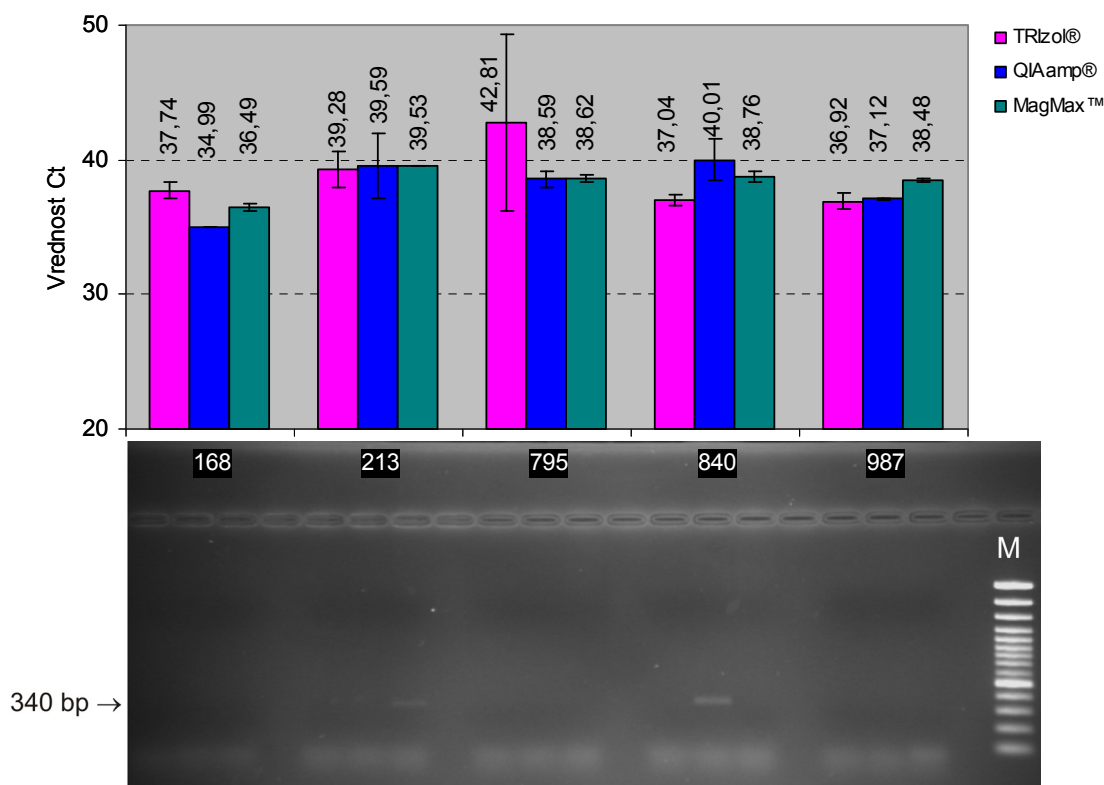
V vzorcih semena se nahaja večja količina virusa EAV, saj so povprečne vrednosti Ct virusne nukleinske kisline iz vzorcev semena, ne glede na način metode izolacije celokupne RNA (Trizol ali MagMax™ Viral RNA Isolation Kit), manjše od povprečnih vrednosti Ct virusne nukleinske kisline, izolirane iz brisov sečnice.

Iz primera pri PI795 je iz razlike (22,76) med povprečno vrednostjo Ct, pomnožene RNA iz vzorca semena (20,65), in povprečno vrednostjo Ct, pomnožene RNA iz vzorca brisa sečnice (43,41), razvidno, da se v vzorcu semena nahaja tudi do 7×10^6 več virusne nukleinske kisline kot v brisu sečnice (Slika 4-32 A, izolacija celokupne RNA z MagMax™ Viral RNA Isolation Kit).

Pri PI 795 (Slika 4-32 A) se je komplet NucleoSpin® RNA II za izolacijo celokupne RNA iz semena izkazal kot uspešen in učinkovit, medtem ko iz vzorca semena PI 085 z omenjeno metodo nukleinske kisline virusa EAV nismo izolirali. Visoke vrednosti Ct pri metodah izolacije s Trizolom (40,3) in s kompletom MagMax™ Viral RNA Isolation Kit (40,67) nakazujejo, da je bila v semenu PI 085 relativno majhna količina virusa EAV. V brisu sečnice, ki so ga PI 085 odvzeli pred jemanjem semena istega dne (17.01.2007), virusa EAV nismo zaznali (Slika 4-32 F). V vzorcu brisa sečnice, ki so ga PI 085 odvzeli skoraj dva meseca kasneje, pa smo nukleinsko kislino virusa EAV dokazali z RT-PCR v realnem času kot tudi s klasično metodo RT-PCR (Slika 4-33).



Slika 4-33: Primerjava RT-PCR v realnem času in klasične metode RT-PCR. Za posamezen vzorec brisa sečnice so prikazane povprečne vrednosti Ct in elektroforetska ločitev produktov RT-PCR, M – standard DNA velikosti 100 bp.

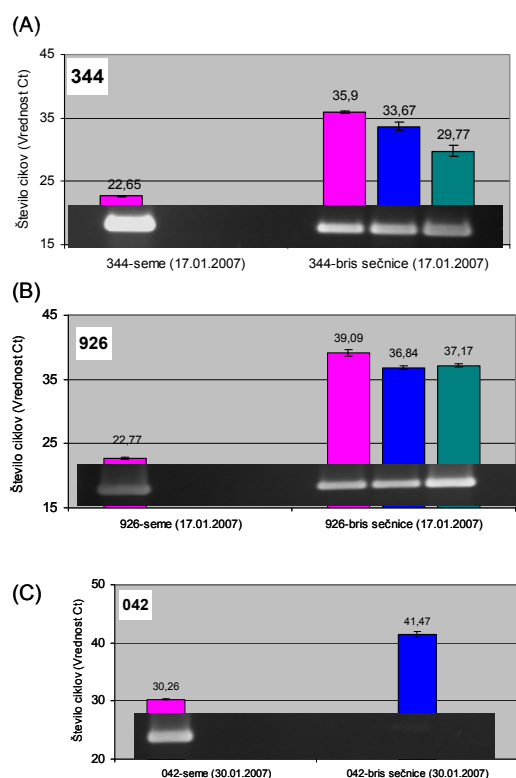


Slika 4-34: Primerjava RT-PCR v realnem času in klasične metode RT-PCR. Za posamezen vzorec so prikazane povprečne vrednosti Ct in elektroforetska ločitev produktov RT-PCR, M – standard DNA velikosti 100 bp.

Tudi pri ostalih PI smo v vzorcih brisov sečnice z RT-PCR v realnem času dokazali virus EAV. Produktov RT-PCR iz brisov sečnice 087, 167, 168, 795 in 987 na agaroznem gelu nismo zaznali (Sliki 4-33 in 4-34). Izkazalo se je, da je izkoristek pri metodi izolacije celokupne RNA iz brisov sečnice s paramagnetnimi delci večji kot pri metodah izolacije s Trizolom ali s kompleti za izolacijo RNA s kolonami. Pri pomnoževanju odseka v genu ORF7 je bila povsem pričakovano metoda RT-PCR v realnem času občutljivejša od klasične metode RT-PCR.

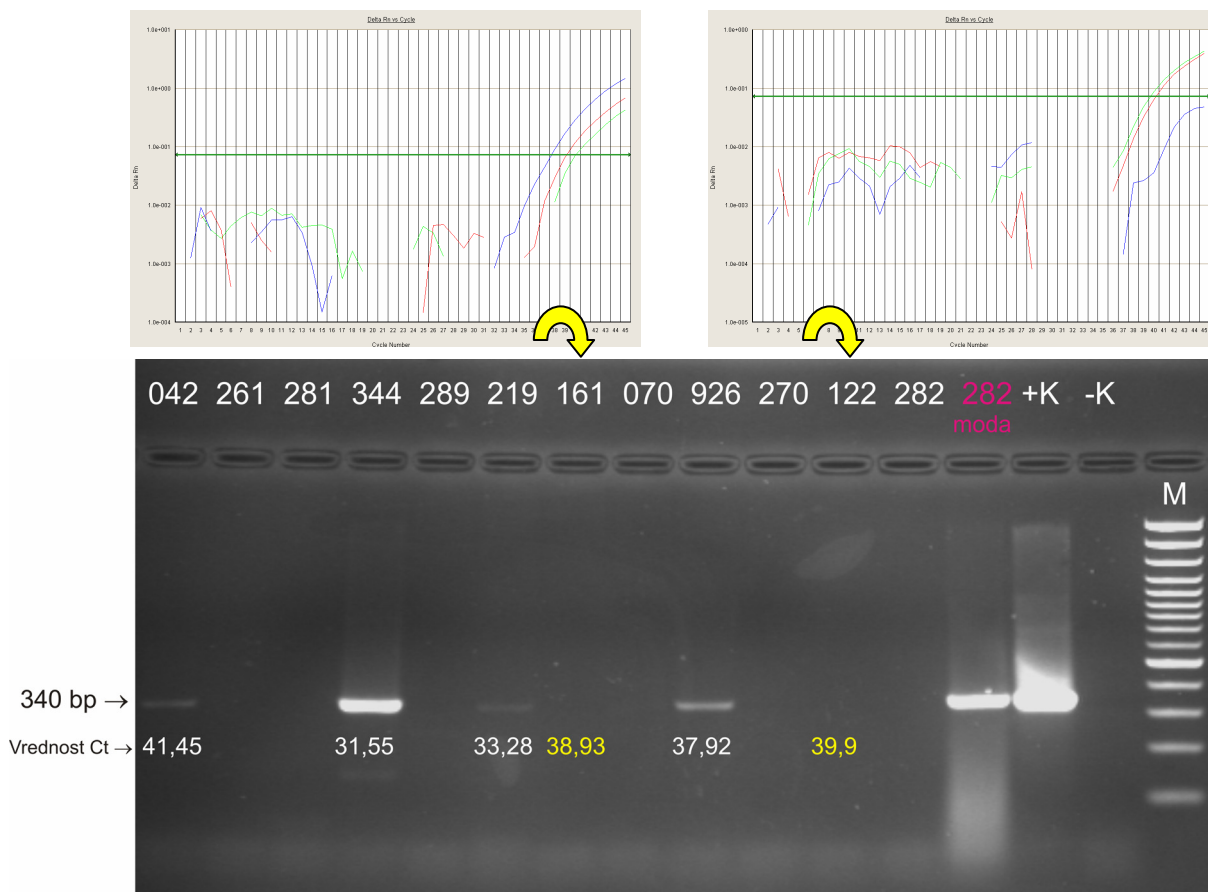
4.2.2.3 Dokazovanje virusa EAV v semenu in brisih sečnice pri domnevnih izločevalcih

Od vsakega izmed treh domnevnih izločevalcev (344, 926 in 042) smo v obdobju od leta 2002 do 2007 dobili le po en vzorec semena, v katerem smo dokazali nukleinsko kislino virusa EAV. Pri vzorcih brisov sečnice žrebcev 344 in 926 so bili rezultati klasične metode RT-PCR in RT-PCR v realnem času enaki (Sliki 4-35 A in B). V brisu sečnice žrebca 042 smo le z RT-PCR v realnem času dokazali virusno RNA, ki smo jo izolirali s kompletom QIAamp® Viral RNA Mini Kit. Kljub temu da smo s kompletom MagMax™ Viral RNA Isolation Kit v večini primerov uspešno izolirali RNA iz brisov sečnice, se ta metoda pri izolaciji celokupne RNA iz brisa žrebca 042 ni izkazala kot učinkovita. Metodo izolacije s Trizolom na tem vzorcu brisa nismo testirali (Slika 4-35 C).



Slika 4-35 od A do C: Primerjava klasične metode RT-PCR in RT-PCR v realnem času za dokazovanje virusne RNA, ki smo jo iz vzorcev semena in vzorcev brisov sečnice domnevnih izločevalcev izolirali z različnimi metodami za izolacijo celokupne RNA.

Od žrebca 042 smo 5. marca 2007 pridobili še en vzorec brisa sečnice. Tistega dne žrebcu 042 semena niso odvzeli. Kot je razvidno s slike 4-36, smo takrat iz brisa sečnice s paramagnetnimi delci uspeli izolirati virusno nukleinsko kislino in jo dokazati z obema molekularnima metodama, čeprav je bil signal produkta RT-PCR na agaroznem gelu šibek in vrednost Ct 41,45. Tudi pri domnevnih izločevalcih 344 in 926 sta pozitivna rezultata brisov sečnice odvzetih 5. marca 2007 potrdila prisotnost virusa EAV.



Slika 4-36: Dokaz produktov RT-PCR (340 bp) v 1,8-odstotnem agaroznem gelu. Za vzorce brisov sečnice, ki so bili pozitivni z RT-PCR v realnem času, so prikazane povprečne vrednosti Ct, izračunane iz treh ponovitev. + K – pozitivna kontrola (referenčni sev Bucyrus), - K – negativna kontrola reakcijske mešanice RT-PCR (H₂O-DEPC), M – standard DNA velikosti 100 bp.

Od šestih domnevnih izločevalcev (261, 289, 219, 161, 282 in 122), ki so jim bili brisi ravno tako odvzeti 5. marca 2007, smo z obema molekularnima metodama potrdili virus EAV samo pri žrebcu 219. V vzorcih brisov žrebcev 161 in 122 smo virusno nukleinsko kislino dokazali le z RT-PCR v realnem času, medtem ko v vzorcih brisov žrebcev 261, 289 in 282 virusne

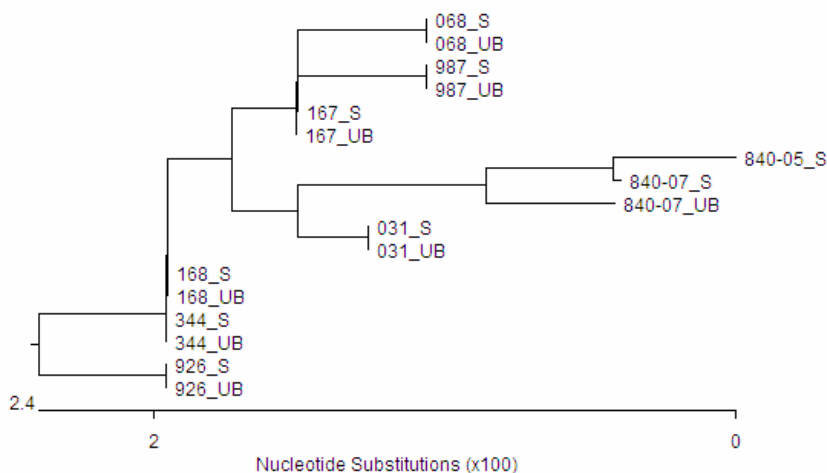
RNA nismo zaznali z nobeno izmed molekularnih metod. Negativen rezultat je bil pri žrebcu 282 pravzaprav pričakovan, saj so žrebca kastrirali 17. januarja 2007, mesec in pol pred odvzemom brisa sečnice. V modih kastriranega žrebca 282 smo virus EAV dokazali s klasično metodo RT-PCR (Slika 4-36).

4.2.2.4 Sekvenciranje produktov RT-PCR

Nukleinsko kislino virusa EAV, ki smo jo pri istem žrebcu dokazali v vzorcu semena in tudi v brisu sečnice, smo sekvencirali.

Dendrogram nukleotidnih zaporedij ORF7 iz brisov sečnice (UB) in vzorcev semena (S) (Slika 4-37) prikazuje, da so nukleotidna zaporedja ne glede na vrsto kužnega materiala pri posameznem žrebcu, ki je okužen z virusom EAV, identična.

Izjema je žrebec 840, pri katerem se je med zaporedjema 840-05_S in 840-07_S v obdobju dveh let zgodila ena nukleotidna zamenjava. Med zaporedjem 840-07_UB iz brisa sečnice in zaporedjem 840-07_S iz semena iste živali smo našli dve razliki. Nukleotidno zaporedje je v tej regiji virusnega genoma močno ohranjeno. To sovпада z dejstvom, da poteka evolucija virusa v genu ORF7 zaradi funkcije, ki jo opravlja nukleoprotein N, počasneje.



Slika 4-37: Dendrogram na osnovi 228 nukleotidov dolgih zaporedij odseka v ORF7 virusa EAV, S-seme in UB-bris sečnice. Dendrogram smo izdelali s programom Megalign (DNASTAR).

4.3 MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA VIRUSA EAV

4.3.1 Filogenetska analiza ORF5

Filogenetska drevesa smo izračunali na podlagi 156 poravnanih nukleotidnih zaporedij ORF5, dolgih 495 nukleotidov. V analizo smo zajeli 58 nukleotidnih zaporedij, ki smo jih določili v semenu okuženih žrebcev različnih pasem iz Slovenije. V raziskavo smo vključili 39 sevov iz reje A (od 031-03 do 987-05), seva virusa EAV, ki smo ju izolirali iz semena žrebca pasme bavarski toplokrvni konj (RA_BT) in semena nizozemskega toplokrvnega konja (ID_NT), ter 17 sevov iz vzorcev semen žrebcev pasme kasač. Znotraj te skupine so štirje sevi pripadali trem žrebcom pasme ameriški kasač (PP_AK, SL-02_AK, SL-03_AK in AM_AK), 2 sta pripadala žrebcu pasme finski kasač (SM-02_FK in SM-03_FK), trije so pripadali žrebcema pasme nemški kasač (TA_NK, IW-05_NK in IW-06_NK), štirje so pripadali žrebcema pasme slovenski kasač (CV-05_SK, CV-07c_SK, CV-07t_SK in PG_SK) in štirje sevi so pripadali švedskemu kasaču (BG-06_I_ŠK, BG-06_II_ŠK, BG-07_I_ŠK, BG-07_II_ŠK).

Drevesa smo ugotavljali po treh metodah: povezovanja sosedov (NJ), Bayesovi statistiki (BI) in po metodi največjega verjetja (ML). Topologije vseh treh dreves so se med seboj ujemale (Slike 4-38, 4-39 in 4-40).

Populacija sevov virusa EAV v Sloveniji je zelo heterogena. Med okuženimi konji v Sloveniji so prisotni sevi virusa EAV, ki jih uvrščamo v vse 3 znane genetske skupine (EAV-1, EAV-2 in EAV-3), kot tudi sevi, ki jih ne moremo uvrstiti v nobeno izmed omenjenih genetskih skupin.

Klad sevov virusa EAV iz reje na slovenskem Krasu (reja A), ki združuje tri linije, je na vseh drevesih dobil zelo visoko podporo (NJ – 999, BI – 0,99, ML – 999), kar nakazuje na obstoj lastne genetske skupine. Znotraj te lastne genetske skupine smo na vseh treh drevesih odkrili tri monofiletske skupine. Na drevesih NJ in BI (Sliki 4-38 in 4-39) si znotraj posameznih monofiletskih skupin sevi virusa EAV, ki smo jih določili pri mlajših žrebcih, delijo najbližjega skupnega prednika s sevi, ki smo jih dokazali pri štirih najstarejših žrebcih v reji A. Eno skupino tvorijo sevi, ki si delijo skupnega prednika s sevom 926-07, ki smo ga določili pri žrebcu 926 (letnik 1986), v drugo skupino prištevamo seve, ki imajo skupnega prednika s sevom 987-05, ki smo ga določili pri žrebcu 987 (letnik 1988), tretjo skupino tvorita seva 840-05 in 795-07, ki smo ju dokazali pri 25 in 27 let starih žrebcih 840 (letnik

1983) in 795 (letnik 1981). Od slednje skupine se očitno loči vzorec 282-06, ki ima na drevesih BI in ML (Sliki 4-39 in 4-40) nizko statistično podporo. Na drevesu NJ je bila podpora te cepitve nekoliko višja (715) (Slika 4-38). Naši rezultati nakazujejo, da so se mlajše živali najverjetneje okužile od starejših vrstnikov, ki predstavljajo vir okužbe za druge še neokužene živali v reji.

Med posameznimi pari delnih nukleotidnih zaporedij ORF5 kraških sevov je identičnost nukleotidov od 84,2 do 99,8-odstotna, medtem ko je identičnost med nukleotidnimi zaporedji kraških sevov in referenčnim sevom Bucyrus od 79,8 do 84,8-odstotna.

Nukleotidna zaporedja ORF5 kraških sevov in zaporedja iz genetskih skupin EAV-1, EAV-2, EAV-3 in IIC so bila od 77,6 do 87,9-odstotno identična, od 77,0 do 86,7-odstotno pa so bila identična z nukleotidnimi zaporedji sevov virusa EAV, ki jih ne uvrščamo v nobeno od treh genetskih skupin kot tudi ne v skupino IIC (Tabela 4-9).

Tabela 4-9: Primerjava nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij.

Genetska skupina	kraški sevi virusa EAV iz reje A	
	Identičnost med nukleotidnimi zaporedji (%)	Identičnost med aminokislinskimi zaporedji ^a (%)
EAV-1	od 79,0 do 86,5	od 80,6 do 95,2
EAV-2	od 77,6 do 87,9	od 82,4 do 93,9
EAV-3	od 77,6 do 85,7	od 80,6 do 93,9
IIC (PL2 in I3)	od 80,4 do 85,9	od 84,8 do 93,3
Neuvrščeni	Identičnost med nukleotidnimi zaporedji (%)	Identičnost med aminokislinskimi zaporedji (%)
RSA6, H9 in H10 SM-02 in SM-03	od 77,0 do 83,2	od 79,4 do 91,5
S197-02 in H11	od 78,8 do 84,6	od 81,8 do 89,7
Bibuna, S1 in S4	od 80,4 do 86,7	od 83,0 do 93,9

^a V primerjavo smo vključili le nekatere predstavnike posameznih genetskih skupin, ki smo jih zajeli tudi v aminokislinsko poravnavo na sliki 4-41.

Seva SM-02 in SM-03 smo določili pri finskem kasaču SM (letnik 1988), rojenem v Helsinkih na Finskem. Kasača SM so leta 1992 uvozili v Slovenijo, kjer je plemenil. Seva SM-02 in SM-03 sta najbolj sorodna sevoma H10 in H21 iz Madžarske. S sevom USA2, ki so ga leta 1963 izolirali v ZDA pri žrebcu pasme american saddlebred, se na drevesih NJ in ML ORF5 združujejo v skupino z nizko statistično podporo (NJ - 648, ML - 722) (Sliki 4-38 in 4-40). Na drevesu BI je skupina dobila nekoliko višjo podporo (BI – 0,98) (Slika 4-40).

Tudi na drevesih NJ sta bila po informaciji v ORF1b (Slika 4-25) in ORF7 (Slika 4-27) seva SM-02 in SM-03 združena v samostojno monofiletsko skupino.

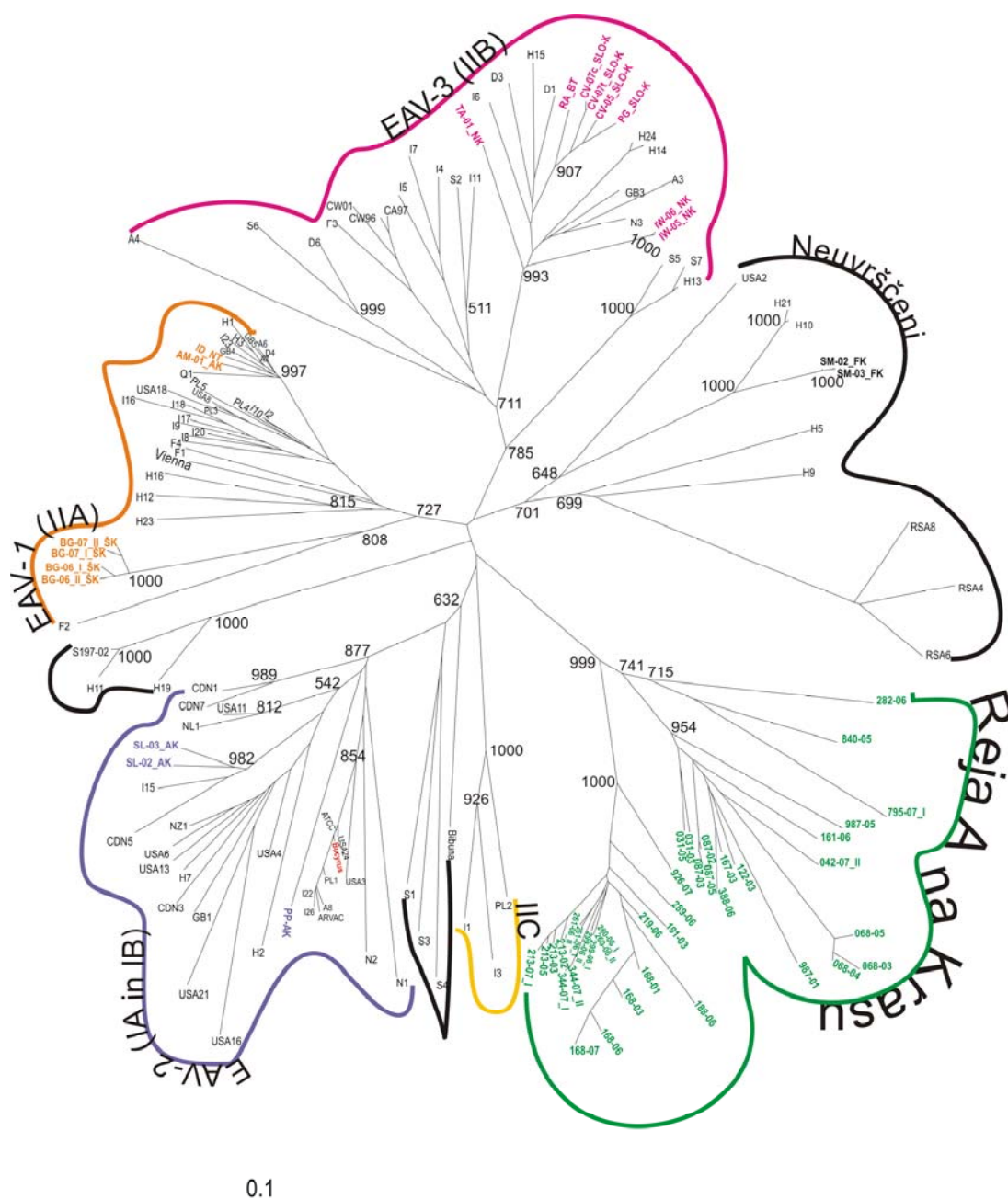
Pri sevih SL-02, SL-03 in PP, ki smo jih določili v semenu okuženih ameriških kasačev uvoženih iz ZDA, je razvrstitev v genetsko skupino EAV-2 odražala geografsko poreklo živali. Plemenjaka SL (letnik 1987) in PP (letnik 1993), rojena v New Jerseyju in v Kentackyju, ki so ju uvozili v Slovenijo po letu 1992, sta bila najverjetneje okužena že pred uvozom.

Pri ameriškem kasaču AM (letnik 1995) iz Lexingtona (ZDA) smo v semenu dokazali sev, ki ne sodi v genetsko skupino EAV-2, temveč ga skupaj z evropskimi izolati iz Avstrije, Francije, Katarja, Madžarske, Nemčije, Italije, Poljske in Velike Britanije uvrščamo v genetsko skupino EAV-1 (Slike 4-38, 4-39 in 4-40). Iz tega lahko sklepamo, da se je ameriški kasač AM okužil v Evropi.

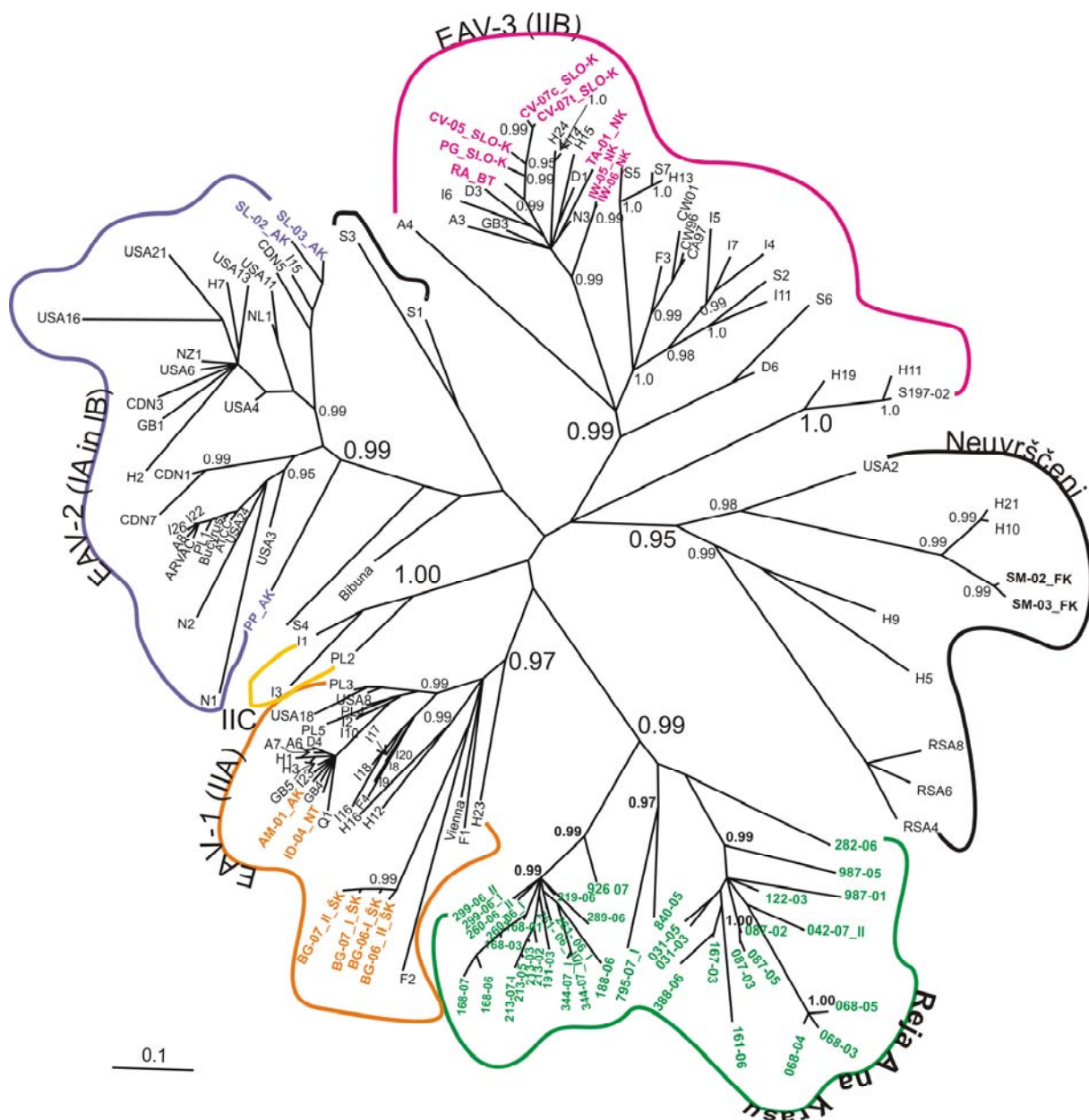
V omenjeno evropsko skupino EAV-1 sodijo tudi sevi BG-06_I_ŠK, BG-06_II_ŠK, BG-07_I_ŠK, BG-07_II_ŠK, ki smo jih dokazali pri švedskem kasaču BG (letnik 1991) in sev ID, ki smo ga dokazali pri nizozemskem toplokrvnem konju uvoženem iz Nizozemske (Slike 4-38, 4-39 in 4-40).

Pri nemških kasačih smo dokazali seve TA, IW-05 in IW-06, ki jih skupaj z izolati iz Francije, Nemčije, Italije in Norveške uvrščamo v drugo evropsko genetsko skupino EAV-3 (Slike 4-38, 4-39 in 4-40). Nemškega kasača TA (letnik 1990) so uvozili v Slovenijo leta 1999, medtem ko so nemškega kasača IW (letnik 1995) uvozili leta 2005.

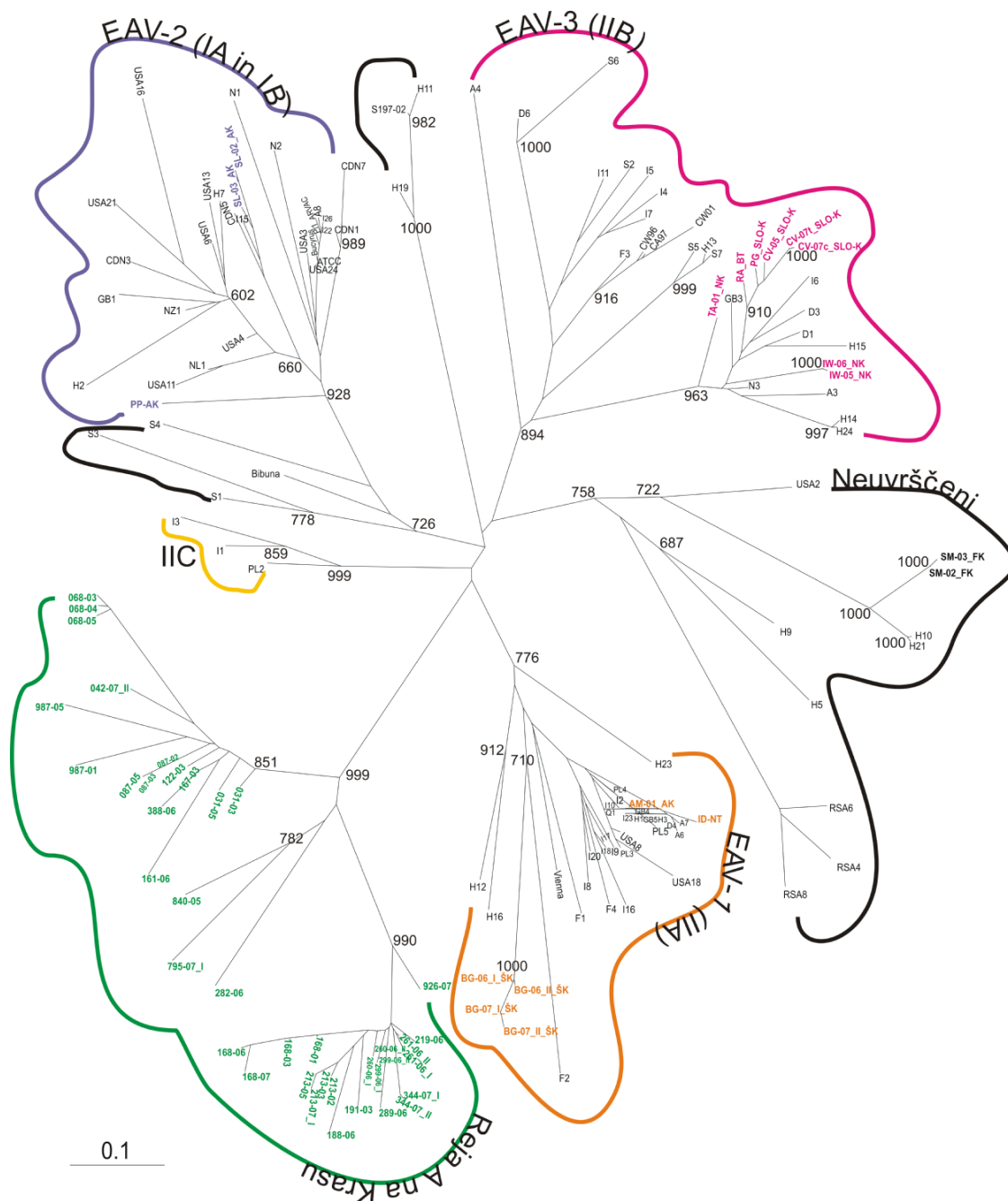
Tudi seve CV-05, CV-07c, CV-07t in PG, ki smo jih dokazali v semenu slovenskih kasačev CV (letnik 1999) in PG (letnik 1997), uvrščamo v skupino EAV-3 (Slike 4-38, 4-39 in 4-40). Plemenjak CV je tekmoval v Avstriji, Italiji in Nemčiji, plemenjak PG pa do leta 2006 na Švedskem. V semenu slednjega smo sev PG dokazali leta 2005. Sevi CV-05, CV-07c, CV-07t so bolj sorodni s sevom PG kot s katerim koli drugim sevom iz genetske skupine EAV-3. Na podlagi teh rezultatov lahko domnevamo, da je žrebec PG okužil žrebca CV ali obratno. Tudi sev RA, ki smo ga leta 2005 dokazali v semenu bavarskega toplokrvnega konja RA (letnik 1980), si z zgoraj omenjenimi sevi deli najbližjega skupnega prednika. Filogenetska analiza gena ORF5 sicer nakazuje sorodnost med sevi CV-05, CV-07c, CV-07t, PG in RA, vendar bi za bolj zanesljivo določitev izvora okužbe z virusom EAV bilo treba pridobiti več podatkov o toplokrvnem konju RA.



Slika 4-38: Filogenetsko drevo odseka v ORF5 po metodi povezovanja sosedov (NJ), 1000 samovzorčenj. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po modelu substitucij F84. Merilo prikazuje razmerje med številom substitucij in dolžino vej. Prikazane so statistične podpore posameznih cepitev, ki so večje od 500.



Slika 4-39: Filogenetsko drevo odseka v ORF5 po Bayesovi metodi. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po modelu substitucij HKY + I + Γ . Merilo prikazuje razmerje med številom substitucij in dolžino vej. Prikazane so posteriorne verjetnosti posameznih cepitev. Za dobro podprte cepitve veljajo tiste s posteriorno verjetnostjo večjo od 0,95.



4.3.2 Analiza aminokislinskih zaporedij variabilnega področja V₁ v GP₅

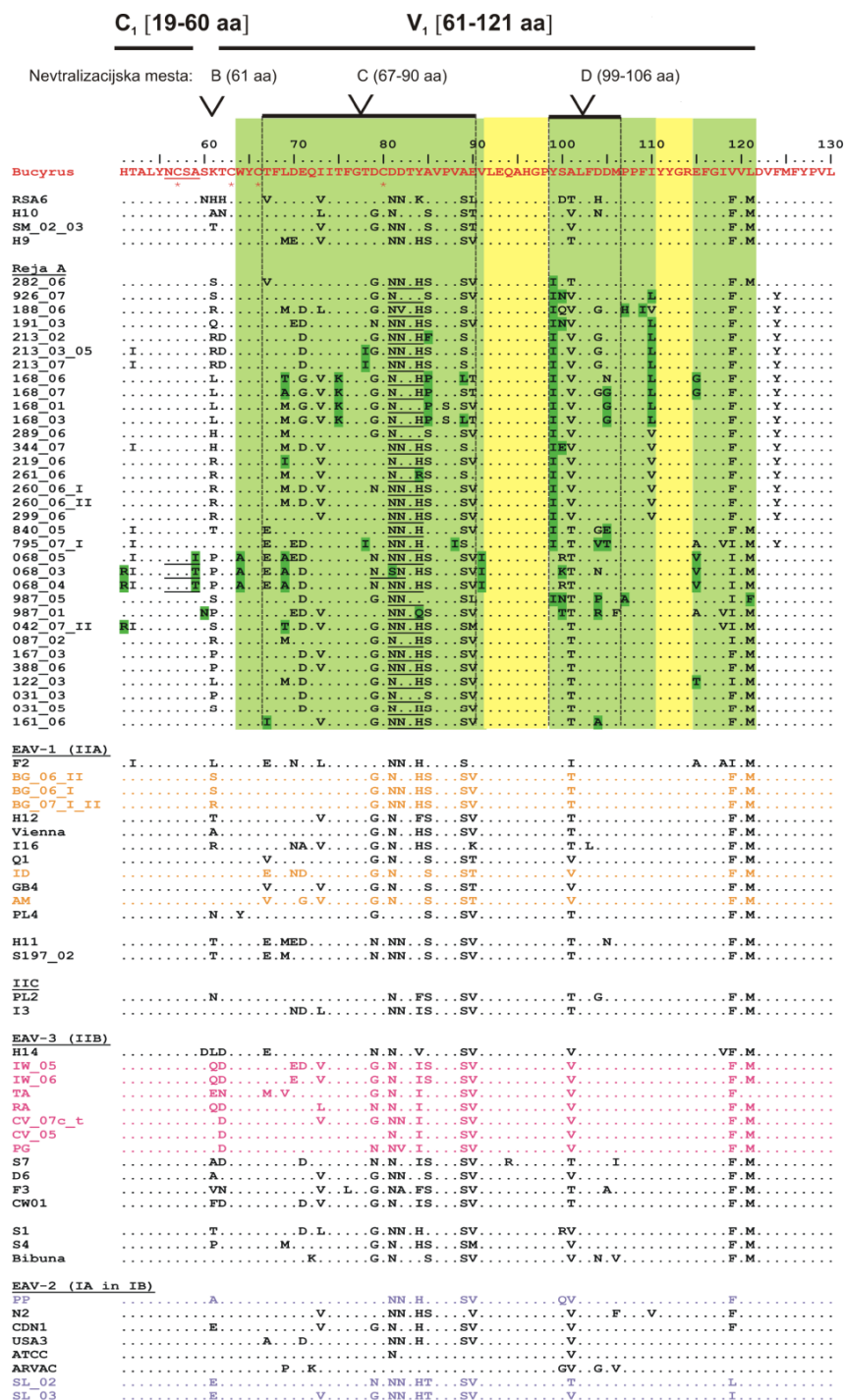
V primerjavo smo vključili prevedena aminokislinska zaporedja sevov iz različnih genetskih skupin, ki smo jih poravnali glede na aminokislinsko zaporedje referenčnega seva Bucyrus. Prevedena zaporedja so bila dolga 165 aminokislin in so zajemala del ohranjenega področja C₁, dolgo 10 aminokislinskih ostankov, variabilno področje V₁, dolgo 60 aminokislinskih ostankov, ki sta prikazana na sliki 4-41, ter ohranjeno področje C₂, variabilno področje V₂, ohranjeno področje C₃ in del variabilnega področja V₃.

Aminokislinska zaporedja sevov virusa EAV iz reje A so se od sevov iz drugih genetskih skupin v področju V₁ razlikovali na 19 mestih. Polimorfna mesta zajemajo aminokisline na področjih 64-91, 99-110 in 115-121 (zelena območja na sliki 4-41). Med variabilnimi področji se nahajata dve področji: 92-98 in 111-114 (rumena območja na sliki 4-41), kjer je ohranjenost aminokislin med zaporedji kraških sevov virusa EAV popolna.

Na nevtralizacijskem mestu B smo pri sevih iz reje A zasledili aminokisline, ki so tipične tudi za seve iz drugih genetskih in neuvrščenih skupin, medtem ko smo na zelo variabilnih nevtralizacijskih mestih C in D naleteli na aminokisline, ki so značilne samo za kraške seve virusa EAV.

Primerjava sevov iz reje A z drugimi izolati iz okuženih žrebcev iz Slovenije in s sevi iz genske banke je pokazala 9 razlik na nevtralizacijskem mestu C. Prvo polimorfno mesto predstavlja aminokislina na mestu 67, kjer je pri sevu 161-06 (67I – izolevcin). Sledi še 8 polimorfnih mest 69, 75, 78, 81, 84, 85, 88 in 89, kjer so pri sevih iz reje A aminokisline (69T, A in I – treonin, alanin in izolevcin); (75K – lizin); (78I – izolevcin); (81S – je samo pri sevu 068-03 namesto asparagina aminokislina serin); (84Q in R – glutamin in arginin); (85F in P – fenilalanin in prolin), (88I – izolevcin je samo pri sevu 795-07_I) in na mestu 89 (89L – levcin je samo pri sevih 168-06 in 168-03 iz istega žrebca 168). Pri ostalih izolatih virusa EAV v GP₅ na teh mestih omenjenih aminokislin ne najdemo (Slika 4-41).

Na nevtralizacijskem mestu D smo pri sevih iz reje A ugotovili 4 razlike, ki jih pri ostalih proučevanih sevih virusa EAV nismo zaznali. Sevi iz reje A so imeli na mestu 99 (99I) aminokislino izolevcin, na mestu 100 (100N, E, K in T) asparagin, glutamat, lizin ali treonin, na mestu 104 (104V, P, R in A) valin, prolin, arginin ali alanin in na mestu 105 (105G, E in T) glicin, glutamat ali treonin.

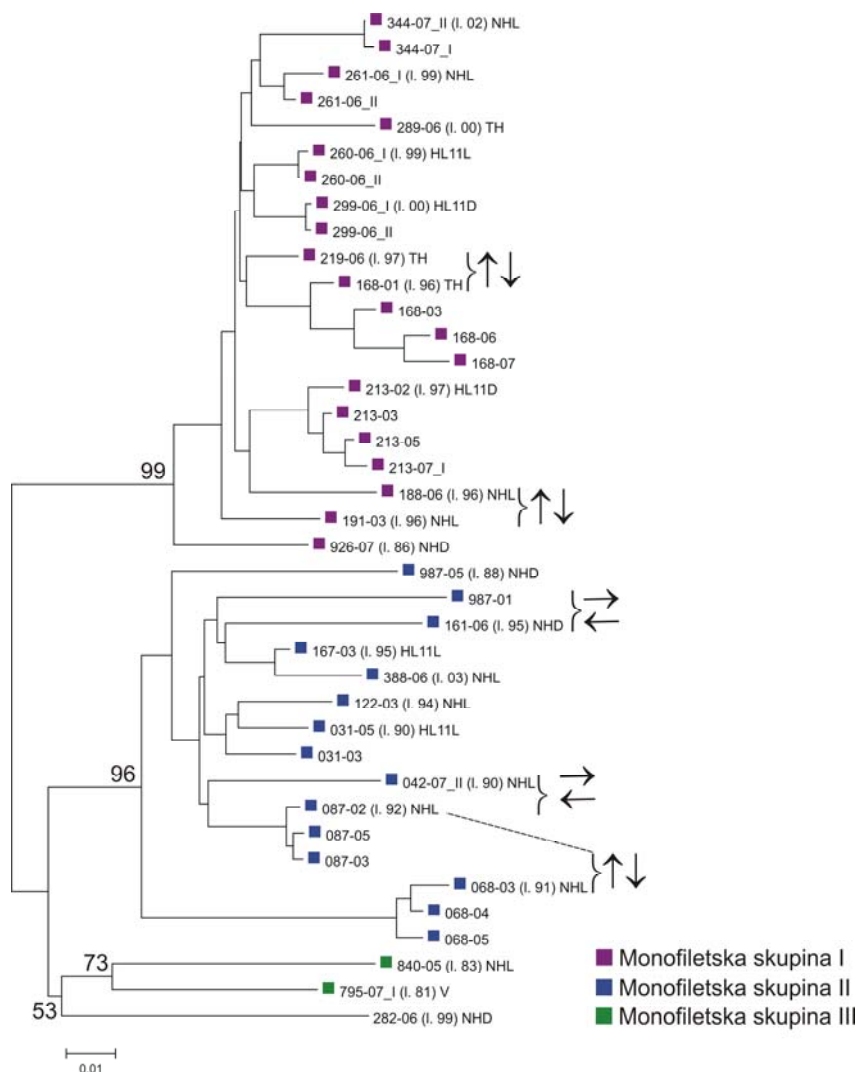


Slika 4-41: Primerjava prevedenih aminokislinskih zaporedij dela ohranjenega področja C₁ in variabilnega področja V₁ v GP₅ sevov virusa EAV iz različnih genetskih skupin in neuvrščenih sevov. Označena so nevtralizacijska mesta B, C in D. Ohranjeni cisteinski ostanki (Cys56, Cys63, Cys66 in Cys80) so označeni z zvezdicami. V aminokislinskih zaporedjih so s temno zeleno barvo označena posamezna polimorfna mesta, ki jih najdemo samo pri kraških sevih virusa EAV. Mesti 56 in 81 za N-glikozilacijo sta podčrtani. Popolnoma ohranjeni področji sta rumeni, 3 variabilna pa so zelene barve.

4.3.3 Evolucija kraških sevov virusa EAV iz reje A

4.3.3.1 Analiza nukleotidnih zaporedij ORF5

Kraške seve virusa EAV lahko uvrstimo v tri monofiletske skupine (Slika 4-42).



Slika 4-42: Filogram nukleotidnih zaporedij ORF5 kraških izolatov virusa EAV. Metoda povezovanja sosedov (NJ), 1000 samovzorčenj. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po Kimurovem dvoparametričnem modelu substitucij. Merilo prikazuje razmerje med številom substitucij in dolžino vej. Na razvejitevah so prikazane relativne podpore razvejitev, izražene v odstotkih. Ob vsakem sevu virusa EAV je v oklepaju izpisana letnica rojstva žrebca, sledijo ji kratice hleva, v katerem je dne 15. januarja 2007 bil nastanjen posamezen žrebec (NHL – novi hlev levo, NHD – novi hlev desno, TH – turistični hlev, HL11L – hlev 11 levo, HL11D – hlev 11 desno, V – Velbanca). »↑↓« označuje, da sta bila žrebca v boksih drug nasproti drugemu, »↔« pa označuje, da sta bila žrebca nastanjena v boksih v isti vrsti.

V monofiletski skupini I se sevi 168-07, 188-06 in 191-03, ki smo jih dokazali v semenu treh žrebcev 168, 188 in 191 (letnik 1996), od seva 926-07, ki smo ga določili v semenu najstarejšega žrebca 926 (letnik 1986), razlikujejo za 39, 33 in 30 nukleotidov (od 92,1 do 93,9-odstotna identičnost). Med sevi, ki smo jih določili pri mlajših žrebcih 261 ter 299, in sevom 926-07 je identičnost na nukleotidnem nivoju večja in znaša od 94,9 do 95,2 %.

Iz filograma (Slika 4-42) lahko razberemo, da se je od skupnega prednika pričujočih sevov v monofiletski skupini I prvi ločil sev 926-07, ki mu je sledil sev 191-03, s katerim si vsi ostali sevi v skupini I delijo skupnega prednika.

V monofiletski skupini II se najbolj razlikujeta seva 161-06 in 987-05. Slednjega smo dokazali pri žrebcu 987, ki je v omenjeni skupini najstarejši (letnik 1988). Med sevoma smo ugotovili 46 razlik v nukleotidih, kar pomeni, da sta 90,5-odstotno identična.

Med sevoma, ki smo jih določili pri dveh najstarejših žrebcih 795 in 840 in tvorita lastno monofiletsko skupino III, je identičnost 91,1-odstotna.

Sevi 840-05, 795-07, 987-01, 987-05 in 926-07, ki smo jih dokazali v semenu najstarejših žrebcev v reji A, so med seboj bolj ali manj enako oddaljeni, kar kaže na njihov relativno samostojen in ločen razvoj.

Nekateri žrebci okuženi z virusom EAV so nastanjeni v boksih, ki so si prostorsko relativno blizu. Bližnja lokacija izvora virusa EAV pa povečuje tveganje za okužbo.

Na podlagi evolucijskih odnosov med sevi EAV, ki jih prikazuje filogram (Slika 4-42), smo ugotavljali povezavo med lokacijo žrebcev in možnim izvorom okužbe.

Žrebec 168 se je najverjetneje okužil z virusom EAV od žrebca 219, ki je nastanjen v istem hlevu TH. Domnevamo, da se je žrebec 161 iz hleva NHD okužil od žrebca 987, saj je sev 987-01 starejši od seva 161-06 (Slika 4-42).

Iz filograma lahko razberemo, da so se sevi iz vzorcev semena žrebca 068 iz hleva NHL prvi ločili od skupnega prednika vseh ostalih sevov v monofiletski skupini II. Ne glede na to, da so sevi žrebca 068 starejši od sevov, ki smo jih dokazali v semenu žrebcev 042 in 087 iz istega hleva NHL, lahko z gotovostjo trdimo, da se je žrebec 087 okužil od žrebca 042.

Čeprav je primerjava nukleotidnih zaporedij med sevoma 188-06 in 191-03 žrebcev 188 in 191, ki živita v istem hlevu NHL drug nasproti drugemu, pokazala precejšnjo ohranjenost (95,5-odstotna identičnost), kar nakazuje na evolucijski razvoj iz skupnega prednika, pa iz njunih filogenetskih odnosov ne moremo sklepati na medsebojno okužbo.

Iz filograma je razvidno, da se sevi, ki smo jih dokazali v vzorcih semena pri istem perzistentnem izločevalcu v različnih časovnih obdobjih, razlikujejo med seboj zaradi molekulske evolucije (Slika 4-42). V vzorcih semena, odvzetih pri isti živali v razmiku enega leta, smo določili število nukleotidnih zamenjav (Tabela 4-10).

Tabela 4-10: Razlike med zaporedji ORF5 pri sevih virusa EAV iz reje A.

Nukleotidni zaporedji	Število nukleotidnih zamenjav	Odstotek nukleotidnih zamenjav	Hitrost nukleotidne zamenjave*
168-06 vs. 168-07	7	1,4	$7,3 \times 10^{-3}$
213-02 vs. 213-03	5	1,01	$5,1 \times 10^{-3}$
068-03 vs. 068-04	5	1,01	$5,1 \times 10^{-3}$
068-04 vs. 068-05	5	1,01	$5,1 \times 10^{-3}$
087-02 vs. 087-03	2	0,404	$2,0 \times 10^{-3}$
povprečje	4,8	0,969	$4,8 \times 10^{-3}$

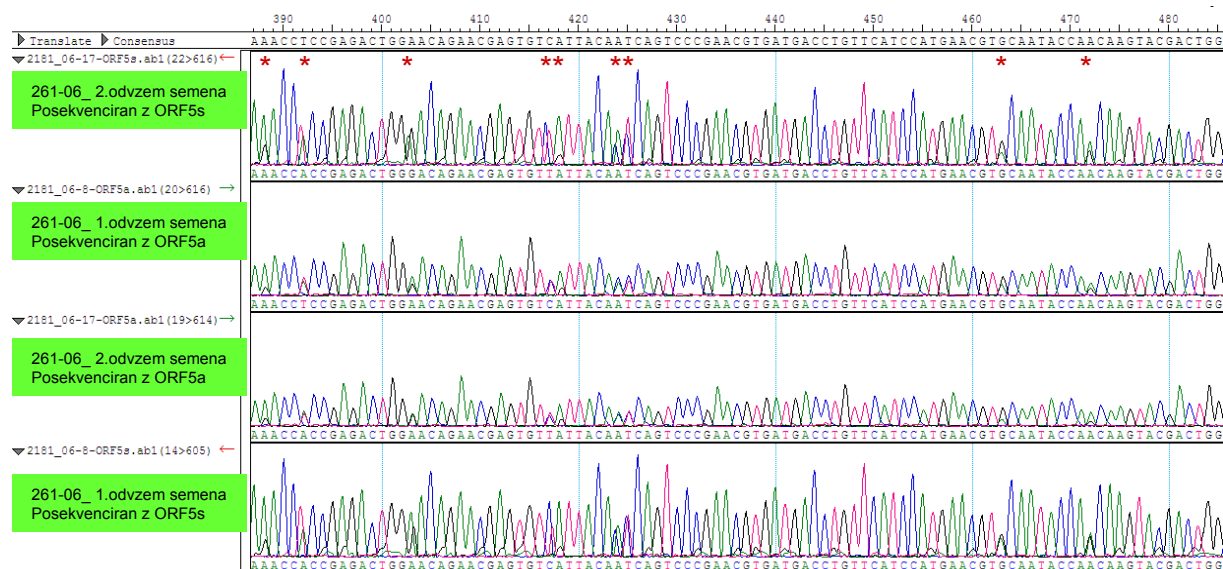
* Hitrost nukleotidne zamenjave (v_n) smo definirali kot število zamenjav na mesto/leto. Hitrost nukleotidne zamenjave smo ocenili tako, da smo povprečno število zamenjav (K) izračunali na podlagi Kimurovega dvoparametričnega modela in ga delili z dvojnimi časom od medsebojne ločitve dveh zaporedij (t), ki smo ju primerjali ($v_n = K/2t$). Kot čas ločitve smo izbrali kar čas enega leta, ki smo ga privzeli iz podatkov o odvzemu vzorcev semena, v katerih smo določili nukleotidna zaporedja dominantnih variant virusa EAV.

Dominantne variante virusa EAV iz vzorcev semena perzistentnih izločevalcev 168, 213, 068 in 087 so se v odseku gena ORF5, dolgem 495 nukleotidov, razlikovale v povprečju za 0,969 % na leto. Iz tabele 4-10 lahko razberemo, da je hitrost spreminjanja gena ORF5 pri sevih iz reje A velikostnega razreda 10^{-3} , kar kaže na hitro molekularno evolucijo virusa EAV, ki znotraj istega geografskega področja (reja A na Krasu) poraja linije izredno genetsko heterogenih različic virusa EAV.

Nekoliko manjšo variabilnost smo opazili med sevi virusa EAV v zaporednih vzorcih semena, ki so jih odvzeli istemu žrebcu istega dne v razmaku nekaj ur. To kaže, da velika genetska raznolikost sevov virusa EAV pri isti živali ne izvira samo iz hitre evolucije ene virusne variante, temveč potrjuje sočasen obstoj več sorodnih heterogenih genomov virusa EAV, ki jim pravimo kvazivirsa. Obstoj kvazivirsa virusa EAV smo dokazali pri žrebcih 344, 260, 261 in 299. Nukleotidna zaporedja, ki smo jih določili v vzorcih semena prvega in drugega odvzema, so se pri žrebcih 344, 260 in 299 razlikovali samo za en nukleotid, pri žrebcu 261 pa smo našli kar 4 razlike v nukleotidih (Slika 4-43).

Pri določevanju nukleotidnega zaporedja odseka gena ORF5 virusa EAV, ki smo ga pri žrebcu 261 dokazali v vzorcih semena prvega in drugega odvzema, produktov RT-PCR nismo

klonirali v plazmid, temveč smo se na podlagi kromatograma direktnega sekvenciranja, na mestih prekrivajočih se vrhov, odločili za višji vrh.



Slika 4-43: Kromatogrami odseka v genu ORF5 virusa EAV iz vzorca semena 261-06. Z zvezdicami so označena mesta, na katerih se na istih pozicijah pri vseh štirih zaporedjih nahajajo prekrivajoči se vrhovi, ki nakazujejo obstoj kvazivirte virusa EAV.

4.3.3.2 Analiza aminokislinskih zaporedij GP₅

Aminokislinska zaporedja nekaterih kraških izolatov se skozi časovno obdobje enega ali več let niso spremenila. Nukleotidne zamenjave so pri zaporedjih 087-02, 087-03 in 087-05 ter zaporedjih 213-03 in 213-05 ostale neizražene na ravni produkta gena ORF5. Prav tako smo pri zaporedjih 299-06_I in 299-06_II ter 261-06_I in 261-06_II iz prvega in drugega odvzema vzorcev semena istega žrebca ugotovili le sinonimne nukleotidne zamenjave.

V primerih, ko smo med zaporedji GP₅, ki smo jih določili v vzorcih semena istega PI, kjer je bil čas med odvzemoma daljši ali enak kot 2 leti, ugotovili razlike v aminokislinah, smo želeli preveriti vpliv selekcije na evolucijo gena ORF5 med perzistentno okužbo.

Iz tabele 4-11 je razvidno, da so med primerjanimi zaporedji večine PI (168, 213, 987 in 031) sinonimne zamenjave bolj pogoste od nesinonimnih ($Ka/Ks < 1$). Sklepamo lahko, da kljub izraženemu polimorfizmu cDNA v genu ORF5 obstajajo funkcionalne zahteve, ki ne prenesejo večjih strukturnih sprememb v produktu GP₅.

Pri nukleotidnih zaporedjih 068-03 in 068-05 smo ugotovili, da je evolucijo dominantnih variant virusa EAV pri PI 068 usmerjala pozitivna selekcija. Primerjava je pokazala, da se je v genu ORF5 virusa EAV pri žrebcu 068 v dveh letih zgodilo več nesinonimnih kot sinonimnih zamenjav, kar se odraža z večjim razmerjem $Ka/Ks = 1,717$ (Tabela 4-11). Med nukleotidnima zaporedjema 068-03 in 068-05 se je zgodilo 7 nukleotidnih zamenjav, pri čemer je bilo razmerje med sinonimnimi in nesinonimnimi zamenjavami 1:6. Od šestih nesinonimnih zamenjav jih je večina dala aminokislino s podobno fizikalno-kemijsko lastnostjo. Izjema je bila tranzicija na drugi poziciji v kodonu ACC za treonin na mestu 59 v ohranjenem področju C₁, ki se je spremenil v kodon ATC za izolevcin, kar je privedlo do zamenjave polarne aminokisline z nepolarno. Kljub temu da se je nukleotidna zamenjava izrazila v zamenjavi aminokisline s povsem drugačnim značajem, pa sprememba polarnosti aminokisline ni bistveno vplivala na *N*-glikozilacijo na mestu 56, ki je ključnega pomena za infektivnost virusa EAV in je pri vseh aminokislinskih zaporedjih iz PI 068 ostalo ohranjeno (Slika 4-41).

Tabela 4-11: Primerjava nukleotidnih zaporedij ORF5 in aminokislinskih zaporedij GP₅.

		Razlike v nukleotidih (dolžina 495 nukleotidov)		Razlike v aminokislinah (dolžina 165 aminokislin)				Selekcija
Seva	Časovno obdobje (v letih) ^a	Število	Odstotek	Število	Odstotek	Zamenjava	Polarnost aminokislin ^b	Ka/Ks
168-01 vs. 168-07	6	17	2,8	7	4,2	V ₁ (69 M>A) V ₁ (84 Y>H) V ₁ (87 S>P) V ₁ (90 V>T) V ₁ (104 D>G) V ₁ (115 E>G) V ₂ (141 A>V)	I II>III II>I I>II III>I III>I I	0,329
213-02 vs. 213-07	5	11	2,2	4	2,4	C ₁ (51 T>I) V ₁ (78 T>I) V ₁ (79 G>D) V ₁ (85 F>S)	II>I II>I I>III I>II	0,166
987-01 vs. 987-05	4	40	8	20	12,1	C ₁ (60 N>S) V ₁ (61 P>S), (70 E>D) V ₁ (73 V>I), (79 D>G) V ₁ (84 Q>Y), (85 S>A) V ₁ (90 V>L), (99 Y>I) V ₁ (100 T>N), (104 R>P) V ₁ (106 F>M), (107 P>A) V ₁ (115 A>E), (118 V>I) V ₁ (121 M>F) V ₂ (144 V>I), (166 L>M) V ₂ (173 F>L), (178 F>I)	II I>II, III I, III>I II, II>I I, II>I II, III>I I, I I>III, I I, I I, I I, I	0,449
031-03 vs. 031-05	2	15	3	4	2,4	V ₁ (61 P>S) V ₁ (84 Y>H) V ₂ (144 V>I) V ₂ (174 V>I)	I>II II>III I I	0,098
068-03 vs. 068-05	2	7	1,5	6	3,6	C ₁ (50 R>H), (59 T>I) V ₁ (70 D>E), (81 S>N) V ₁ (100 K>R), (104 N>D)	III, II>I III, II III, II>III	1,717

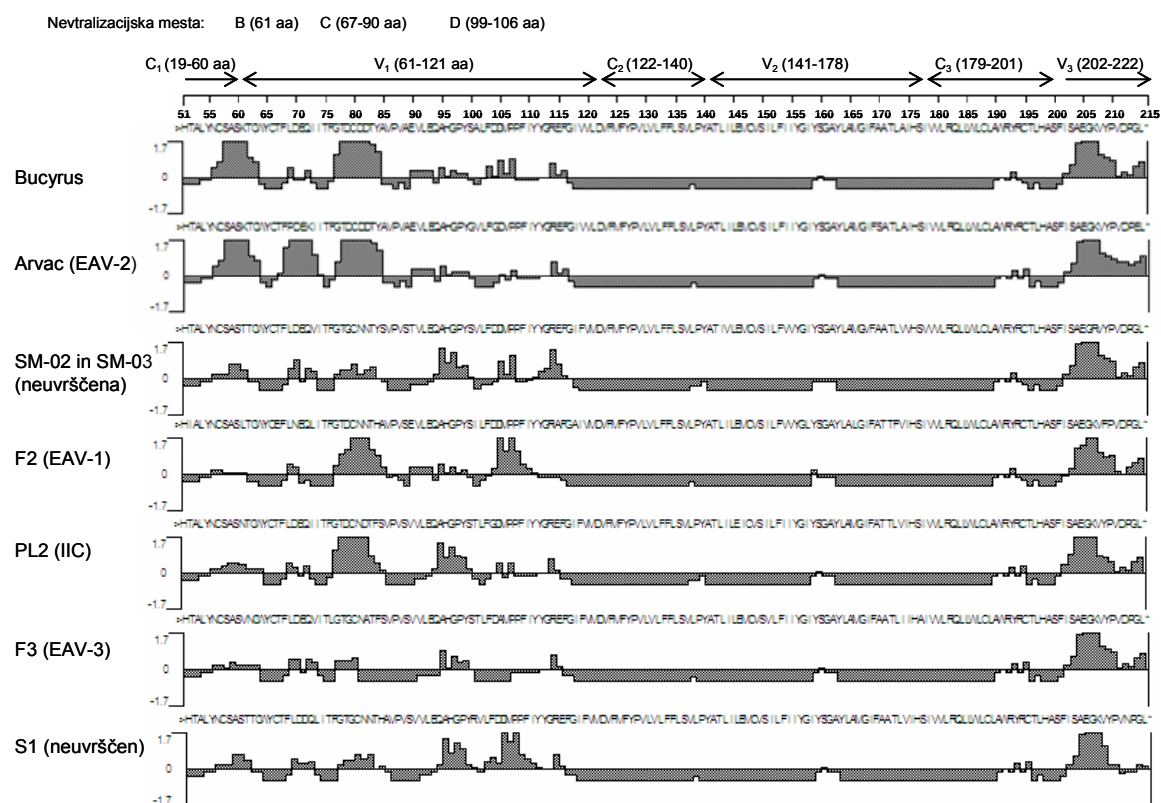
^a Časovni razmak med odvzemoma vzorcev semen.

^b I – nepolarne aminokisline, II – polarne, nenabite aminokisline in III – polarne, nabite aminokisline.

4.3.3.2.1 Napoved antigenskih determinant in sekundarne strukture glikoproteina GP₅

Znano je, da spremembe aminokislin na nevtralizacijskih mestih B (61 aa), C (67-90 aa) in D (99-106 aa) v variabilnem področju V₁ vplivajo na pojav antigenskih variacij, ki se izrazijo na drugi polovici N-terminalne zunanje hidrofilne domene GP₅, kjer se nahajajo poglavitni nevtralizacijski epitopi, kar lahko vodi do nastanka novih fenotipskih variant virusa EAV.

Izolat virusa EAV iz različnih genetskih skupin smo na osnovi aminokislinskih zaporedij z uporabo algoritma Jameson in Wolf napovedali antigenski profil. Kot prikazuje slika 4-44, je iz primerjave antigenskih profilov razvidno, da se izolati virusa EAV razlikujejo med seboj tudi po antigenem profilu, predvsem v regiji V₁. Področja v regiji V₁, kjer smo identificirali antigenske determinante, so v večini primerov povezana s področji, kjer se nahajajo nevtralizacijski epitopi B, C in D.

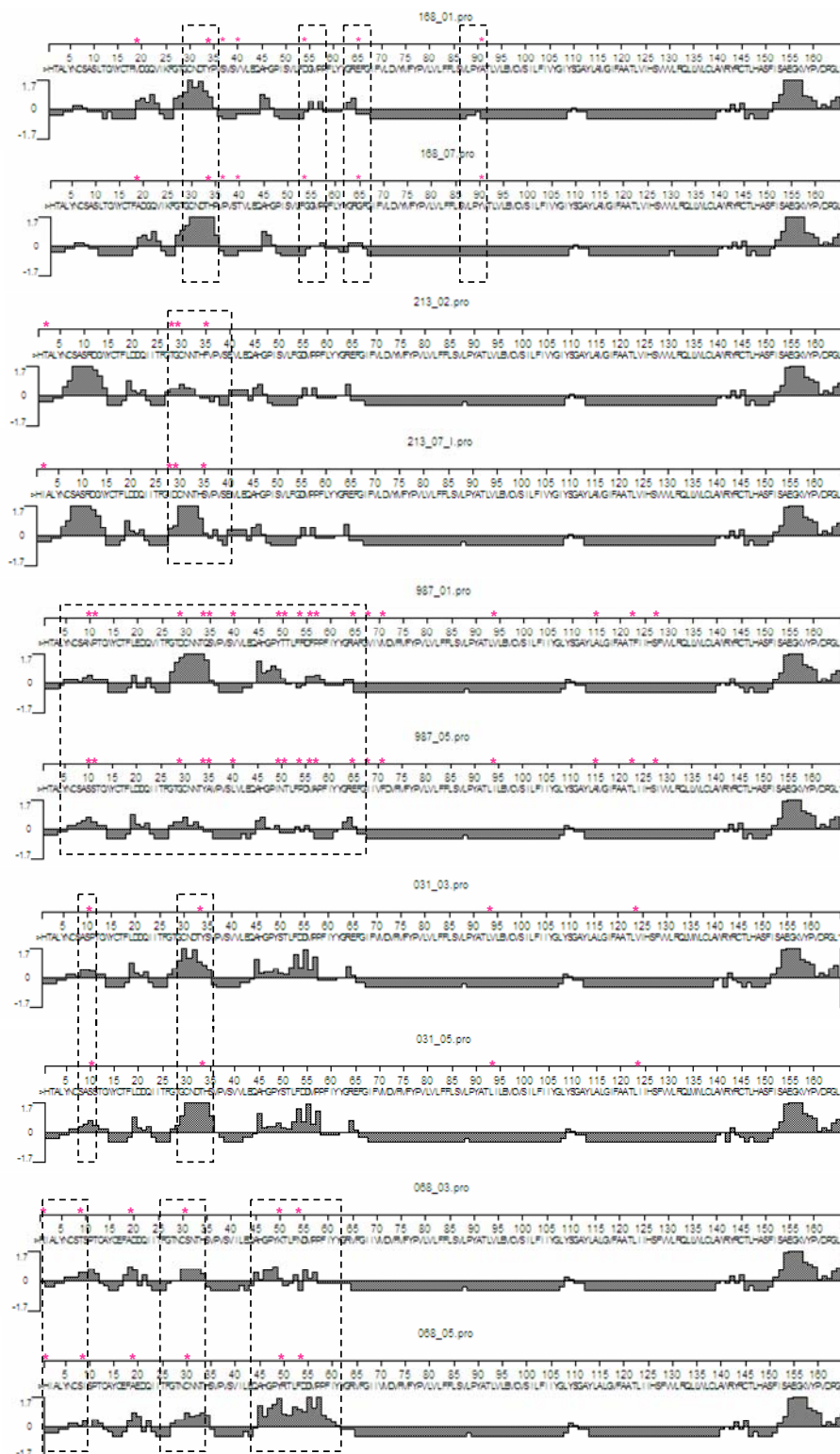


Slika 4-44: Primerjava napovedi antigenskih lastnosti glikoproteina GP₅ za izolate virusa EAV iz različnih genetskih skupin in za neuvrščene izolate SM-02, SM-03 in S1. Napoved antigenskih determinant smo izdelali z algoritmom Jameson in Wolf (1988). Antigenske determinante so predstavljene kot vrhovi obrnjeni navzgor od abscise, ki poteka skozi vrednost 0.

V analizo antigenskih napovedi smo zajeli tudi prevedena aminokislinska zaporedja virusov EAV, ki smo jih dokazali v vzorcih semena PI iz reje A. Iz grafičnih prikazov antigenskih napovedi je razbrati, da se nesinonimne zamenjave v nukleotidnih zaporedjih, dokazanih v vzorcih semena, ki so bila istemu PI odvzeta s časovnim presledkom dveh ali več let, izražajo tudi kot spremembe v antigenskih determinantah (Slika 4-45).

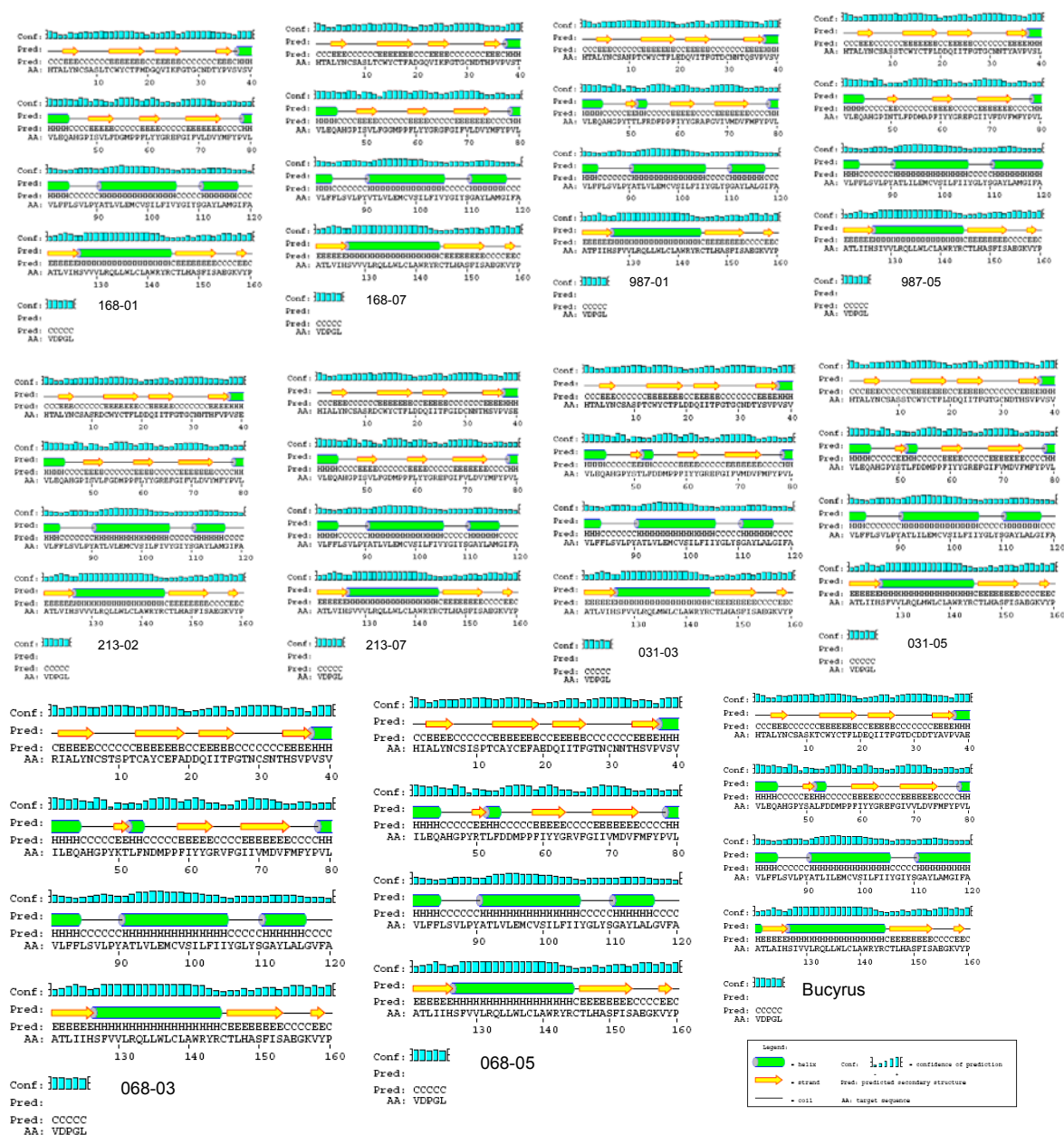
Pri večini aminokislinskih zaporedij PI iz reje A so spremembe omejene predvsem na področje antigenskih determinant v regiji V₁.

Opazili smo, da so spremembe v hidrofobnosti aminokislin (iz skupin II in III v skupino I in obratno) (Tabela 4-11) pogosteje povzročile očitno spremembo v obliki, višini in usmerjenosti posameznega vrha na mestu napovedanih antigenskih determinant (Slika 4-45). Zanimivo je, da omenjene spremembe napovedanih antigenskih determinant zaznamo tudi v področjih, kjer so aminokisliline, kljub zamenjavi, ohranile svoj hidrofobni ali hidrofilni značaj. Ohranjenost hidrofilnih aminokislinskih ostankov smo zasledili na mestu 84 v aminokislinskem zaporedju seva 168-07 (His iz skupine III) in 987-05 (Tyr iz skupine II). Pri slednjem smo opazili, da sta se na mestih 106 (Met iz skupine I) in 107 (Ala iz skupine I) ohranila aminokislinska ostanka s hidrofobnim značajem. Zamenjava aminokisliline Tyr>His (II>III) na mestu 84 je imela pri sevu 031-05 popolnoma enak vpliv na spremembo antigenkega profila kot pri sevu 168-07 (Slika 4-45). Kljub ohranjenosti hidrofilnih ostankov na mestih 81 (Asn iz skupine II) in 100 (Arg iz skupine III) smo pri sevu 068-05 na teh področjih in v njihovi najbližji okolici zaznali vpliv aminokislinskih zamenjav na spremembe antigenskih determinant. Spremembe antigenskih determinant segajo večkrat tudi v tista področja, kjer so aminokislinski ostanki med dvema primerjanima sevoma popolnoma identični (s prekinjeno črto uokvirjena področja na sliki 4-45). Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da na konformacijo antigenskih determinant vplivajo tudi interakcije med oddaljenimi aminokislinami.



Slika 4-45: Napovedi antigenskih lastnosti glikoproteina GP₅ za kraške seve virusa EAV. Z zvezdicami so v aminokislinskih zaporedjih med dvema primerjanima zaporedjema kraških sevov virusa EAV označena polimorfna mesta. Območja večjih sprememb v antigenskih lastnostih so uokvirjena.

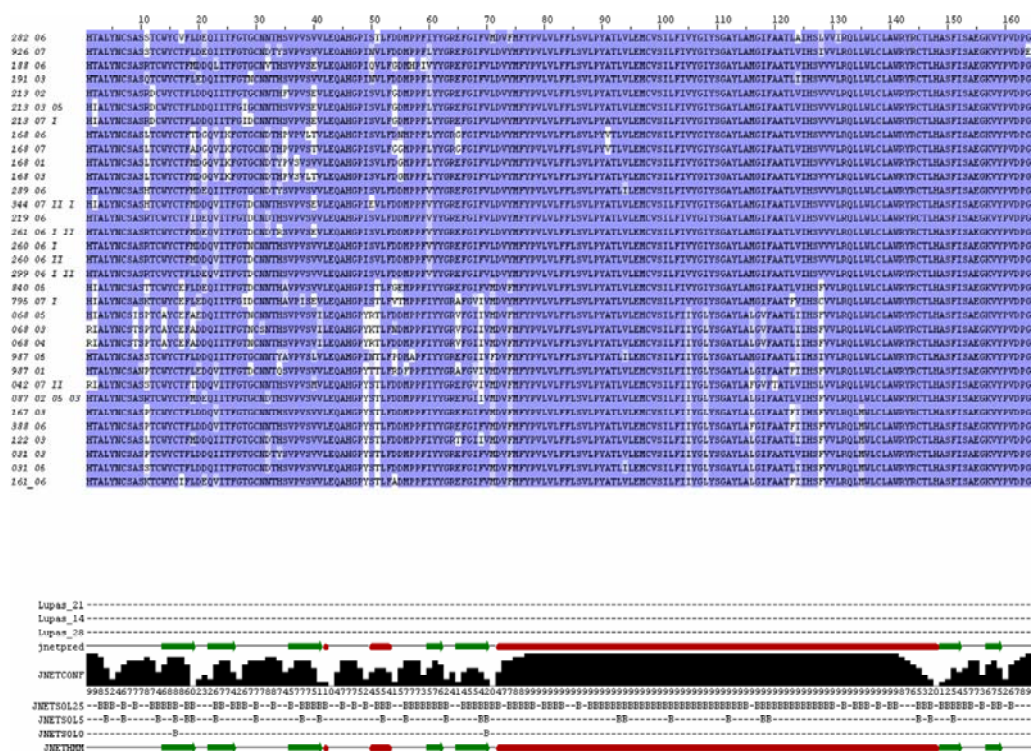
Ne glede na spremembe v področjih antigenskih determinant pa so bili elementi sekundarne strukture pri vseh v napoved vključenih aminokislinskih zaporedjih ohranjeni (Slika 4-46).



Slika 4-46: Ohranjenost elementov sekundarne strukture (vijačnice α in strukture β), ki smo jo za vsako aminokislinsko zaporedje napovedali s programom PSIPRED.

S programom PSIPRED, ki napoveduje sekundarne strukture s 76,5-odstotno zanesljivostjo, smo za GP₅ kraških sevov virusa EAV napovedali 5 vijačnic α in 9 struktur β . Zaradi prekratkih napovedanih elementov sekundarne strukture (vijačnica α na mestih aminokislin 52-53 pri aminokislinskih zaporedjih 987-01, 031-03, 031-05, 068-03, 068-05 in Bucyrus na

sliki 4-46 vijačnica α mora vsebovati najmanj tri aminokisline) in dokaj nizke zanesljivosti rezultatov napovedi smo napoved sekundarne strukture preučevanega glikoproteina GP₅ izvedli tudi z uporabo metastrežnika Jpred (v3) (<http://compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>) (Cole in sod., 2008). Sekundarno strukturo glikoproteina GP₅ smo napovedali iz poravnanih aminokislinskih zaporedij kraških sevov virusa EAV (Slika 4-47).



Slika 4-47: Napoved sekundarne strukture glikoproteina GP₅ iz poravnave aminokislinskih zaporedij z metastrežnikom Jpred 3.

Z 81,5-odstotno zanesljivostjo lahko napovemo, da se v področju od 50. do 215. aminokisline v GP₅ pri kraških sevih virusa EAV nahajata 2 vijačnici α in 7 struktur β . Ugotovili smo, da ena izmed napovedanih vijačnic α zavzema aminokisline na mestih 50–53, ter razrešili dilemo glede sekundarne strukture na mestih aminokislin 52–53, kjer je bila s programom Jpred napovedana vijačnica α z dokaj nizko zanesljivostjo.

4.4 BIOLOŠKE ZNAČILNOSTI SLOVENSКИH IZOLATOV VIRUSA EAV

4.4.1 Rast virusa EAV v celični kulturi RK-13

4.4.1.1 Izolacija virusa EAV iz semena

4.4.1.1.1 Vzorci semena žrebcev pasme lipicanec iz reje A na slovenskem Krasu

Med letoma 2001 in 2005 smo s klasično virološko diagnostiko izolacije virusa v celični kulturi testirali skupno 35 vzorcev semena, ki so jih odvzeli devetnajstim serološko pozitivnim žrebcom iz reje A. Od teh je bilo deset PI (v tabeli 4-12 so označeni z zeleno barvo), dva žrebca (122 in 177), ki so jima do leta 2008 odvzeli seme le enkrat in pri katerih smo z metodo RT-PCR (122) ali »semi-nested« PCR (177) dokazali virus EAV v semenu, in sedem serološko pozitivnih žrebcev (103, 001, 246, 235, 947, 250 in 847), ki so se v preteklosti že okužili z virusom EAV, vendar ga niso izločali s semenom.

Z molekularnimi metodami smo nukleinsko kislino virusa EAV dokazali v vzorcih semena vseh PI kot tudi v vzorcih semena žrebcev 122 in 177, ki smo ju uvrstili v kategorijo domnevnih izločevalcev (Tabela 4-12).

Od skupno 28 testiranih vzorcev semena, v katerih je bil virus EAV predhodno potrjen z molekularnimi metodami, smo virus EAV izolirali le iz štirinajstih (50 %) vzorcev, ki so v tabeli 4-12 označeni z rožnato barvo.

Uspešnost izolacije virusa EAV iz semena v celični kulturi RK-13 smo preverili tudi s klasično metodo RT-PCR. Virusno RNA, ki smo jo iz sloja inokuliranih celic RK-13 ali iz gojišča nad slojem izolirali s Trizolom, smo pomnožili s paroma začetnih oligonukleotidov EAV7.53F/12644N (ORF7) in EAV11/EAV12 (ORF1b).

Za vzorce semena sedmih serološko pozitivnih žrebcev so bili rezultati testiranja z molekularno in klasično virološko metodo enaki. Oba testa sta bila negativna pri vseh sedmih vzorcih (Tabela 4-12).

Rast izolata 068-05

Prve citopatske spremembe smo opazili tretji dan po inokulaciji 1 ml supernatanta semena 068-05, ki je bil predhodno razredčen s transportnim gojiščem v razmerju 1:2. V steklenici, v katero smo inokulirali supernatant semena, razredčenega v razmerju 1:10 (-1), je večina celic RK-13 plavala v gojišču, medtem ko v steklenicah s supernatantom semena, ki smo ga razredčili v razmerju 1:100 (-2) in 1:1000 (-3), citopatskega efekta tretji dan še nismo ugotovili.

Deseti dan inkubacije pri 37 °C so se tudi v celični kulturi inokulirani s supernatantom semena razredčenega 1:100 pojavile citopatske spremembe. Integriteta celičnega sloja je ostala ohranjena, v gojišču pa smo opazili nekaj piknotičnih celic okrogle oblike.

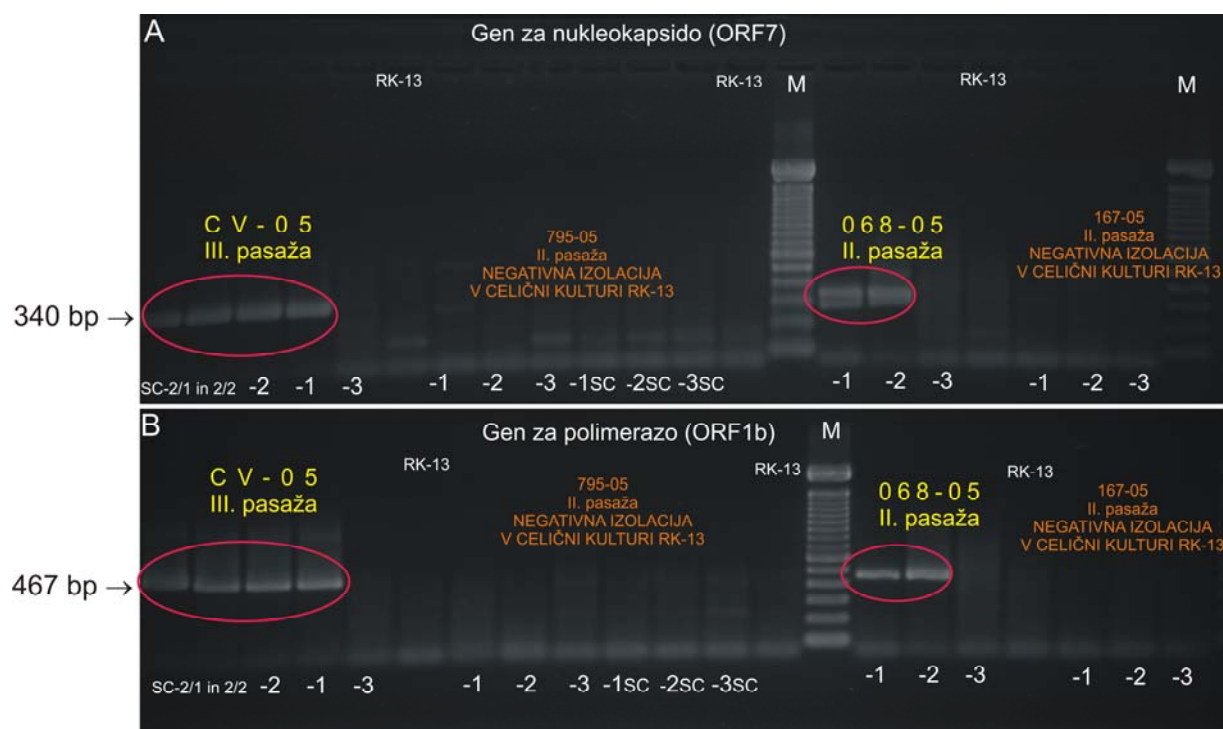
Pri razredčini supernatanta semena 1:1000 tudi po drugi pasaži nismo opazili citopatskih sprememb.

Izolat 068-05 (1:10 in 1:100) smo po prvi pasaži potrdili tudi z indirektnim imunoperoksidaznim testom.

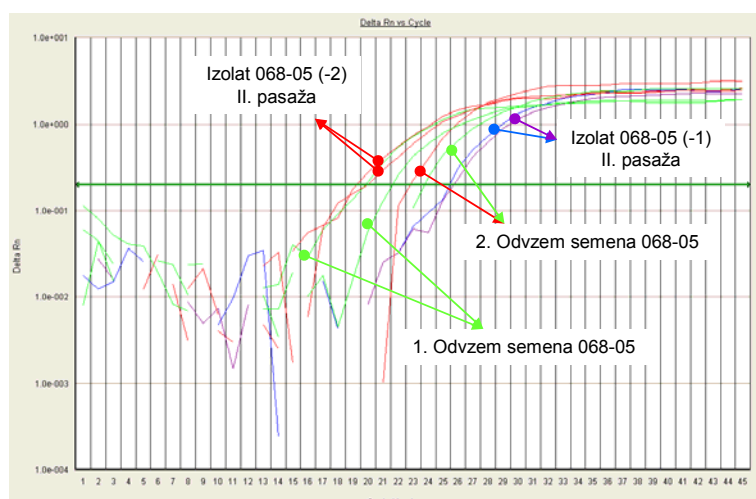
Prav tako smo izolat 068-05, ki smo ga še dodatno namnožili v drugi pasaži, dokazali tudi s klasično metodo RT-PCR (Slika 4-48) in RT-PCR v realnem času (Slika 4-49).

Kot je razvidno iz slike 4-49, je bila relativna količina v celični kulturi namnoženega izolata 068-05 po drugi pasaži večja pri razredčini 1:100 kot pri razredčini 1:10, iz tega lahko sklepamo, da se pri razredčini 1:10 virusni sev 068-05 ni več razmnoževal. Nekroza in/ali apoptoza je pri razredčini 1:10 zajela celoten sloj celic RK-13, na novo nastali virusi 068-05, ki so se sprostili iz celic v gojišče, pa niso imeli na razpolago živih celic, v katerih bi se lahko razmnoževali, in so začeli propadati.

Tudi iz rezultatov elektroforeze v agaroznem gelu (Slika 4-48 B) lahko iz razlike v intenziteti sevanja UV-svetlobe produktov RT-PCR ocenimo, da je relativna količina namnoženega izolata 068-05 večja pri razredčini 1:100.



Slika 4-48: Dokazovanje produktov RT-PCR v agaroznem gelu. (A) Rezultati reakcije RT-PCR s parom začetnih oligonukleotidov EAV7.53F/12644N (ORF7). (B) Rezultati reakcije RT-PCR s parom začetnih oligonukleotidov EAV11/EAV12 (ORF1b). Z rožnato barvo so označeni produkti RT-PCR izolatov CV-05 in 068-05. M-standard DNA velikosti 100 bp, RK-13-negativna kontrola, SC-sloj celic, 2/1 – prvi odvzem semena in 2/2 – drugi odvzem semena. Prikazane so logaritemske vrednosti razredčin semena od -1 do -3 (od 1:10 do 1:1000), ki so nam služile za inokulacijo celične kulture RK-13.



Slika 4-49: Rezultat pomnoževanja RNA izolirane iz vzorcev semena PI 068 (prvi in drugi odvzem) in RNA izolirane iz celičnih kultur, v katerih se je razmnoževal izolat 068-05.

4.4.1.1.2 Vzorci semena žrebcev različnih pasem iz zasebnih rej

Skupno smo pregledali 11 vzorcev semena. V semenu štirih kasačev (36 %) (AM-01, SL-03, SM-03 in CV-05) smo virus EAV dokazali z metodo izolacije virusa v celični kulturi RK-13 (Tabela 4-13). Pri vseh 11 omenjenih vzorcih semena so bili rezultati molekularnega testiranja pozitivni.

Rast izolata CV-05

Citopatske spremembe so se začele pojavljati četrti dan po inokulaciji supernatanta semena pri razredčini 1:10 in 1:100. Celice, ki so postale okrogle, napihnjenega videza z izraženo celično membrano, so se združevale v grozdaste skupke. Nekaj celic se je odluščilo od podlage, sicer pa je bil sloj ohranjen.

Nukleokapsidni antigen izolata CV-05 smo dokazali z monoklonskimi protitelesi v indirektnem imunoperoksidaznem testu v prvi pasaži.

Z metodo RT-PCR smo uspešno pomnožili odseka v genu za ORF7 in ORF1b nukleinske kisline izolata CV-05 (Slika 4-48).

Rast izolata CV-05 v celični kulturi RK-13 smo potrdili tudi z RT-PCR v realnem času (ni prikazano).

4.4.1.2 Testiranje vzorcev semena in serumov z nevtralizacijskim testom

Eden izmed možnih razlogov za negativen rezultat metode izolacije virusa EAV bi lahko bila nevtralizacijska protitelesa, ki se nahajajo v semenu. Izhajajoč iz delovne hipoteze, v kateri smo predpostavili vpliv nevtralizacijskih protiteles na izid metode izolacije v celični kulturi, smo v vzorcih semena serološko pozitivnih žrebcev ugotavljali titer nevtralizacijskih protiteles.

Testirali smo 35 vzorcev semena, ki so jih odvzeli devetnajstim serološko pozitivnim žrebcom iz reje A (Tabela 4-12), in 11 vzorcev semena, ki so jih odvzeli serološko pozitivnim žrebcom različnih pasem iz zasebnih rej (Tabela 4-13).

Tabela 4-12: Titer nevtralizacijskih protiteles proti virusu EAV v serumu in semenu žrebcev iz reje A.

Pasma	Leto rojstva	Oznaka žrebca	Leto odvzema	Serum	Seme
				Titer protiteles	
lipicanec	1992	087	2002	1:1024	1:2048
			2003	1:1024	1:128
			2004	≥ 1:512	1:64
			2005	1:2048	1:64
	1988	990	2001	≥ 1:8192	1:16
			2002	1:4096	1:128
			2003	1:2048	1:32
			2004	1:512	1:128
	1997	213	2002	1:2048	1:64
			2003	1:4096	1:64
			2004	1:128	1:64
			2005	1:4048	1:32
	1988	987	2001	1:1024	1:32
			2004	≥ 1:512	1:256
			2005	≥ 1:512	1:64
	1990	031	2004	≥ 1:128	1:64
			2005	≥ 1:512	1:64
	1991	068	2004	1:128	1:64
			2005	≥ 1:512	1:128
	1995	167	2004	1:32	1:32
			2005	1:256	1:64
	1996	168	2001	1:512	1:32
			2006	1:16	Neg.
	1981	795	2004	1:128	1:64
			2005	1:256	1:128
	1983	840	2005	≥ 1:512	1:16
	1994	122	2003	1:1024	1:256
	1996	177 ^{sn+}	2005	≥ 1:512	1:4
	1993	103*	2005	≥ 1:512	1:8
	1989	001*	2005	≥ 1:512	Neg.
	1998	246*	2005	≥ 1:512	1:8
	1998	235*	2005	≥ 1:512	1:8
	1987	947*	2005	≥ 1:512	1:4
	1998	250*	2005	≥ 1:512	Neg.
	1983	847*	2005	≥ 1:512	Neg.

Neg. = negativno, (*) = negativno z metodo RT-PCR, (^{sn+}) = pozitivno z metodo »semi-nested« PCR.

Z rožnato barvo so označena semena, iz katerih smo v celični kulturi RK-13 z vzdrževalnim gojiščem izolirali virus EAV, protein nukleokapside pa smo dokazali z indirektnim imunoperoksidaznim testom.

Serološka analiza je pokazala, da so bili titri nevtralizacijskih protiteles proti virusu EAV v serumu višji kot v semenu. Vsi vzorci semena PI so vsebovali nevtralizacijska protitelesa proti virusu EAV. Izjema je bil vzorec semena 168-06, ki je v NT reagiral negativno. Nevtralizacijskih protiteles proti virusu EAV nismo dokazali v vzorcih semena žrebcev 001, 250 in 847, pri katerih so bila vsa testiranja z molekularnimi in klasično virološko metodo izolacije virusa v celični kulturi negativna.

Testiranja vzorcev semena ostalih serološko pozitivnih žrebcev 103, 246, 235 in 947, ki ne izločajo virusa EAV s semenom, so pokazala, da so v teh vzorcih titri nevtralizacijskih protiteles dokaj nizki ($\leq 1:8$).

Relativno visoki titri nevtralizacijskih protiteles v semenu PI (v semenu 087-02 je titer nevtralizacijskih protiteles dosegel vrednost 1:2048) kažejo na to, da gre pri PI za trajno razmnoževanje virusa EAV v akcesornih spolnih žlezah.

Tudi v vzorcih semena žrebcev iz zasebnih rej smo ugotovili nevtralizacijska protitelesa proti virusu EAV (Tabela 4-13).

Tabela 4-13: Titer nevtralizacijskih protiteles proti virusu EAV v serumu in semenu žrebcev iz zasebnih rej.

Pasma	Leto rojstva	Kraj rojstva	Oznaka žrebca	Leto odvzema	Serum	Seme
					Titer protiteles	
ameriški kasač	1995	Lexington, ZDA	AM	2001	1:512	1:32
	1987	New Jersey, ZDA	SL	2002	$\geq 1:8$	1:64
				2003	$\geq 1:512$	1:128
finski kasač	1988	Helsinki, Finska	SM	2002	$\geq 1:8$	1:128
				2003	$\geq 1:512$	1:128
nemški kasač	1990	Lauenburg, Nemčija	TA	2001	$\geq 1:8$	1:128
	1995	Dinslaken, Nemčija	IW	2005	1:512	1:16
slovenski kasač	1997	Slovenija	PG	2005	$\geq 1:32$	1:128
	1999	Slovenija	CV	2005	1:8	1:64
bavarski toplokrvni konj	1980	Nemčija	RA	2005	$\geq 1:4096$	1:64
nizozemski toplokrvni konj	1994	Nizozemska	ID	2004	$\geq 1:16$	1:32

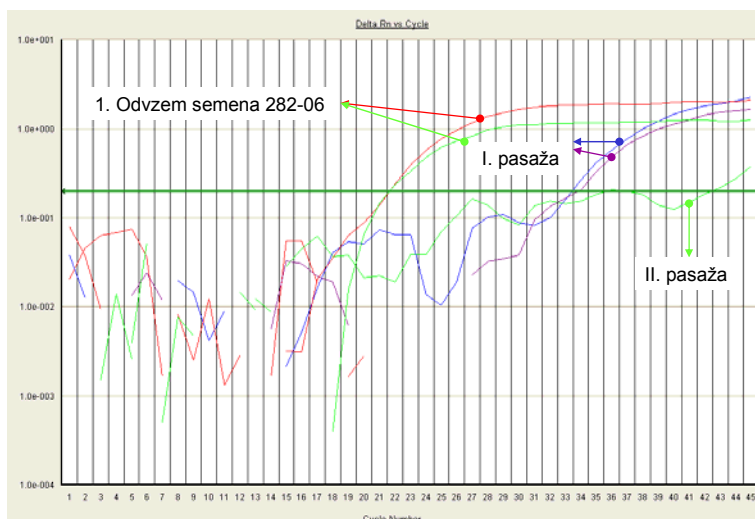
Z rožnato barvo so označena semena, iz katerih smo v celični kulturi RK-13 z vzdrževalnim gojiščem izolirali virus EAV, protein nukleokapside pa smo dokazali z indirektnim imunoperoksidaznim testom.

Dejstvo, da smo iz supernatanta vzorcev semena 068-05 in CV-05 kljub nevtralizacijskim protitelesom (1:128 in 1:64) uspeli namnožiti virus EAV, nakazuje, da specifična protitelesa proti virusu EAV v semenu ne vplivajo na izid izolacije virusa v celični kulturi.

4.4.1.3 Izolacija virusa EAV iz semena v celični kulturi RK-13 z gojiščem, ki vsebuje CMC

V okviru programa eradikacije KAK v reji A smo na virus EAV testirali 70 vzorcev semena 35 serološko pozitivnih žrebcev. Z molekularnimi metodami smo virusno nukleinsko kislino dokazali v 20 (28,5 %) vzorcih semena, ki so jih odvzeli desetim žrebcom (prvi in drugi odvzem). Vse vzorce semena, ki so dali pozitiven rezultat z RT-PCR in z RT-PCR v realnem času, smo inokulirali v celično kulturo RK-13. Za razliko od molekularnih metod, se metoda izolacije virusa v celični kulturi RK-13 z vzdrževalnim gojiščem brez CMC, ki smo jo izvajali po postopku opisanem v točki 3.2.7.1.1, ni izkazala za uspešno. Iz omenjenih vzorcev semena nismo uspeli pridobiti nobenega izolata virusa EAV.

Iz slike 4-50 je razvidno, da se virus EAV, katerega nukleinsko kislino smo v vzorcu semena 282-06 dokazali z RT-PCR v realnem času, v celični kulturi RK-13 ni razmnoževal. Krivulje v diagramu pomnoževanja kažejo, da se je količina virusne nukleinske kisline, ki smo jo dokazali v gojišču nad celičnim slojem iz prve do druge pasaže, zmanjšala. Vrednost Ct druge pasaže je večja od vrednosti Ct prve pasaže, iz česar lahko sklepamo na manjšo koncentracijo virusa EAV v drugi pasaži.

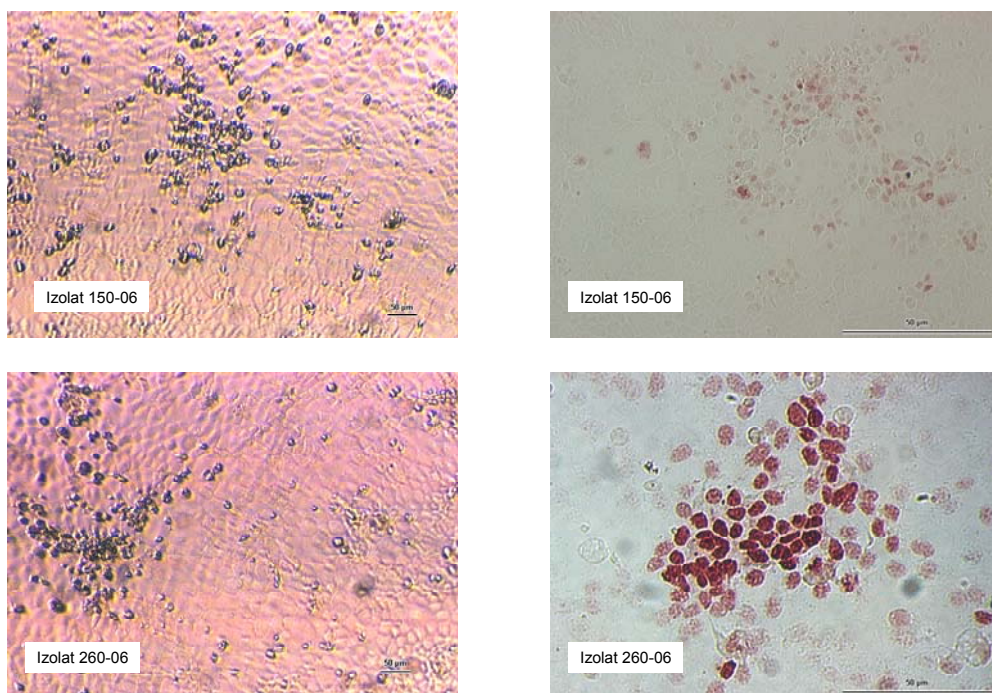


Slika 4-50: Rezultat pomnoževanja z RT-PCR v realnem času. Na diagramu pomnoževanja je prikazan primer, ko z metodo izolacije v celični kulturi RK-13 z vzdrževalnim gojiščem brez CMC virusa EAV iz vzorca semena 282-06 nismo uspeli namnožiti.

Iz 20 vzorcev semena, ki smo jih z molekularnimi metodami določili kot pozitivne, nismo uspeli pridobiti nobenega izolata virusa EAV, zato smo 8 vzorcev semena (prvi in drugi odvzem) štirih serološko pozitivnih žrebcev (150, 260, 388 in 282) poslali v analizo v laboratorij Labor Dr. Böse GmbH (Harsum, Nemčija). Z uporabo vzdrževalnega gojišča, ki je vsebovalo 0,75 % CMC, so uspeli izolirati virus EAV iz vseh osmih vzorcev semena (V Prilogi A so izvidi prvih odvzemov vzorcev semena 150-06, 260-06, 388-06 in 282-06).

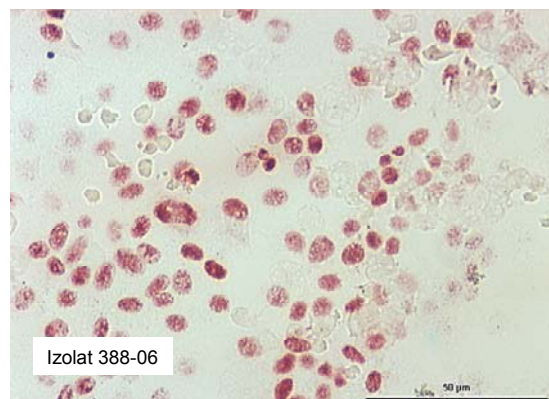
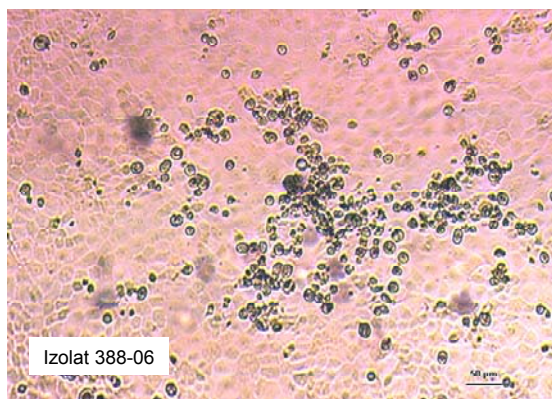
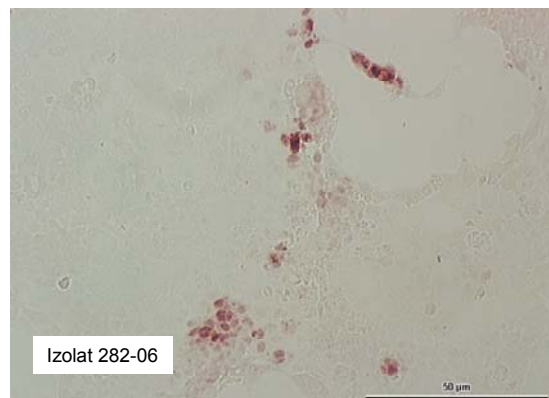
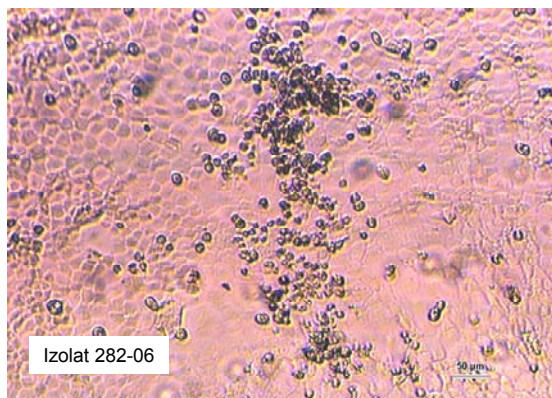
V nadaljevanju smo tudi v našem laboratoriju uvedli gojišče s CMC in uspeli izolirati virus EAV iz vseh štirih vzorcev semena kraških žrebcev. V testiranje smo vključili tudi vzorec prvega odvzema semena BG-07_I, ki so ga odvzeli švedskemu kasaču BG. Pri njem smo potrdili genotip EAV-1 (Slike 4-38, 4-39 in 4-40), s katerim smo želeli preveriti vpliv genotipa virusa EAV na uspešnost izolacije.

Z novo metodo izolacije virusa EAV v celični kulturi RK-13, pri kateri smo uporabili vzdrževalno gojišče s CMC, smo v celični kulturi uspeli pridobiti izolate virusa EAV iz vseh vzorcev semena. Izolate smo potrdili z monoklonskimi protitelesi proti nukleoproteinu virusa EAV v indirektnem imunoperoksidaznem testu (Slike 4-51, 4-52 in 4-53).



Slika 4-51: Prikaz celične kulture RK-13 deseti dan po inokulaciji vzorcev semena na ravni svetlobne mikroskopije. Slikano pri 100-kratni povečavi z mikroskopom Microphot-FXA (Nikon). Citopatske spremembe so vidne v obliki grozdastih skupkov okroglih celic (levo). Izolate smo potrdili z indirektnim imunoperoksidaznim testom (desno).

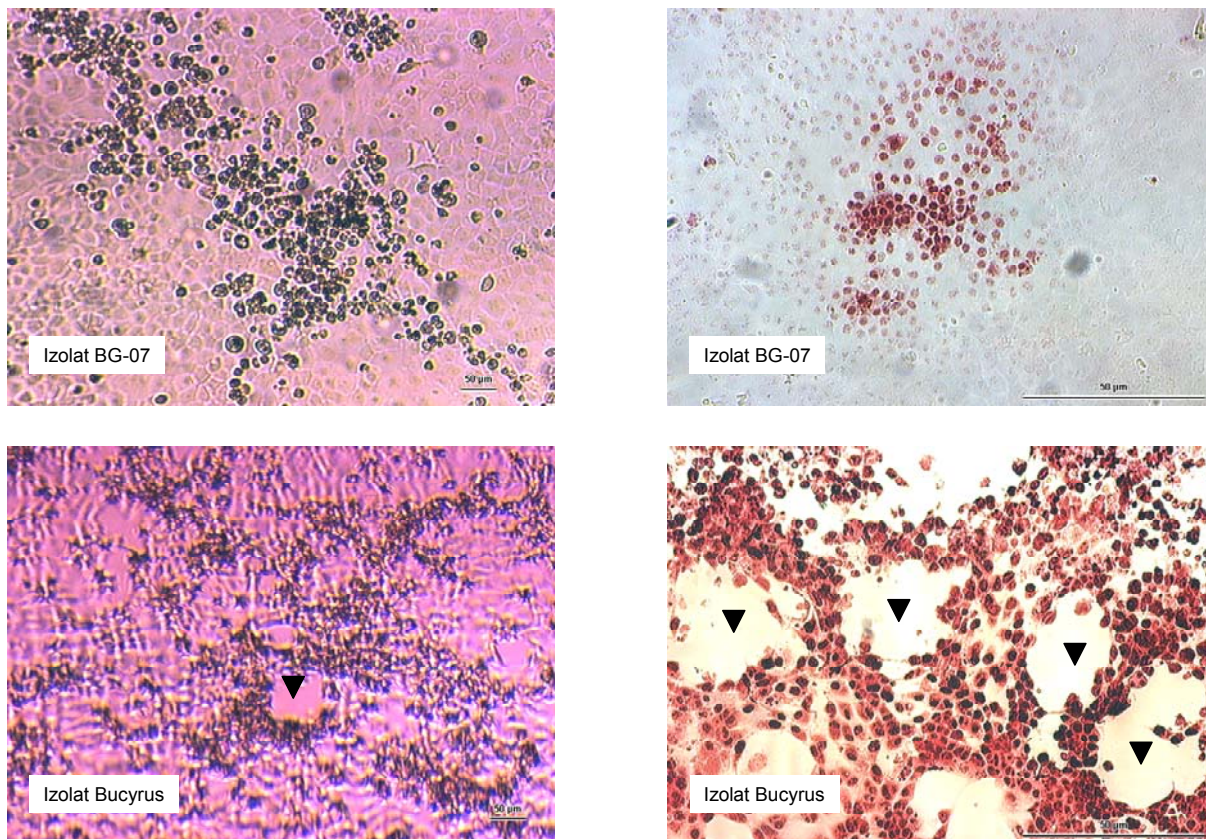
Izolata 150-06 in 260-06 sta v celični kulturi RK-13 povzročila prve citopatske spremembe sedmi dan po inokulaciji. Izolat 150-06 je zrasel v eni jamici pri razredčini semena 1:10, medtem ko je izolat 260-06 povzročil citopatske spremembe v obeh jamicah pri razredčini semena 1:10 in 1:100.



Slika 4-52: Prikaz celične kulture RK-13 deseti dan po inokulaciji vzorcev semena na ravni svetlobne mikroskopije. Slikano pri 100-kratni povečavi z mikroskopom Microphot-FXA (Nikon). Citopatske spremembe so vidne v obliki grozdstih skupkov okroglih celic (levo). Izolate smo potrdili z indirektnim imunoperoksidaznim testom (desno).

Prve citopatske spremembe, ki jih je povzročil izolat 282-06, smo opazili že četrti dan po inokulaciji pri razredčini semena 1:100. Sedmi dan po inokulaciji smo citopatske spremembe zaznali tudi pri razredčinah semena 1:10 in 1:1000.

Tudi pri izolatu 388-06 smo prve citopatske spremembe opazili sedmi dan po inokulaciji. Slednje so bile najbolj izražene v obeh jamicah pri razredčini semena 1:100, prizadet pa je bil tudi sloj celic v eni izmed obeh jamic, v kateri smo inokulirali vzorca razredčine semena 1:1000. Razredčina semena 1:10 je bila za celice RK-13 toksična. Toksični učinek semena na celice RK-13 se je izrazil že tretji dan po inokulaciji.

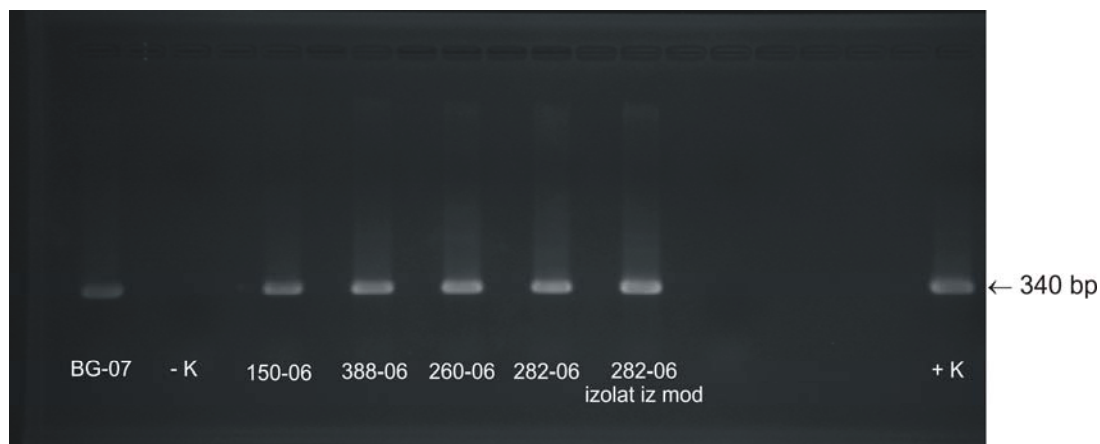


Slika 4-53: Prikaz celične kulture RK-13 deseti dan po inokulaciji vzorca semena BG-07 in referenčnega seva Bucyrus na ravni svetlobne mikroskopije. Slikano pri 100-kratni povečavi z mikroskopom Microphot-FXA (Nikon). Citopatske spremembe so bile pri izolatu BG-07 vidne v obliki grozdastih skupkov mehurčastih celic (levo), medtem ko smo v celični kulturi inficirani z referenčnim sevom Bucyrus opazili področja brez celic, ki so razpadle zaradi nekroze (črne puščice) (levo in desno). Izolate smo potrdili z indirektnim imunoperoksidaznim testom (desno).

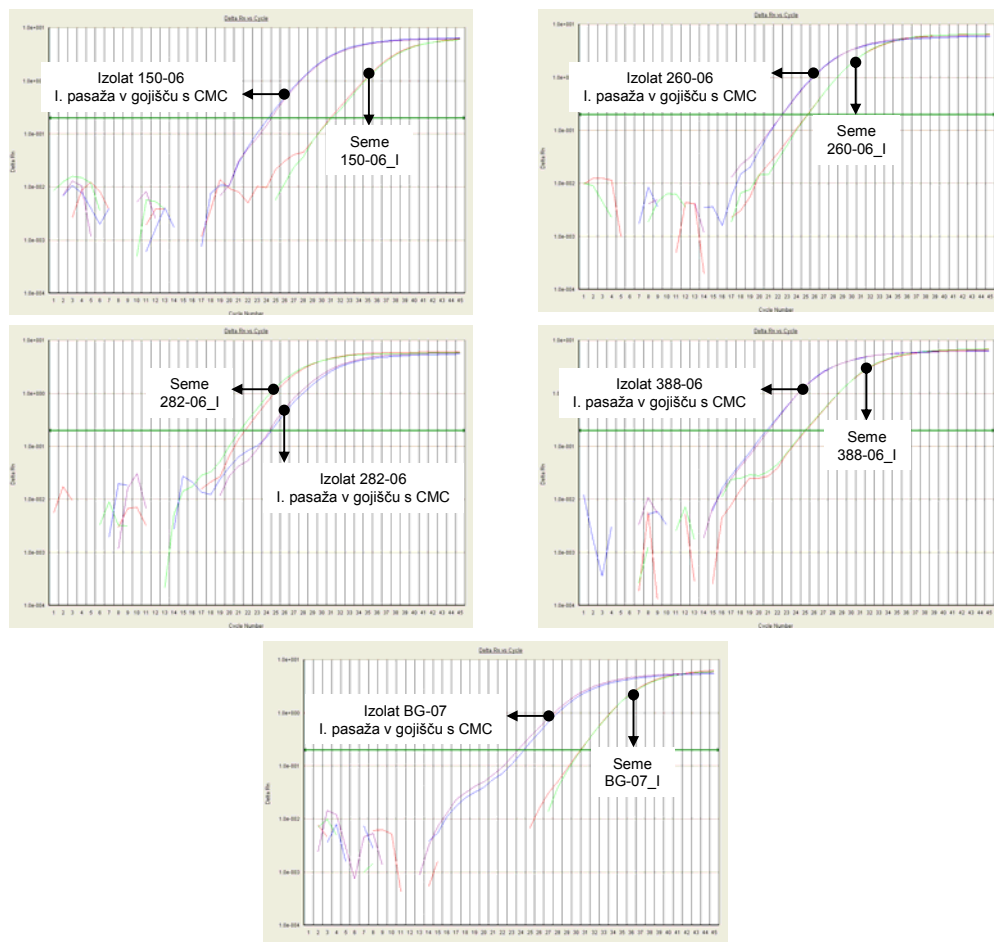
Pri razmnoževanju izolata BG-07 so se prve citopatske spremembe v celični kulturi RK-13 pokazale sedmi dan po inokulaciji. CPE smo opazili pri razredčinah semena 1:10 in 1:100.

Izolati 150-06, 260-06, 282-06 in 388-06 so v prvi pasaži povzročili prve citopatske spremembe peti dan po inokulaciji. Zanimivo je, da smo prve citopatske spremembe pri izolatu BG-07 opazili že tretji dan po inokulaciji. Iz tega bi lahko sklepali, da se je virus BG-07 iz semena švedskega kasača hitreje prilagodil na rast v celični kulturi RK-13 z vzdrževalnim gojiščem, ki vsebuje CMC, kot virusi iz ejakulatov kraških žrebcev.

Pridobljene izolate smo preverili tudi s klasično metodo RT-PCR in z RT-PCR v realnem času. Celokupno RNA smo izolirali iz supernatanta prve pasaže. Molekularni testi so bili pozitivni za vse omenjene izolate (Sliki 4-54 in 4-55).



Slika 4-54: Rezultati reakcije RT-PCR s parom začetnih oligonukleotidov EAV7.53F/12644N (ORF7) so bili pozitivni za vse izolate virusa EAV. – K – negativna kontrola reakcijske mešanice RT-PCR (H₂O-DEPC), + K – pozitivna kontrola (referenčni sev Bucyrus).



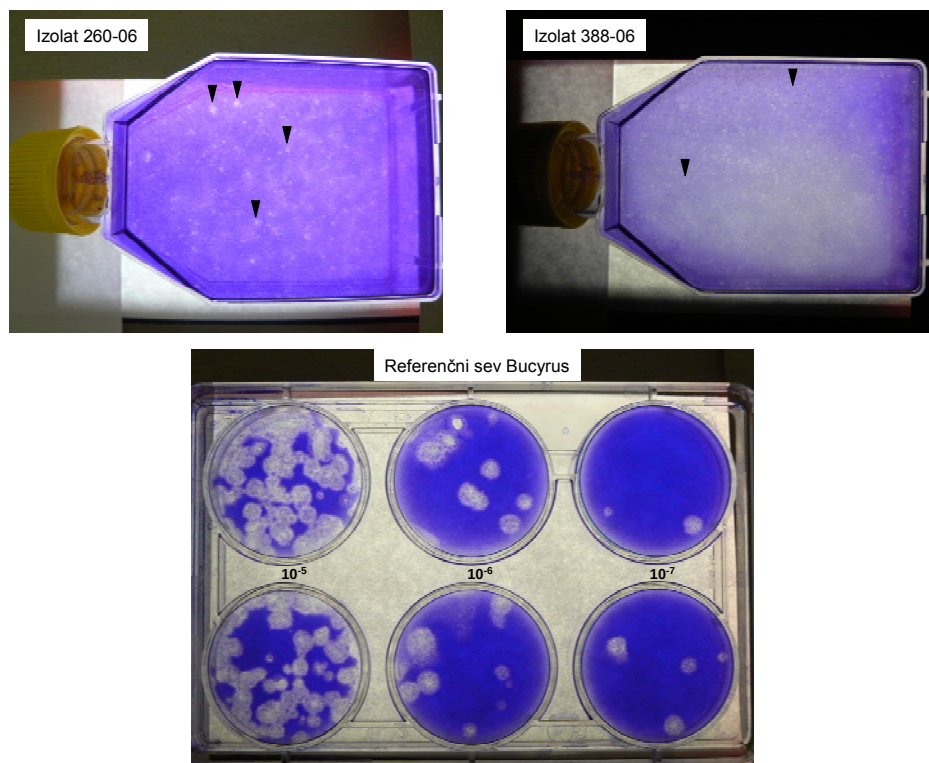
Slika 4-55: Rezultati pomnoževanja z RT-PCR v realnem času. Na diagramih pomnoževanja so prikazani primeri, pri katerih smo z uporabo vzdrževalnega gojišča s CMC iz vzorcev semena uspeli pridobiti izolate virusa EAV.

Iz podanih rezultatov lahko ocenimo, da je metoda izolacije virusa EAV z gojiščem, ki vsebuje CMC, bolj občutljiva in zanesljiva kot izolacija z gojiščem brez CMC.

4.4.1.4 Izolacija virusa EAV v celični kulturi RK-13 z gojiščem, ki vsebuje agarozo tipa VII

Zanimalo nas je, ali lahko virusi EAV (150-06, 260-06, 282-06 in 388-06), ki smo jih namnožili v celični kulturi RK-13 iz vzorcev semena žrebcev iz reje A, povzročijo litične poškodbe celičnega sloja (plake).

Supernatant iz prve pasaže smo inokulirali v celično kulturo RK-13. Razredčine 10^{-5} , 10^{-6} in 10^{-7} , ki smo jih v vzdrževalnem gojišču pripravili iz predhodno namnoženega referenčnega seva Bucyrus, smo uporabili za pozitivno kontrolo (Slika 4-56).



Slika 4-56: Primeri tvorbe plakov v celični kulturi RK-13. Slovenska izolata virusa EAV (zgoraj) in referenčni sev Bucyrus (spodaj).

Meritve niso pokazale nobenih razlik v premeru plakov med slovenskimi izolati virusa EAV, zato so rezultati prikazani samo za izolata 260-06 in 388-06 (Slika 4-56). Kot je razvidno iz slike 4-56, je razlika v velikosti plakov med slovenskima izolatoma virusa EAV in referenčnim sevom Bucyrus (ATCC VR-796), ki je patogen za konje, očitna. Povprečni premer desetih plakov, ki jih je med razmnoževanjem v celični kulturi RK-13 povzročil referenčni sev Bucyrus, je bil 3,06 mm. Slovenska izolata pa sta med razmnoževanjem povzročila 4,25-krat manjše poškodbe celičnega sloja. Slovenskemu izolatu 260-06 smo izmerili deset plakov. Povprečni premer je bil 0,72 mm.

4.4.2 Kinetika rasti izolatov virusa EAV v celični kulturi RK-13

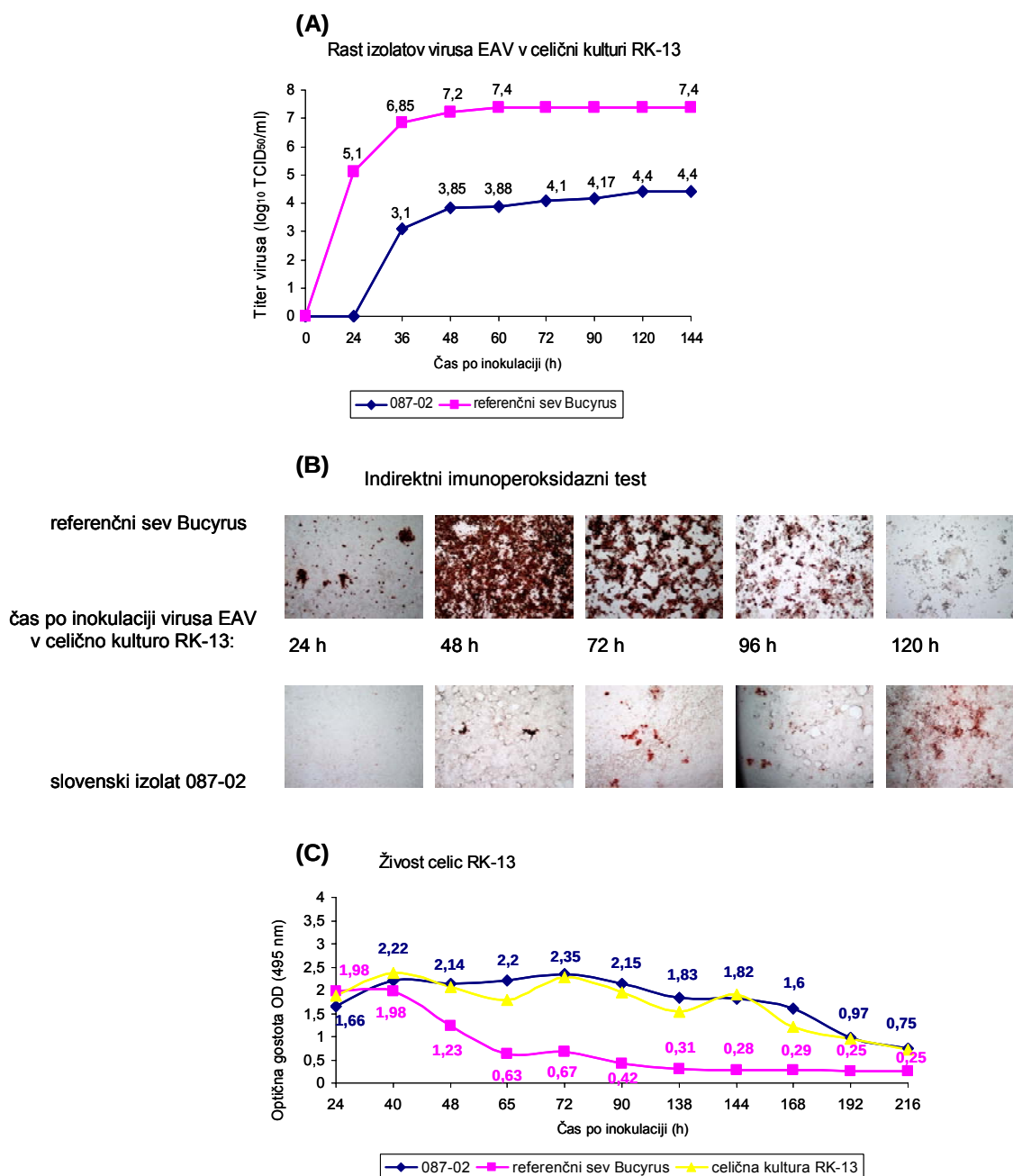
4.4.2.1 Spremljanje rasti izolatov virusa EAV

Iz primerjave rastnih krivulj (Slika 4-57 A) je razvidno, da se je referenčni sev Bucyrus v celični kulturi razmnoževal hitreje kot izolat 087-02.

Titer referenčnega seva Bucyrus je naraščal do 60 ur po inokulaciji, ko je z vrednostjo $10^{7,4}$ TCID₅₀/ml dosegel plato. Slabša rast izolata 087-02 v celični kulturi je sovpadala tudi s počasnejšim naraščanjem titra, ki je dosegel najvišjo vrednost šele peti dan inkubacije. Njegova končna vrednost je bila 1000-krat (3 log) manjša od titra referenčnega seva Bucyrus. Znašala je $10^{4,4}$ TCID₅₀/ml.

Z indirektnim imunoperoksidaznim testom smo ugotavljali obseg vidnih citopatskih sprememb in delež okuženih celic RK-13 (Slika 4-57 B).

Celice okužene z referenčnim sevom Bucyrus so izražale več virusnega proteina nukleokapside (protein N) kot celice, v katerih se je razmnoževal izolat 087-02. Pri slednjem je tudi sinteza novih proteinov N potekala počasneje, kar bi lahko pomenilo, da se izolat 087-02 še ni popolnoma prilagodil na celično kulturo RK-13, v kateri je povzročil manj obsežne citopatske spremembe kot referenčni sev Bucyrus. V inficirani celični kulturi RK-13 smo opazili posamezne skupke okroglih celic, ki so se pojavili približno od 40 do 65 ur po inokulaciji. Število žarišč s CPE je med inkubacijo naraščalo, nikoli pa nismo ugotovili obsežne citolize tako kot pri referenčnem sevu Bucyrus, z večjimi področji brez celic (Slika 4-57 B, 72 in 90 h po inokulaciji).



Slika 4-57: Primerjava rasti med referenčnim sevom Bucyrus in slovenskim izolatom 087-02. (A) Krivulja rasti v celični kulturi RK-13. (B) Indirektni imunoperoxidazni test. (C) Živost celic RK-13.

4.4.2.2 Spremljanje živosti celic RK-13

Z namenom, da bi ugotovili kakšen vpliv imata na celice RK-13 virulentni sev Bucyrus, ki ga uvrščamo v genetsko skupino EAV-2, in slovenski izolat 087-02, ki ga uvrščamo v lastno, po nam znanih podatkih, do zdaj še neobjavljeno genetsko skupino, smo v celično kulturo RK-13 inokulirali približno 100 enot $TCID_{50}/25\ \mu l$ vsakega izolata virusa EAV. Celično kulturo RK-13, ki smo jo inkubirali v vzdrževalnem gojišču, smo uporabili kot negativno kontrolo.

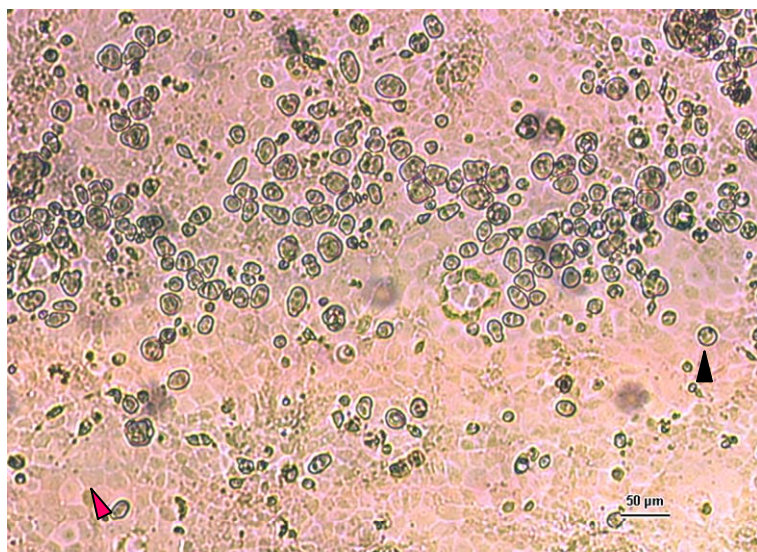
Optično gostoto inokulirane in neinokulirane celične kulture RK-13 smo merili po 24, 40, 48, 65, 72, 90, 138, 144, 168, 192 in 216 urah inkubacije v vlažnem inkubatorju pri 37 °C in 5-odstotni vsebnosti CO_2 .

Referenčni sev Bucyrus je povzročil hitrejše padanje števila živih celic kot izolat 087-02 (Slika 4-57 C). Razvidno je, da je pojav in obsežnost nekroze, ki je bila zaradi razmnoževanja referenčnega seva Bucyrus najbolj izrazita od 48 do 90 ur po inokulaciji virusa (Slika 4-57 B) in se je odražala s padcem vrednosti OD od 1,23 do 0,42 (Slika 4-57 C), časovno sovpadala z največjim titrom ($10^{7,4}$ $TCID_{50}/ml$), ki ga je referenčni sev dosegel približno med 48 in 60 urami po inokulaciji (Slika 4-57 A).

Celična kultura RK-13, v katero smo inokulirali izolat 087-02, je bila stabilna do 72 ur po inokulaciji (povprečna vrednost OD 2,12), nato je 90 ur po inokulaciji, ko je titer izolata 087-02 dosegel največjo vrednost ($10^{4,4}$ $TCID_{50}/ml$) (Slika 4-57 A), število živih celic začelo rahlo upadati (Slika 4-57 C). Padec vrednosti OD od 2,15 do 0,75 (Slika 4-57 C) prav tako kaže, da se je število živih celic zmanjšalo.

Ugotovili smo, da med živostjo kontrolnih celic RK-13 in celic RK-13, v katerih se je razmnoževal izolat 087-02, ni bilo večjih razlik.

Znano je, da se tretji dan inkubacije pri optimalnih pogojih, celična kultura RK-13 nahaja v eksponentni fazi rasti, potem pa peti dan preide v stacionarno fazo. Kontrolna celična kultura RK-13 je bila stabilna do šestega dne inkubacije (144 h). Potem je začelo število živih celic upadati, kar sovпада s podatki iz krivulje rumene barve na sliki 4-57 C, ki označuje padec vrednosti OD. Odmiranje kontrolnih celic RK-13 je povezano z izrabo hranilnih snovi v vzdrževalnem gojišču, kar povzroči spremembo morfologije epitelnih celic RK-13 v okroglo obliko (Slika 4-58).



Slika 4-58: Neokužena devet dni stara kontrolna celična kultura RK-13. Črna puščica označuje odmrlo celico RK-13, okrogle oblike, rožnata puščica pa označuje še žive epitelne celice RK-13.

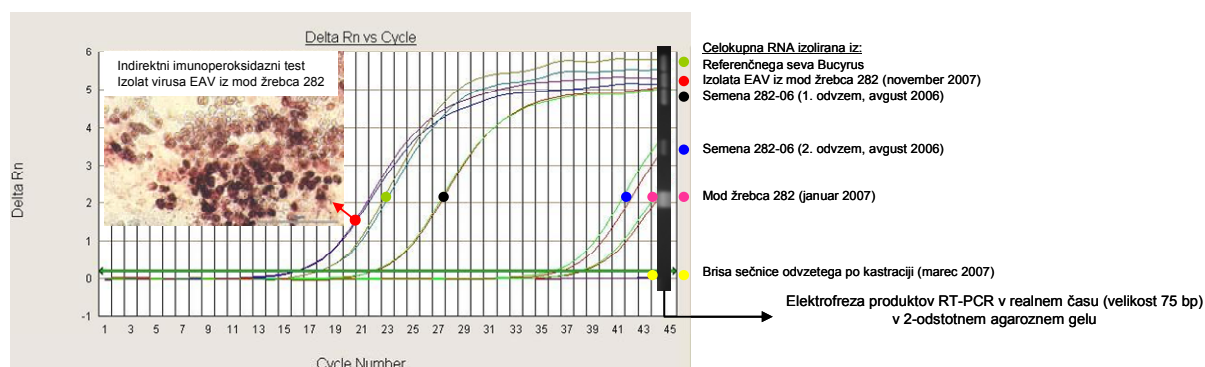
Iz primerjave podatkov o živosti celic je razvidno, da so celice RK-13 bistveno bolj občutljive za razmnoževanje referenčnega seva Bucyrus, ki je zelo virulenten in patogen za konje, kot za razmnoževanje izolata 087-02.

Iz naših rezultatov lahko povzamemo, da so bile celice RK-13 zmožne preživeti razmnoževanje izolata 087-02 veliko dlje kot razmnoževanje referenčnega seva Bucyrus, saj se živost celic RK-13, v katerih se je razmnoževal izolat 087-02, ni bistveno spremenila v primerjavi s kontrolno skupino celic RK-13. Manjši titer izolata 087-02 in manjši obseg citopatskih sprememb, ki jih je povzročil med razmnoževanjem v celični kulturi RK-13, še dodatno potrjujejo avirulenten fenotip slovenskega izolata 087-02.

4.4.3 Dokazovanje virusa EAV v modih

Izolat virusa EAV iz mod kastriranega žrebca 282 je prve citopatske spremembe povzročil že sedmi dan po inokulaciji. Spremembe smo opazili v obeh jamicah, v katerih smo inokulirali suspenzijo mod.

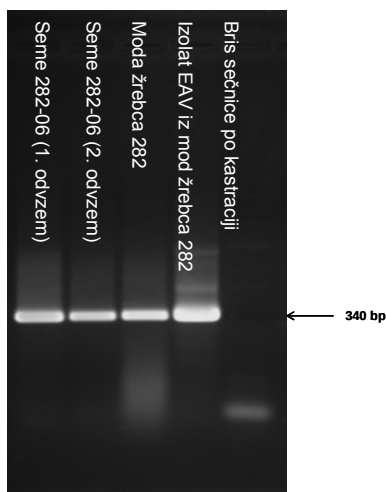
Pozitiven rezultat izolacije v celični kulturi RK-13 smo potrdili z monoklonskimi protitelesi (Slika 4-59).



Slika 4-59: Izolat virusa EAV iz mod. Virusno RNA v vzorcih celokupne RNA, ki smo jo v vseh primerih izolirali s Trizolom, z izjemo celokupne RNA iz brisa sečnice, ki smo jo izolirali s komercialnim kompletom MagMax™ Viral RNA Isolation Kit, smo pomnožili z RT-PCR v realnem času. Na diagramu pomnoževanja je prikazana (levo zgoraj) potrditev virusnega antigena z monoklonskimi protitelesi v imunoperoxidaznem testu.

Iz diagrama pomnoževanja odseka v ORF7 z RT-PCR v realnem času (Slika 4-59) je razvidno, da se je virus EAV iz mod v celični kulturi RK-13 uspešno namnožil.

Vzorec brisa iz sečnice, ki so ga žrebcu 282 odvzeli po kastraciji, ni vseboval zaznavne količine produktov pomnoževanja odseka v ORF7 z RT-PCR v realnem času (Slika 4-59) in s klasičnim RT-PCR (Slika 4-60), kar bi lahko pomenilo, da se je virus EAV prenehal izločati.

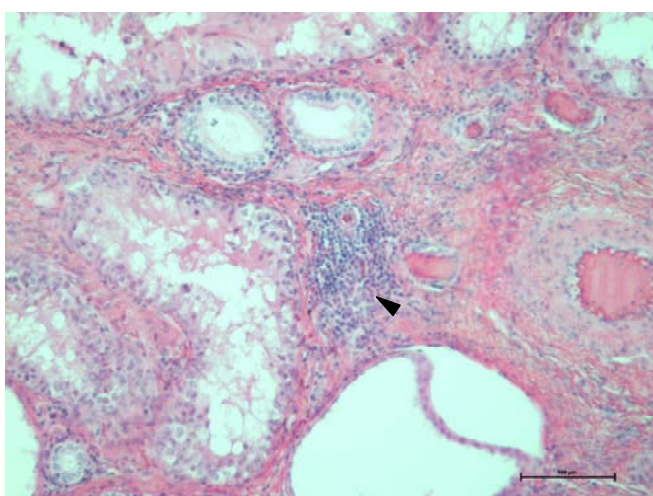


Slika 4-60: Dokaz virusa EAV pri žrebcu 282 z metodo RT-PCR.

Tudi rezultati pomnoževanja odseka v ORF7 s klasično metodo RT-PCR potrjujejo, da je bila izolacija virusa EAV iz moda žrebca 282 uspešna. Na agaroznem gelu (Slika 4-60) je najbolj zaznaven produkt pomnoževanja virusne RNA izolata 282 iz moda. Pozitiven rezultat pomnoževanja (produkt RT-PCR velikosti 340 bp) smo opazili tudi pri obeh vzorcih semena in suspenziji iz moda.

Patohistološka preiskava moda

V modih žrebca 282 smo ugotovili patohistološke spremembe, ki so značilne za kužni arteritis kopitarjev (Slika 4-61).



Slika 4-61: Kužni arteritis kopitarjev, moda žrebca 282, hematoksilin in eozin, slikano pri 10-kratni povečavi, puščica označuje obsežno infiltracijo limfocitov.

V intersticiju med semenskimi cevkami, zlasti ob arterijah in arteriolah, so bili obilni celični infiltrati, sestavljeni iz limfocitov. Semenski epitelij v semenskih cevkah je atrofiral, vezivno tkivo je nadomestilo intersticijske Leydigove celice.

4.4.4 Nevtralizacija kraškega izolata (087-02) virusa EAV

V okviru programa eradikacije KAK iz črede konj v reji A, kjer se od leta 2006 izvaja aktivna imunizacija, smo pri cepljenih žrebčkih ugotavljali humoralni odziv na različna genotipa virusa EAV.

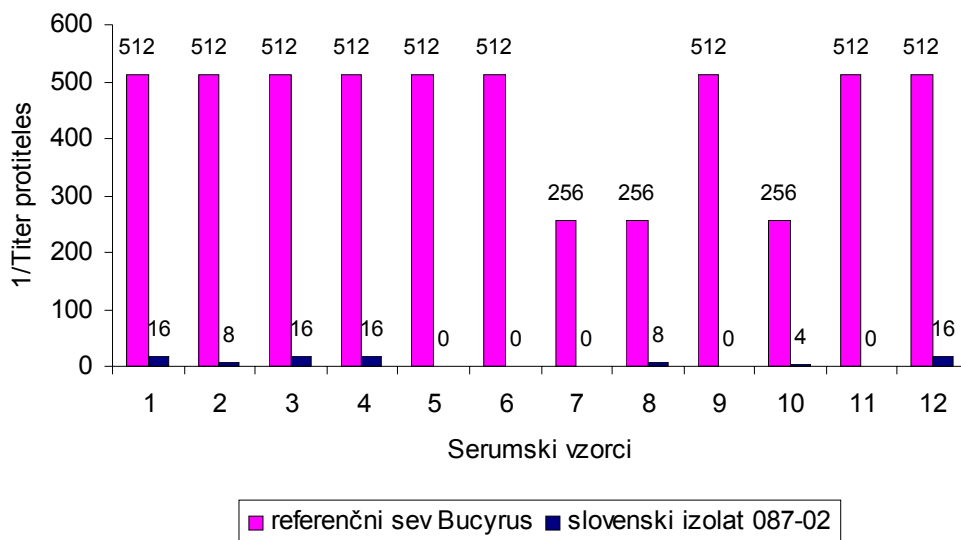
Cepivo vsebuje lentogeni sev Arvac in ga tako kot referenčni sev Bucyrus uvrščamo v genetsko skupino EAV-2.

Z določevanjem protiteles proti referenčnemu sevu Bucyrus smo pri cepljenih žrebčkih ugotavljali uspešnost cepljenja, z določevanjem protiteles proti slovenskemu izolatu 087-02 pa smo ugotavljali učinkovitost cepljenja. Zanimalo nas je, ali lahko v serumu cepljenih žrebčkov navzoča protitelesa, ki so nastala kot odgovor na cepljenje s cepivnim sevom Arvac, zagotavljajo zaščito tudi proti slovenskemu virusu EAV 087-02.

V tabeli 4-14 so prikazani serumski vzorci cepljenih žrebčkov, ki smo jih z NT testirali na protitelesa proti referenčnemu sevu Bucyrus in izolatu 087-02.

Tabela 4-14: Seznam žrebčkov iz reje A, ki so bila cepljena proti KAK.

Oznaka seruma	Leto rojstva žrebčka	Število cepljenj do serološke preiskave
1	2006	1
2	2006	1
3	2006	1
4	2005	2
5	2005	2
6	2005	2
7	2004	2
8	2004	2
9	2004	2
10	2003	2
11	2003	2
12	2003	2



Slika 4-62: Serološki odziv na referenčni sev Bucyrus in izolat 087-02 po cepljenju z vakcino Arvac®.

Visoki titri nevtralizacijskih protiteles ($\geq 1:512$ in $1:256$) proti referenčnemu sevu Bucyrus (Slika 4-62) kažejo na ustrezen imunski odgovor, ki naj bi po zagotovilih proizvajalca v primeru okužbe z virusom EAV (ne glede na genotip) preprečil pojav klinične oblike KAK in trajne okužbe spolnega trakta pri žrebcih.

Kot je razvidno iz slike 4-62, titri nevtralizacijskih protiteles proti izolatu 087-02 niso bili nikoli višji od $1:16$. V vzorcih serumov 5, 6, 7, 9 in 11 nevtralizacijskih protiteles proti izolatu 087-02 nismo ugotovili, kar pomeni, da so bili omenjeni žrebčki nezaščiteni proti okužbi z virusom 087-02.

Iz rezultatov je razvidno, da med izolatom 087-02 in referenčnim sevom Bucyrus ni navzkrižne imunosti. Ugotavljamo, da cepljeni žrebčki niso razvili protiteles, ki bi jim omogočila zaščito pri okužbi s terenskim virusom EAV.

5. RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Serološke preiskave

Pri konjih iz zasebnih rej smo največ serološko pozitivnih živali na virus EAV ugotovili leta 2003, in sicer 26 %. V naslednjih letih (od 2004 do 2007) je protitelesa proti virusu EAV imelo le od 7 do 11 % konjev iz zasebnih rej (Slika 4-1). Menimo, da je bila prekuženost zmanjšana le navidezno, zaradi omejitev pri vzorčenju. Vstop Slovenije v EU leta 2004 in z njo povezane spremembe na področju zakonodaje o pogojih in trajanju karantene za uvožene plemenske kopitarje je eden izmed dejavnikov, ki je vplival na to, da se je število vzorcev serumov, v katerih smo dokazovali protitelesa proti virusu EAV, zmanjšalo približno za polovico (Slika 4-1). Po zdaj veljavni zakonodaji (Pravilnik o veterinarskih pogojih za premike kopitarjev med državami članicami EU in uvozu kopitarjev iz tretjih držav, Ur. l. RS, št. 21/2004) kopitarje, ki vstopajo v Slovenijo iz drugih držav članic EU ali vstopajo v skupnost iz tretjih držav, ni treba preiskati na KAK.

V obdobju od leta 2002 do 2007 smo pri žrebcih iz zasebnih rej KAK serološko potrdili v povprečju v 7,3 % (Slika 4-2). Primerjave statističnih podatkov iz različnih držav so pokazale, da med različnimi pasmami konj obstajajo razlike v prevalenci okužb z virusom EAV (McCollum in Bryans, 1973; Timoney in McCollum, 1993). Okužbe so pogostejše predvsem pri tistih pasmah konj, ki so primerne za zvrst konjeniškega udejstvovanja, ki je v določeni državi najbolj razvito.

Rezultati seroloških preiskav, ki smo jih opravili pri priznanih plemenjakih iz zasebnih rej za plemenilno sezono leta 2002, kažejo, da so okužbe z virusom EAV najbolj pogoste med žrebci pasme kasač (Sliki 4-3 in 4-4). Protitelesa proti virusu EAV smo največkrat ugotovili tudi pri plemenjakih avtohtonih pasem, kot sta slovenski hladnokrvni konj in lipicanec (Slika 4-4).

Zastopanost pasem okuženih z virusom EAV je primerljiva s podatki za Avstrijo, kjer so največ serološko pozitivnih živali ugotovili med kasači in lipicanci ter pri konjih toplokrvnih pasem, haflingerjih in noričanih (Bürki in sod., 1992; McCollum in Bryans, 1973).

Pri kobilah iz zasebnih rej smo protitelesa proti virusu EAV največkrat dokazali pri uvoženih živalih pasme kasač, ki se uporabljajo v športne in reprodukcijske namene. Število okužb je bilo največje leta 2003, ko smo protitelesa ugotovili kar pri 39 % preiskovanih kobil (Slika 4-5). Rezultati so v skladu z objavo (Larska in Lora, 2008a), ki navaja, da so bile kobile pogostejše okužene z virusom EAV kot žrebci. Raziskava, v katero sta zajela 7903 serumov konj, ki so registrirani na Poljskem, je pokazala, da je bilo v obdobju od leta 1998 do 2005 okuženih 12,1 % žrebcev in 39 % kobil.

Glede na to, da v začetnih raziskavah nismo imeli na razpolago natančnih podatkov o razširjenosti virusa EAV v reji lipicancev na slovenskem Krasu (reja A), smo preverili, ali so konji okuženi z virusom EAV. Najbolj reprezentativne podatke smo dobili leta 2006, ko smo na protitelesa proti virusu EAV pregledali čredo, ki je štela 372 konj. Istega leta smo v reji A uvedli cepljenje proti KAK, toda prvič cepljenih žrebčkov v serološko testiranje nismo vključili. Ugotovili smo, da je bila v letu 2006 že več kot polovica črede lipicancev (55 %) vsaj enkrat okužena z virusom EAV (Slika 4-6). Titre protiteles večje od 1:4 smo dokazali kar pri 73 % preiskovanih žrebcev, odstotek okuženih kobil pa je bil za polovico manjši (Slika 4-7).

Naše rezultate lahko primerjamo z rezultati drugih avtorjev (Larska in Rola, 2008a). Ti poročajo, da so primeri z virusom EAV okuženih konj pogostejši v večjih vzrejnih središčih, kjer je v osnovni čredi večje število konj različnih kategorij.

V kategoriji žrebet do tretjega leta starosti in v kategoriji mladih konj starih od 4 do 6 let smo protitelesa proti virusu EAV našli pri manj kot 4 %, medtem ko je pri starosti 7 let in več protitelesa imelo že več kot 75 % konj (Slika 4-11). V naši študiji se je izkazalo, da prekuženost z virusom EAV s starostjo pričakovano narašča (Slike 4-8 do 4-12), saj je v daljšem obdobju verjetnost stika z virusom EAV, ki je v določeni reji stalno prisoten (Bürki in sod., 1992), večja.

Z epidemiološkega stališča imajo pri ohranjanju virusa EAV v vzrejnih središčih najpomembnejšo vlogo plemenski žrebci, ki virus EAV trajno izločajo s semenom in ga s spolnim stikom prenesejo na kobile (McCollum in sod., 1971; Timoney in sod., 1987a; Timoney in McCollum, 1993).

Podatki prospektivne študije, v katero smo zajeli žrebce in plemenske kobile (Tabela 4-3), so nam omogočili oceniti starost, pri kateri so se konji prvič okužili z virusom EAV. Z raziskavo smo tudi poizkušali ugotoviti, kateri so glavni načini prenosa virusa EAV med konji v reji A. Čeprav so serološki rezultati pokazali (Tabeli 4-1 in 4-2), da se je večina žrebcev prvič srečala z virusom EAV v obdobju med tretjim in četrtem letom starosti, so se po mnenju strokovnjakov (prof. dr. Kosec osebno) okužili že prej. Znano je, da so se žrebčki pred uvedbo ločene vzreje in preventivnega cepljenja leta 2006, okužili že po prvem letu starosti, ko so prišli v skupino žrebčkov starih od 1 do 3 let. Večina žrebčkov se je najverjetneje okužila pri neposrednem stiku z aerosoli izločkov okuženih starejših sovrstnikov med treningom ali posredno s kontaminirano opremo ter pripomočki za nego in ne pri spolnem stiku z akutno okuženo kobilom. Pridružujemo se mnenju nekaterih raziskovalcev, ki predvidevajo, da se virus EAV med žrebci lahko prenaša tudi z neposrednim s stikom z okuženim ejakulatom (Bürki in sod., 1992; Glaser in sod., 1996).

Populacija plemenskih kobil v reji A šteje približno od 70 do 80 živali, ki so vhlevljene v skupnem hlevu. Kobile se praviloma pripuščajo v obdobju od 15. marca do 15. junija.

Ugotovitev, da se je skoraj polovica kobil (45 %) starih med 4 in 5 let (Tabela 4-3) z virusom EAV okužila predvidoma ob pripustu pod žrebce, za katere smo dokazali, da so izločevalci virusa EAV s semenom (Tabela 4-4), je ključni epidemiološki podatek, ki nam je razjasnil, da je spolni stik s PI eden izmed pomembnejših načinov okužbe pri plemenskih kobilah.

Pri kobilah, pri katerih neposredne povezave med pripustom pod PI in pojavom serokonverzije nismo dokazali, ne moremo izključiti možnosti, da so se okužile pred pripustom posredno preko stika s kontaminiranimi predmeti ali z izločki akutno okuženih kobil.

V tem pogledu vsekakor ne smemo zanemariti dejstva, da je prenašanje okužbe med kobilami, ki so vhlevljene v skupnem hlevu, vezano na tesne stike med njimi. Nevarnost okužbe se poveča, ko kobilom, ki so jo pripustili pod PI, privedejo iz pripustne postaje nazaj v skupni hlev, kjer lahko druge kobile pridejo v stik z okuženim semenom, ki se še nekaj časa po zaskoku izceja iz vagine.

5.1.2 Molekularne preiskave

5.1.2.1 Dokaz virusa EAV v semenu žrebcev

Približno 10–70 % žrebcev, ki prebolijo okužbo z virusom EAV, ostanejo trajni nosilci virusa (Timoney in sod., 1986a; Timoney in McCollum, 1993). Perzistentni izločevalci so naravni rezervoar virusa (Balasuriya in sod., 2002) in pomemben vir okužbe, ker lahko celo življenje izločajo virus EAV s semenom (Balasuriya in sod., 1999a; Hedges in sod., 1999b; Timoney in sod., 1986a; Timoney in McCollum, 1993), ne da bi razvili simptome KAK. Ugotavljajo, da je razširjenost sevov virusa EAV po vsem svetu močno povezana s povečanim obsegom prometa s kopitarji in semenom za umetno osemenjevanje (Balasuriya in sod., 1998; Hullinger in sod., 2001; Timoney in sod., 1986a, Timoney in sod., 1987a; Timoney in McCollum, 1993). Skladno s preventivnimi dejavnostmi za preprečevanje KAK, ki zahtevajo zanesljivo odkrivanje PI (Balasuriya in MacLachlan, 2004b; Timoney in McCollum, 1993), se je povečala tudi potreba po hitrih in občutljivih testih za določanje virusa EAV (Balasuriya in sod., 1998; Balasuriya in sod., 1999b; Hullinger in sod., 2001).

V zadnjih dveh desetletjih so za ugotavljanje virusa EAV v kliničnih vzorcih razvili številne molekularne metode, ki temeljijo na pomnoževanju virusne nukleinske kisline. Med njimi sta se v rutinskih diagnostičnih laboratorijih najbolj uveljavili klasična metoda RT-PCR in njena najnovejša različica RT-PCR v realnem času (Balasuriya in sod., 2002; Chirnside in Spaan, 1990; Gilbert in sod., 1997; Mankoč in sod., 2007; Ramina in sod., 1999; Sekiguchi in sod., 1995; St-Laurent in sod., 1994; Westcott in sod., 2003).

Z namenom odkrivanja PI v Sloveniji smo poleg utečene serološke preiskave krvi na protitelesa proti virusu EAV in tradicionalne metode izolacije virusa v celični kulturi RK-13 v diagnostiko KAK uvedli tudi molekularne metode. Do leta 2007 smo za diagnostiko KAK uporabljali metode RT-PCR in »semi-nested« PCR, s katerima smo leta 2001 v semenu treh PI (987, 990 in 168) iz reje A prvič dokazali virus EAV (Tabela 4-4).

V začetnih raziskavah smo se pri optimizaciji metode RT-PCR usmerili k izbiranju začetnih oligonukleotidov, ki bi nam omogočili pomnoževanje različnih genotipov virusa EAV. Naš cilj je bil oceniti, katera izmed tarčnih regij virusnega genoma je bolj primerna za dokazovanje virusne nukleinske kisline v vzorcih semena.

Rezultati naše raziskave se ne ujemajo z doslej objavljenimi rezultati v literaturi. Ramina in sod. (1999) so v preliminarnih poizkusih pri vrednotenju občutljivosti petih parov začetnih oligonukleotidov dobili najboljše rezultate s parom EAV7/EAV8, zato smo za pomnoževanje odseka v polimeraznem genu najprej uporabili omenjeni par, ki smo ga testirali na 30 vzorcih celokupne RNA. RNA virusa EAV smo uspešno dokazali v 21/30 (70 %) vzorcih semena. V sedmih primerih je bil rezultat reakcije RT-PCR lažno negativen, v dveh pa je bil signal na agaroznem gelu šibek (Tabela 4-6).

S parom začetnih oligonukleotidov EAV11/EAV12, ki so jih razvili Stadejek in sod. (1999), smo dobili večje število pozitivnih rezultatov. Virus EAV smo dokazali v 38/40 (95 %) vzorcih semena (Tabela 4-6), kar dokazuje, da je kombinacija začetnih oligonukleotidov EAV11/EAV12 ustrežnejša za pomnoževanje odseka v polimeraznem genu.

Možna razlaga za neujemanje rezultatov pri vzorcih semena 990-01, 167-03, SM-02, SM-03, 085-03 in TA-01 (Tabela 4-6), ki so bili negativni s parom EAV7/EAV8, toda pozitivni s parom EAV11/EAV12, bi lahko bila, da ima nukleinska kislina v omenjenih vzorcih na mestu vezave protismiselnega začetnega oligonukleotida spremenjeno nukleotidno zaporedje, ki ga EAV8 ne bi prepoznal.

Predvsem neujemanja na 3' koncu lahko vplivajo na učinkovitost verižne reakcije s polimerazo (Kwok in sod., 1994). Po ocenah avtorjev je količina produkta PCR vsaj 100-krat manjša, če so poleg neujemanja na 3' koncu (A:G, G:A, C:C ali G:G) v dvojni vijačnici med začetnim oligonukleotidom in tarčnim zaporedjem v matrici prisotna še dodatna neujemanja, ki se nahajajo eno, dve ali tri baze od 3' konca (Kwok in sod., 1991).

Za vzorca 990-01 in 085-03 pravilnost našega sklepanja nismo mogli potrditi, saj pri omenjenih vzorcih nismo uspeli pridobiti zaporedja mesta, na katera se prilega EAV8.

Našo domnevo smo potrdili le pri vzorcih SM-02 (zaporedje SLOpol19 na Sliki 5-20) in SM-03 (Slika 4-15), ko smo poleg neujemanja A:C na 3' koncu znotraj analiziranega odseka ugotovili neujemanja še na štirih mestih.

Popolna komplementarnost med EAV8 in tarčnima zaporedjema v vzorcih 087-02 in 167-03 (Slika 4-15), je nakazovala, da spremenjeno nukleotidno zaporedje ni edini vzrok za neuspešno pomnoževanje s parom EAV7/EAV8 (Tabela 4-6). Podobno bi lahko sklepali tudi pri vzorcu TA-01, kjer se mesto prileganja EAV8 razlikuje za en sam nukleotid. Menimo, da neujemanje G:T na 5' koncu najverjetneje ne vpliva na vezavo EAV8.

Veliko raziskav kaže, da so v semenu prisotni inhibitorji (Dyer in sod., 1996; Lugaro in sod., 1988), ki lahko vplivajo na rezultate RT-PCR. Celokupna RNA, ki jo izoliramo iz semena, je pogosto kontaminirana s poliamini (Lugaro in sod., 1988), kot sta spermin in spermidin. To so alifatske polikationske molekule, ki se nahajajo v vseh celicah in sodelujejo pri uravnavanju njihove rasti in diferenciacije (Igarashi in Kashiwagi, 2000). Poglavitna lastnost poliaminov je zmožnost vezanja v veliki in mali žleb v dvojni vijačnici DNA (Feuerstein in sod., 1986; Zakrzewska in Pullman, 1986) in na druge dvoverižne sekundarne strukture v različnih vrstah RNA. Posledica tega je stabilizacija hibridov DNA-RNA (Antony in sod., 1999) in sekundarnih struktur, kot so lasnična zanka in dvojna vijačnica. Njihova prisotnost lahko ovira prepisovanje virusne RNA v cDNA in/ali vodi do slabšega pomnoževanja in s tem do zmanjšane občutljivosti RT-PCR. Zato je pomembno, da za izolacijo celokupne RNA uporabimo metodo, s katero bomo iz kliničnega vzorca lahko pridobili čim večjo količino kvalitetne RNA.

St-Laurent in sod. (1994) so v svoji raziskavi potrdili, da je izolacija celokupne RNA iz semena ključna stopnja pri dokazovanju virusa EAV z metodo RT-PCR. Rezultati primerjave dveh različnih postopkov izolacije celokupne RNA so pokazali, da je za večjo učinkovitost postopka izolacije RNA z gvanidinijevim tiocianatom potrebna predhodna obdelava vzorcev semena s proteinazo K in helati (npr. Chelex 100, Sigma), ki delujejo tako, da vežejo nase polivalentne katione, ki bi lahko ovirali delovanje encimov pri RT-PCR. Prav tako poudarjajo, da je bilo naknadno koncentriranje celokupne RNA bistvenega pomena zlasti iz vzorcev semena z nizkimi titri virusa EAV.

Pri pomnoževanju odseka v genu za nukleokapsido (ORF7) z začetnima oligonukleotidoma EAV7.53F/12664N genoma virusa EAV nismo dokazali v dveh vzorcih semena (410/99-4 in 410/99-7) (Tabela 4-7). Ker smo pri obeh vzorcih tudi po pomnoževanju z začetnima oligonukleotidoma EAV7.53F/EAV7.256R na agaroznem gelu zaznali šibko pozitiven rezultat, smo se odločili, da poizkušamo povečati občutljivost in specifičnost dokazovanja virusne RNA z metodo »semi-nested« PCR.

V obeh primerih smo z dodatnim pomnoževanjem obeh tarčnih regij (ORF1b in ORF7) dobili pozitiven rezultat (Tabeli 4-6 in 4-7), iz tega lahko sklepamo, da je bila količina virusne RNA v vzorcih semena 410/99-4 in 410/99-7 majhna, tako da je z metodo RT-PCR nismo zaznali.

Iz primerjave rezultatov pomnoževanja dveh različnih odsekov genoma (ORF1b in ORF7) lahko povzamemo, da je bila občutljivost metode RT-PCR odvisna predvsem od izbire začetnih oligonukleotidov. Pridružujemo se mnenju Staricka (1998), ki je v svoji primerjalni študiji ugotovil, da je par začetnih oligonukleotidov EAV7/EAV8 najmanj občutljiv.

V želji po večji občutljivosti in izboljšani diagnostiki KAK so razvili metodo »nested« PCR. V literaturi je opisanih več različic te metode (Belák in sod., 1995; Gilbert in sod., 1997; Starick in sod., 1998; Westcott in sod., 2003).

Kljub temu da se je v našem primeru metoda »semi-nested« PCR izkazala bolj občutljiva kot metoda RT-PCR, ima tudi nekatere omejitve. Predvsem ni primerna za analizo velikega števila vzorcev hkrati, saj je zaradi odpiranja epruvet verjetnost za kontaminacijo vzorcev s produkti prvega pomnoževanja zelo velika.

Posebno mesto so zato v diagnostiki KAK prevzele encimsko imunske metode, ki so primernejše za obdelavo večjega števila vzorcev (Ramina in sod., 1999; Starick in sod., 1998; St-Laurent in sod., 1994).

Za specifično potrditev produktov RT-PCR smo uporabili metodo RT-PCR-ELISA. S sondo EAVpr (Ramina in sod., 1999), ki je komplementarna odseku v območju med začetnima oligonukleotidoma EAV7/EAV8 in EAV11/EAV12, smo analizirali produkte RT-PCR gena za polimerazo (ORF1b). Kljub uspešnemu pomnoževanju z enim ali drugim parom začetnih oligonukleotidov v določenih primerih sonda EAVpr tarčnega zaporedja v produktih RT-PCR ni prepoznala (Tabela 4-6).

Izbrana para začetnih oligonukleotidov omejujeta odsek z istim vezavnim mestom za sondo EAVpr, kar kaže na to, da gre pri vzorcih 087-02, 087-03, TA-01, 379/00-4, 068-03, 031-03 in 122-03, ki smo jih uspešno pomnožili z obema paroma začetnih oligonukleotidov, sonda EAVpr pa je prepoznala le produkte RT-PCR, ki smo jih pomnožili s parom EAV11/EAV12, le za navidezno neskladnost med rezultati testa RT-PCR-ELISA.

Težave s hibridizacijo smo imeli tudi pri desetih vzorcih 087-04, 087-05, 213-02, 213-04, 213-05, 987-04, 068-04, 167-04, SM-02 in 085-03, pri katerih sonda EAVpr ni zaznala tarčnega odseka v ORF1b, ki smo ga sicer uspešno pomnožili s parom EAV11/EAV12.

Težavo smo po priporočilih proizvajalca komercialnega kompleta Hybridowell™ Universal kit poizkušali zaobiti tako, da smo produkte RT-PCR, ki smo jih dobili po pomnoževanju s parom EAV11/EAV12, izrezali iz gela in jih očistili. Čiščenje se je izkazalo kot ključni postopek, ki je pripomogel k temu, da smo občutljivost testa RT-PCR-ELISA znatno

izboljšali. Pri ponovnem testiranju prečiščenih produktov RT-PCR smo v vseh primerih dobili pozitiven rezultat (Tabela 4-6).

Analize so pokazale, da se večina slovenskih zaporedij odseka v ORF1b razlikuje od zaporedja sonde EAVpr v največ dveh nukleotidih. Kljub tranzicijam na mestih 9346 (G>A) in 9349 (T>C) v zaporedjih SL-02, SL-03 in 410/99-2 je bil rezultat testa RT-PCR-ELISA pozitiven (Tabela 4-6). O enakih spremembah so poročali tudi Ramina in sod. (1999). Pokazali so, da se je sonda EAVpr kljub neujemanjem vezala na tarčno zaporedje. Z uspešno hibridizacijo prečiščenega produkta RT-PCR smo dokazali, da polimorfizma, ki smo ju pri vzorcu SM-02 ugotovili na mestih 9343 (G>A) in 9346 (G>A), nista bila vzrok za negativen rezultat hibridizacije z neprečiščenim produktom RT-PCR (Tabela 4-6). Vzrok za lažno negativne rezultate je bila reakcijska mešanica za RT-PCR, ki vsebuje detergente, ki zmanjšujejo učinkovito vezavo sonde na tarčno zaporedje.

S sondo EAV7.92P, specifično za nukleokapsidni gen (ORF7), smo v testu RT-PCR-ELISA dokazovali produkte RT-PCR, ki smo jih pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov EAV7.53F/12664N. Kljub enemu neujemanju na mestu 12420 (C>T) med sondo EAV7.92P in devetimi zaporedji slovenskih virusov EAV iz vzorcev semena 068-03, 990-03, SM-02 in SM-03 (Sliki 4-23 in 4-28) je bil v vseh primerih rezultat hibridizacije pozitiven. V osmih primerih je bilo čiščenje produktov RT-PCR nujno za uspešno hibridizacijo (Tabela 4-7).

Mehanizmov delovanja detergentov si nismo znali povsem razložiti. Lahko preprečujejo učinkovito vezavo DNA na mikrotitrsko ploščico ali pa komplementarno parjenje med sondo in tarčno DNA.

Da bi dobili vpogled v to, kako pestra je genetska struktura sevov, ki krožijo v slovenskem prostoru, smo slovenskim izolatom virusa EAV določili nukleotidna zaporedja in jih poizkušali filogenetsko umestiti.

Obsežnejše mutacije v genu ORF1b, ki je pomemben za uravnavanje razmnoževanja in prepisovanja genov virusa EAV (den Boon in sod., 1991; van Dinten in sod., 1997), bi lahko imele usoden učinek na preživetje virusa. Zato smo pričakovali, da je ohranjenost v tej regiji večja kot v genih ostale tretjine virusnega genoma, ki nosi zapis za strukturne proteine (Stadejek in sod., 1999). Kljub navedenemu je iz slike 4-20 razvidno, da so v odseku ORF1b mutacije dokaj pogoste.

Med nukleotidnimi zaporedji genoma izolatov iz reje A (SLOpol17, SLOpol28, SLOpol23, SLOpol22, SLOpol26, SLOpol27, SLOpol25, SLOpol15g in 15a, SLOpol24 in SLOpol1c) je bila identičnost med 93,1 in 99,7 %. Slednji se v odseku ORF1b, dolgem 348 nukleotidov, razlikujejo za 60 do 66 nukleotidov od zaporedij SLOpol18t in SLOpol18c, ki sodita v skupino ameriških izolatov (skupina I, Slika 4-26). Odstotek identičnosti je nižji in se giblje od 81,0 do 82,8 %. Zaporedja kraških sevov so od 82,2 do 83,6-odstotno identična z zaporedjema SLOpol19 in SLOpol21 iz vzorcev semena finskega kasača SM, ki se združujeta v lastno monofiletsko skupino (Sliki 4-25 in 4-26).

Točkovne mutacije v odseku ORF1b, ki kodira del nestrukturnega proteina nsp11 in nsp12, se odražajo tudi na aminokislinskem zaporedju. Na osnovi poravnave prevedenih aminokislinskih zaporedij (Slika 4-21) smo ugotovili, da je aminokislina treonin (T) na 22. mestu v nsp12 značilna le za izolate virusa EAV iz reje A, medtem ko se pri drugih izolatih na istem mestu nahaja glutamat (E), ki po fizikalno-kemijskih lastnostih ustreza treoninu. Menili smo, da zamenjava polarne, nabite aminokisline glutamat (E) s polarno, nenabito aminokislino treonin (T) ne bo vplivala na sekundarno strukturo nsp12. Pravilnost naše domneve smo potrdili s programom PSIPRED, s katerim smo napovedali, da imata zaporedje SLOpol1c in referenčni sev Bucyrus na istih mestih enaka sekundarna strukturna stanja (Slika 4-22). Iz navedenega lahko zaključimo, da kljub izredno visoki polimorfnosti odseka v ORF1b spremembe aminokislin ne vplivajo na sekundarno strukturo nsp11 in nsp12 in najverjetneje tudi ne na funkcijo proteina.

Ne le, da so nukleotidna zaporedja odseka v ORF1b, ki smo jih določili pri virusih EAV v vzorcih semena žrebcev v Slovenji, pokazala večjo genetsko raznolikost kot zaporedja ORF7, hkrati tudi zaradi visokega polimorfizma nosijo filogenetsko informacijo, na podlagi katere lahko rekonstruiramo evolucijsko sorodstvene odnose med različnimi virusi EAV (Sliki 4-25 in 4-26).

Vse filogenetske odnose izpeljane iz 43 nukleotidnih zaporedij ORF1b smo izračunali po distančnih metodah neighbor-joining (NJ) in Fitch-Margoliash (FM).

Filogenetski analizi sta pokazali, da imamo v Sloveniji poleg »uvoženih« izolatov virusa EAV tudi izolate, ki so samonikli in jih po nam znanih podatkih ni opisal še nihče. To so izolati SLOpol1c-SLOpol28 (na slikah 4-25 in 4-26 na območju Slovenije), ki izvirajo iz reje A in najverjetneje krožijo med lipicanci že vrsto let. Dokazali smo, da med kraškimi sevi obstajata vsaj dve monofiletski skupini, ki sta na obeh drevesih (NJ in FM) (Sliki 4-25 in 4-

26) statistično zelo dobro podprti. Poleg tega so si kraški sevi iz obeh skupin bolj sorodni kot kateri koli izmed njih s sevoma SLOpol19 in SLOpol21, s katerima si delijo skupnega prednika. Razvrstitev zaporedij genoma virusa iz semena ameriškega kasača SLO18t in SLO18c v skupino I ameriških izolatov virusa EAV se ujema z njunim zemljepisnim izvorom. Razrešili smo tudi filogenetske odnose med ostalimi nukleotidnimi zaporedji, ki smo jih vključili v analizo. Rezultati filogenetske analize se ujemajo z rezultati raziskave, v kateri so Stadejek in sod. (1999) ugotovili, da je odsek v ORF1b informativen molekularni označevalec za preučevanje filogenetskih odnosov med virusi EAV. Topologija dreves NJ in FM podpira razvrstitev sevov virusa EAV v genetski skupini I in IIA. Izjema so stari evropski izolati S1, Bibuna in I1 (Tabela 3-4), ki tvorijo statistično slabo podprti, toda jasno ločeni evolucijski veji. Odnosi, ki smo jih med pripadniki znotraj skupine IIB oz. EAV-3 (Tabela 3-6c) ugotovili na podlagi zaporedij ORF5 (Slike 4-38, 4-39 in 4-40) evropskih izolatov virusa EAV, se ne ujemajo s filogenetskimi odnosi na osnovi ORF1b. Na drevesih NJ in FM zaporedij ORF1b pripadniki genetske skupine IIB niso bili združeni v monofiletsko skupino, temveč so bili razbiti v dve ločeni veji, kar kaže na pomanjkanje filogenetskih informacij v počasi spreminjajočih se zaporedjih gena ORF1b, ki najverjetneje ni izpostavljen delovanju selekcije zaradi imunskega sistema (Stadejek in sod., 1999).

Take razvrstitve pa ne podpira topologija filogenetskega drevesa NJ za ORF7 (Slika 4-27). Čeprav je s filogenetskega stališča položaj kraških izolatov virusa EAV dobil slabšo podporo (655) kot po zaporedjih ORF1b, lahko na podlagi ORF7 potrdimo njihov avtohtoni izvor.

Rezultati analiz slovenskih izolatov virusa EAV, ki so temeljile na poravnavi nukleotidnih zaporedij gena za nukleokapsido (ORF7), so sovpadali s podatki iz literature. Rezultati so potrjevali že znano dejstvo, da je ORF7 najbolj ohranjen del virusnega genoma (Balasuriya in sod., 1999a; Chirnside in sod., 1994; Hedges in sod., 1999b).

Pri poravnavi 22 zaporedij smo v 238 nukleotidov dolgem odseku ORF7 pri slovenskih sevih virusa EAV ugotovili številna ohranjena območja (Slika 4-23).

Izkazalo se je, da so si zaporedja virusov EAV iz reje A (SLO28, SLO23A, SLO17A, B in C, SLO22A, Ca in Cg, SLO1, SLO24, SLO26B, 26cc, 26tc, 26ct in 26tt, SLO25, SLO27 in SLO15) v tem delu genoma med seboj od 98,3 do 100-odstotno identična. Pričakovane večje razlike (identičnost od 96,2 do 97,9 %) so bile med kraškimi sevi in sevoma SLO18A in

SLO18B, ki sta homologna z izolati iz Severne Amerike. Med kraškimi sevi in sevoma iz Finske SLO19A in SLO21A smo našli od 13 do 16 razlik (93,3 do 94,5-odstotna identičnost). Podatki o genetski raznolikosti slovenskih sevov virusa EAV so nam koristili tudi pri načrtovanju zelo občutljive diagnostične metode RT-PCR v realnem času.

Leta 2002 so Balasuriya in sod. (2002b) prvi poročali o uporabi RT-PCR v realnem času za dokazovanje genoma virusa EAV. Pomnoževali so kratek odsek v ORF7 in za detekcijo vključili še klasično sondo TaqMan[®]. Popolna ohranjenost na mestu prileganja sonde TaqMan je bistvena za zagotavljanje uspešnosti metode RT-PCR v realnem času, s katero želimo dokazovati različne genotipe virusa EAV.

Iz poravnave 49 nukleotidnih zaporedij smo ugotovili, da se v zaporedjih slovenskih sevov virusa EAV na področju vezave klasične sonde TaqMan[®] EAV7.92P (Balasuriya in sod., 2002b) na mestu 12.420 nahaja eno neujemanje (Slika 4-28). V našo metodo RT-PCR v realnem času smo želeli vključiti novo vrsto sonde MGB, ki je lahko krajša od klasične sonde. Na zelo variabilnih odsekih genoma lahko tako lažje najdemo odseke, ki so popolnoma ohranjeni. Molekula MGB, ki je vezana na 3' konec sonde, ima to lastnost, da se z veliko afiniteto veže v mali žleb dvojnovijačne DNA (Afonina in sod., 1997) in stabilizira dupleks, v katerem sta zaporedji sonde in tarčne DNA popolnoma komplementarni (Afonina in sod., 2002), tako, da mu zviša temperaturo tališča T_m (12-18 nt dolga sonda MGB zviša T_m hibrida na 66 do 70 °C, medtem ko ima nemodificiran hibrid T_m med 44 in 56 °C) (Kutyavin in sod., 2000). Višja temperatura T_m nam omogoča, da načrtujemo krajše začetne oligonukleotide (Afonina in sod., 1997), s katerimi pomnožujemo odsek v genomu, ki naj ne bi bil daljši od 100 bp (Bustin, 2000), in krajše sonde MGB (13-20 nt), kar ima veliko praktično vrednost v primeru dokazovanja virusov z RNA, pri katerih je zaradi visokega genetskega polimorfizma (Bustin in Mueller, 2005) težko najti del virusnega genoma, ki je ohranjen pri vseh sevih. Pomnoževanje krajših odsekov je bolj učinkovito (Nitsche, 2007), poleg tega se reakcija sinteze DNA prej konča (Bustin, 2000), kar pomeni, da je izvedba postopka hitrejša. Sonda MGB je v primerjavi s klasično sondo TaqMan (18-40 nt) krajša in ne dopušča neujemanj v tarčnem zaporedju, kar omogoča večjo specifičnost reakcije RT-PCR v realnem času. Zaradi teh lastnosti je nepogrešljiva za učinkovito alelno diskriminacijo (Kutyavin in sod., 2000) in genotipizacijo mikroorganizmov (Campsall in sod., 2004).

S programom PrimerExpress™ smo ob upoštevanju kriterija o popolni ohranjenosti tarčnega mesta določili sondo EAVMGBpr, ki se v genomu referenčnega seva Bucyrus prilega na mestu 12.402-12.419 nt.

Pri načrtovanju metode RT-PCR v realnem času nismo vključili virusov EAV iz Poljske, ki sta jih Larska in Lora (2008b) šele kasneje uvrstila v skupino evropskih izolatov EAV-1. Poravnava nam je pokazala, da se sonda EAVMGBpr na svojem 5' koncu razlikuje od poljskega izolata PLN02/3 (EF 102420.1) za en nukleotid (12.419 A>C) (ni prikazano), zato obstaja možnost, da bi takšno neujemanje lahko vplivalo tudi na rezultat RT-PCR v realnem času. Za potrditev naše domneve bi morali v testiranje vključiti tudi sev PLN02/3.

Uspešnost metode RT-PCR v realnem času smo v našem laboratoriju potrdili tudi na kliničnih vzorcih.

Sonda EAVMGBpr nam je v kombinaciji s smiselnim začetnim oligonukleotidom EAV-F (Balasuriya in sod., 2002b) in degeneriranim protismiselnim začetnim oligonukleotidom EAV-R (Slika 4-28) omogočila specifično detekcijo nukleinske kisline virusa EAV v vseh 40 vzorcih semena (Tabeli 4-7 in 4-8).

Manjše razlike v vrednosti Ct ($KV < 22$ %) med zaporednimi vzorci semena (Tabela 4-8), ki so jih PI odvzeli v razmiku približno enega leta, potrjujejo opažanja, da je koncentracija virusa EAV v semenu PI dokaj konstantna (Timoney in sod., 1986a).

Metodo RT-PCR v realnem času smo primerjali s klasično metodo RT-PCR, »semi-nested« PCR in RT-PCR-ELISA. Predvsem smo želeli ovrednotiti njihovo občutljivost in oceniti njihovo uporabnost v diagnostiki in pri raziskovalnem delu. Občutljivost posamezne molekularne metode smo določali tako, da smo ugotavljali uspešnost pomnoževanja posameznih razredčin celokupne RNA, ki smo jo izolirali iz inficirane celične kulture RK-13, v kateri se je razmnoževal referenčni sev Bucyrus.

Rezultati primerjave občutljivosti izbranih molekularnih metod za dokazovanje odseka v ORF7 kažejo, da je metoda RT-PCR v realnem času bolj občutljiva kot ostale molekularne metode, ki smo jih zajeli v primerjavo (Slika 4-29). Iz slike 4-29C je razvidno, da je meja zaznavanja metode RT-PCR v realnem času pri razredčini 10^{-7} . Najmanjša preračunana koncentracija referenčnega virusa, ki jo lahko določimo z metodo RT-PCR v realnem času, je 1,7 PFU/ml.

Edina do zdaj opravljena primerjava dveh metod RT-PCR v realnem času (Balasuriya in sod., 2002b; Westcott in sod., 2003) za določanje virusa EAV v semenu je pokazala (Lu in sod., 2008), da lahko z metodo RT-PCR v realnem času, ki so jo razvili Balasuriya in sod. (2002b, določijo 10 molekul virusne RNA, medtem ko je analitična občutljivost RT-PCR v realnem času, ki so jo razvili Westcott in sod. (2003), 10-krat manjša. Z njo je možno določiti najmanj 100 molekul virusne RNA. Večjo analitično občutljivost Balasuriyeyeve metode so pripisali učinkovitejšemu pomnoževanju odseka v ORF7. Ta je od odseka, ki ga dokazujejo Westcott in sod. (2003), krajši skoraj za polovico (Lu in sod., 2008).

Večina do zdaj uvedenih tradicionalnih molekularnih metod (RT-PCR in »nested« PCR) za dokazovanje virusa EAV v semenu, ki slonijo na pomnoževanju odseka v ORF1b (Gilbert in sod., 1997; Ramina in sod., 1999; St-Laurent in sod., 1994), lahko zaznajo tudi manj kot 2,5 PFU virusa EAV v mililitru naravno okuženega semena (Gilbert in sod., 1997). Še višji prag analitične občutljivosti kaže metoda »nested« PCR, ki so jo razvili Belák in sod. (1995). Za dodatno pomnoževanje odseka v ORF7 so izdelali začetne oligonukleotide, s katerimi je mogoče dokazati manj kot 1 PFU virusa EAV v mililitru semena.

Z elektroforezo v agaroznem gelu smo določili produkte RT-PCR velikosti 340 bp, ki smo jih s parom začetnih oligonukleotidov EAV7.53F/12664N pomnožili do razredčine 10^{-5} (170 PFU/ml) (Slika 4-29A). Z dodatnim pomnoževanjem z metodo »semi-nested« PCR, pri katerem smo uporabili par začetnih oligonukleotidov EAV7.53F/EAV7.256R, pa smo produkte velikosti 204 bp dokazali tudi pri razredčini 10^{-6} (17 PFU/ml) (Slika 4-29A).

Glede na podane rezultate lahko ugotovimo, da je metoda RT-PCR v realnem času 100-krat bolj občutljiva, kot je detekcija produktov RT-PCR z elektroforezo v agaroznem gelu.

Produkte RT-PCR, ki smo jih dobili po pomnoževanju s parom EAV7.53F/12664N, smo določali tudi s hibridizacijsko metodo RT-PCR-ELISA. S čiščenjem produktov RT-PCR iz agaroznega gela smo odstranili detergente in pri danih hibridizacijskih pogojih dosegli vsaj tolikšno občutljivost kot z običajno metodo RT-PCR (Slika 4-29B).

Kljub temu da smo obstoječo metodo RT-PCR-ELISA modificirali, tako da smo v postopek vključili še dodatno čiščenje, ki ne samo podaljša celoten čas izvajanja testa, temveč ga tudi podraži, pa encimsko imunski test ni dosegel tolikšne občutljivosti, kot so jo ugotovili drugi avtorji, ki so za analizo produkta RT-PCR uporabili metodo hibridizacije točkovnega odtisa

(angl. *dot-blot*) (Starick, 1998) in hibridizacijo po Southernu (St-Laurent in sod., 1994). St-Laurent in sod. (1994) poročajo o 10-krat večji občutljivosti hibridizacijske metode po Southernu v primerjavi z detekcijo produkta RT-PCR v agaroznem gelu.

Medsebojna primerjava izbranih molekularnih metod je pokazala, da je metoda RT-PCR v realnem času bolj občutljiva kot ostale molekularne metode, ki jih uporabljamo pri dokazovanju okužb z virusom EAV.

5.1.2.2 Dokaz virusa EAV v brisih sečnice

V nekaterih primerih z umetno vagino nismo uspeli pridobiti semena od žrebcev, ki je pri plemenjakih edina ustrežna kužnina za potrditev statusa perzistentnega izločevalca (PI) virusa EAV (Timoney in McCollum, 1993; Timoney in McCollum, 2000). Tovrstne izkušnje so nas spodbudile k iskanju drugih virov virusa EAV v telesu in k razmišljanju o bolj enostavnem in neinvazivnem načinu pridobivanja kužnine.

Med našo raziskavo smo pridobili večje število brisov sečnice, ki so zaradi hitrega in enostavnega načina odvzema ponujali praktično rešitev pri laboratorijskem diagnosticiranju KAK v primeru, ko pri žrebcu ni bilo možno izvesti odvzema semena.

Edina raziskava o dokazovanju virusa EAV v brisih sečnice je študija Neu in sod. (1988), ki so po eksperimentalni okužbi konjev opredelili čas izločanja virusa iz kliničnih vzorcev in po nekropsiji določili mesta njegovega razmnoževanja v posameznih delih urogenitalnega trakta. Pri poizkusnih konjih so v brisih sečnice dokazali virus EAV z metodo izolacije v celični kulturi RK-13 od sedmega do sedemnajstega dne po izvedeni intranazalni inokulaciji virusa. Iz literature je znano, da je virus EAV v brisih sečnice prisoten v majhnih koncentracijah ($10^{2,8}$ PFU/g tkiva pridobljenega iz proksimalnega dela sečnice) (Neu in sod., 1988), zato smo se usmerili v iskanje najustreznejše metode za izolacijo celokupne RNA in občutljivih metod za detekcijo majhnih količin nukleinskih kislin virusa EAV.

Rezultati analiz s klasično metodo RT-PCR (Slika 4-30) in metodo RT-PCR v realnem času (Slika 4-31) so pokazali, da med tremi primerjanimi metodami (opisane v točki 3.2.5.1) dosežemo najboljši izkoristek celokupne RNA iz referenčnega seva Bucyrus s kompletom MagMax™ Viral RNA Isolation Kit. Izolacija nukleinskih kislin vključuje paramagnetne

delce in nudi tehnološko rešitev za izolacijo virusne RNA iz kompleksnih bioloških vzorcev (serum, plazma, brisi in gojišča za celične kulture), ki običajno vsebujejo majhne količine virusov, zaradi tega je v postopku ekstrakcije nukleinskih kislin treba obdelati večjo količino kužnine. Paramagnetni delci vežejo nase celokupno RNA učinkoviteje kot filtri iz steklenih vlaken, zato je za spiranje celokupne RNA potrebna manjša količina elucijskega pufra (20 do 50 µl), v katerem skoncentriramo virusno RNA (<http://www.ambion.com>).

Tehnologija s paramagnetnimi delci je prodrla v nekatere humane mikrobiološke diagnostične laboratorije. Uporabljajo jo za izolacijo nukleinskih kislin iz brisov nosu, v katerih z metodo »multiplex« RT-PCR določajo različne respiratorne viruse (Létant in sod., 2007).

Metoda se je dodobra uveljavila tudi v veterinarski medicini. V veterinarskem diagnostičnem referenčnem laboratoriju NVSL (»National Veterinary Services Laboratories«, USDA, ZDA) uporabljajo metodo za izolacijo nukleinskih kislin pri ugotavljanju aviarnе influence in atipične kokoške kuge v kloakalnih brisih pri perutnini (<http://www.cfsph.iastate.edu/HPAI/resonances/Labs/AVPRO1510.02.pdf>).

Hermann in sod. (2008) so z omenjeno metodo uspešno izolirali nukleinske kisline respiratornih virusov, ki so jih z RT-PCR v realnem času določali pri eksperimentalno okuženih prašičih.

V primeru, ko smo celokupno RNA izolirali s Trizolom ali s kompletom QIAamp® Viral RNA Mini Kit, se je izkazalo, da je metoda RT-PCR v realnem času (Slika 4-31) 100-krat bolj občutljiva kot klasična metoda RT-PCR (Slika 4-30).

Iz rezultatov na sliki 4-31 je razvidno, da je vpeljana metoda RT-PCR v realnem času, ne glede na izbrano metodo izolacije celokupne RNA, primerna za določanje zelo majhnih količin virusne RNA (do razredčine 10^{-7}).

Komplet MagMax™ Viral RNA Isolation Kit se je s produktom RT-PCR na agaroznem gelu do razredčine 10^{-6} (Slika 4-30) in z najnižjimi vrednostmi Ct do razredčine 10^{-4} z RT-PCR v realnem času (Slika 4-31) izkazal kot najbolj učinkovit za izolacijo virusne RNA.

Najboljše rezultate pri testiranju vzorcev semena in brisov sečnice na prisotnost virusa EAV smo dobili pri izolaciji celokupne RNA s paramagnetnimi delci in pri pomnoževanju odseka v genu ORF7 z metodo RT-PCR v realnem času.

Rezultati pomnoževanja virusne nukleinske kisline iz vzorcev semena perzistentnih izločevalcev z RT-PCR v realnem času se za obe metodi (Trizol in komplet MagMax™ Viral

RNA Isolation Kit) izolacije celokupne RNA ujemajo med seboj skoraj v vseh primerih. Izjema so perzistentni izločevalci PI 795, PI 840, PI 168 in PI 213, pri katerih lahko nižje vrednosti Ct vzorcev RNA, izoliranih iz semena, pripišemo učinkovitejši ekstrakciji virusne RNA z metodo s paramagnetnimi delci (Slike 4-32 A, B, I in J). Podobno je bil izkoristek izolacije celokupne RNA iz brisov sečnice s paramagnetnimi delci boljši kot pri metodah izolacije s Trizolom ali z metodami, ki temeljijo na uporabi kolon z membranami iz silikatnega gela (Slika 4-32 od A do J, Sliki 4-33 in 4-34).

Rezultati molekularnega dokazovanja virusa EAV pri domnevnih izločevalcih (Slika 4-35 od A do C, Slika 4-36) dokazujejo, da je izolacija celokupne RNA s paramagnetnimi delci v kombinaciji z RT-PCR v realnem času učinkovita in dovolj občutljiva metoda za odkrivanje virusa EAV v brisih sečnice.

Kljub učinkovitosti opisane metode pa v brisih sečnice pridobljenih od PI 085 (Slika 4-32 F) in domnevnih izločevalcev 042 (Slika 4-35 C), 261 in 289 virusa EAV z RT-PCR v realnem času nismo zaznali. Razlog za negativen rezultat bi lahko pripisali prisotnosti inhibitorjev reakcije RT-PCR v vzorcih brisov sečnice.

Inhibitorji v brisih sečnice lahko ključno vplivajo na rezultat reakcije PCR. Na podobne težave so naleteli Toye in sod. (1998), ko so pri hospitaliziranih bolnikih določali urogenitalno okužbo s *Chlamydia trachomatis*. V postopek pomnoževanja so vključili interno kontrolo, s katero so ugotavljali inhibicijo pomnoževanja tarčne DNA. Pri približno 45 % vzorcev brisov sečnice je prišlo do inhibicije reakcije PCR. Pri testiranju različnih metod za odstranjevanje inhibitorjev so ugotovili, da omogoča ekstrakcija nukleinskih kislin s kombinacijo fenola in kloroforma najbolj učinkovito odstranjevanje inhibitorjev iz brisov sečnice. Kot drugo možnost so izpostavili redčenje kužnine, ki velja za najbolj poceni in enostaven način, s katerim lahko odstranimo inhibitorje. Vendar pa so z redčenjem vzorcev brisov sečnice razredčili tudi tarčno DNA in dobili lažno negativne rezultate.

Vrednosti Ct vzorca semena 085 so bile izredno visoke (40,3 in 40,67) in so nakazovale, da je v semenu relativno majhna količina virusa EAV (Slika 4-32 F), zato vzorca brisa sečnice in celokupne RNA nismo redčili. Sklepali smo, da je v vzorcu brisa sečnice koncentracija virusa EAV pod mejo detekcije molekularnih metod in bi bilo morda bolj smiselno, da bi za izboljšanje detekcije virusa EAV iz brisov sečnice z nizko koncentracijo virusnih delcev v prihodnje razmislili tudi o možnostih koncentriranja virusa EAV (npr. z ultracentrifugiranjem,

z uporabo adsorpcijskih filtrov in monolitnih kolon), ki bi ga izvajali pred izolacijo celokupne RNA s paramagnetnimi delci.

Pozitivni rezultati iz celokupne RNA, ki smo jo s paramagnetnimi delci izolirali iz ponovnih odvzemov brisov sečnice, odvzetih pri PI 085 (Slika 4-33) in domnevnem izločevalcu 042 (Slika 4-36) približno mesec in pol kasneje (5. marca 2007), pa kažejo na to, da so bili negativni rezultati lahko povezani tudi z napakami pri vzorčenju. Morebitne napake pri vzorčenju bi lahko kontrolirali le tako, da bi isti živali odvzeli bris sečnice večkrat in v določenih časovnih razmakih.

Iz omenjenih rezultatov lahko zaključimo, da je pri žrebcih polni ejakulat edina kužnina, v kateri lahko z molekularnimi metodami pri PI zanesljivo dokažemo okužbo z virusom EAV.

5.1.3 Molekularna epidemiologija

Raziskovalci še vedno niso dosegli soglasja glede razdelitve virusov EAV v genetske skupine in njihovega poimenovanja.

Na osnovi filogenetskih analiz ORF5 so viruse EAV sprva delili v dve glavni skupini. V eno skupino so uvrščali evropske, v drugo pa severnoameriške izolate (Balasuriya in sod., 1995b; Balasuriya in sod., 1998; Balasuriya in sod., 1999a; Guthrie in sod., 2003; Hornyák in sod., 2005; Larsen in sod., 2001; Stadejek in sod., 1999; St-Laurent in sod., 1997). Znotraj evropske skupine so opredelili tri podskupine IIA, IIB in IIC, medtem ko so severnoameriško skupino zastopali izolati iz podskupin IA in IB (Stadejek in sod., 1999). Leta 2005 so Hornyák in sod. (2005) opisali novo podskupino IID izolatov virusa EAV, ki so na Madžarskem krožili pred letom 2000.

Novejše raziskave Mittelholzerja in sod. (2006) ne podpirajo bipolarne razdelitve virusov EAV. Avtorji so v obširni filogenetski analizi, v katero so vključili 201 zaporedje ORF5, objavili novo razdelitev virusov EAV, ki bolje ponazarja evolucijsko sorodstvene odnose med virusi EAV. Z izjemo dveh izolatov so skoraj vse izolate iz Evrope uvrstili v genetsko skupino EAV-1, viruse EAV, ki so jih izolirali večinoma v Ameriki, so postavili v genetsko skupino EAV-2, skupina EAV-3 pa obsega tako izolate iz Evrope in viruse, ki so jih v Ameriki izolirali pri žrebcih uvoženih iz Evrope. Nekateri starejši izolati, ki jih niso vključili v nobeno izmed omenjenih genetskih skupin, so zastopani v skupini neuvrščenih izolatov.

Z namenom, da bi raziskali genetsko sorodnost med izolati virusa EAV iz slovenskega geografskega področja in virusi EAV, katerih informacija o nukleotidnem zaporedju je javno dostopna v genski banki GenBank, smo proučevali razlike na genu ORF5, ki je eden izmed najbolj variabilnih genov v genomu virusa EAV in ga zato najpogosteje uporabljajo kot molekularni marker v filogenetskih študijah.

V filogenetsko analizo smo vključili 156 zaporedij omenjenega gena. Oseminpetdeset nukleotidnih zaporedij smo določili v semenu žrebcev različnih pasem iz Slovenije. Kasač in lipicanec sta bili številčno najbolj zastopani pasmi.

Rezultati analize so pokazali, da so virusi EAV, ki krožijo v Sloveniji, zelo genetsko heterogeni. Večino vzorcev smo namreč razporedili v vse tri znane genetske skupine EAV-1, EAV-2 in EAV-3 (Slike 4-38, 4-39 in 4-40) in tako podprli »reformirano« razdelitev virusov EAV, ki jo je v soavtorstvu objavil Mittelholzer (Mittelholzer in sod., 2006).

Razporeditev virusov EAV, ki smo jih dokazali pri žrebcih pasme kasač, registriranih v Republiki Sloveniji, odseva intenzivno vključevanje slovenskih rejcev v mednarodno trgovanje s kopitarji. Večinoma smo predstavnike virusov EAV, ki smo jih uvozili iz drugih držav Evropske unije, uvrstili v genetski skupini EAV-1 in EAV-3.

Zanimivo je, da smo v semenu kasača BG (letnik 1991) dokazali različice virusa EAV (BG-06 in BG-07), ki se po do zdaj znanih podatkih iz literature (Mittelholzer in sod., 2006; Stadejek in sod., 1999) razlikujejo od doslej opisanih švedskih izolatov in se glede na naše rezultate filogenetskih analiz na osnovi ORF5 uvrščajo v genetsko skupino EAV-1, v kateri so zastopani izolati iz Avstrije, Francije, Katarja, Madžarske, Nemčije, Italije, Poljske in Velike Britanije. Poleg tega naši rezultati potrjujejo ugotovitve Mittelholzerja in sod. (2006), ki opisujejo, da se nekateri virusi iz Švedske (S3 in S4), med katerimi je tudi S1, eden izmed starejših izolatov virusa EAV, ki so ga leta 1989 izolirali iz semena švedskega kasača (letnik 1978) (Stadejek in sod., 1999), ne uvrščajo v nobeno izmed omenjenih genetskih skupin. Tvorijo skupino neuvrščenih virusov, medtem ko sta švedska izolata (S2 in S6) zastopana v genetski skupini EAV-3 (Slike 4-38, 4-39 in 4-40).

V literaturi tudi ni podatkov o tem, da bi bili v skupini EAV-1 opisani nizozemski izolati. Stadejek in sod. (1999) so nizozemski izolat NL1, ki so ga dokazali pri nizozemskem toplokrvnem konju, v svoji študiji umestili v skupino EAV-2 (IA), ki obsega viruse EAV iz severnoameriške celine. Domnevajo, da se je omenjeni konj okužil z ameriškim sevom že pred izvozom iz ZDA.

V naši raziskavi smo sev ID-04, ki smo ga določili pri nizozemskem toplokrvnem konju (letnik 1990), razvrstili v skupino EAV-1 (Slike 4-38, 4-39 in 4-40). Čeprav v Sloveniji reja toplokrvnih konj nima dolgoletne tradicije, so se nekateri rejci usmerili v rejo modernih športnih konj, primernih predvsem za preskakovanje ovir. Populacija plemenskih toplokrvnih konj pri nas je majhna, zato je nakup plemenskih živali iz Nizozemske in Nemčije običajen pojav, zaradi katerega obstaja velika možnost vnosa virusa EAV v našo državo. Seveda ne gre zanemariti dejstva, da se konji lahko okužijo tudi na večjih športnih prireditvah z mednarodno udeležbo. Kasač CV (letnik 1999) je tekmoval na dirkah v Italiji, Nemčiji, na Švedskem, v takratni Jugoslaviji in v ZDA. Vrhunske rezultate doma in v tujini je imel tudi žrebec PG (letnik 1997), ki ima za sabo uspešno tekmovalno kariero. Tekmoval je na Danskem, Švedskem, Norveškem in v Belgiji. V letu 2009 plemeni že peto leto. Seve virusa EAV, ki smo jih določili v vzorcih semena omenjenih žrebcev, smo umestili v skupino EAV-3 (Slike 4-38, 4-39 in 4-40). Tudi pri bavarskem toplokrvnem konju RA (letnik 1980) smo našli sev virusa EAV, ki spada v genotip EAV-3. Slednjega smo dokazali tudi v semenu nemških kasačev TA in IW. Iz filogenetskega drevesa je razvidno, da sevi virusa EAV, ki smo jih dokazali v semenu konj RA, CV in PG, pripadajo isti monofiletski skupini. Glede na to, da se je veja seva RA prva odcepila od istega skupnega prednika, bi lahko sklepali, da je bil žrebec RA vir okužbe za kasača CV in PG. Izčrpen pogovor z lastniki konj bi lahko bistveno pripomogel k nadaljnjemu iskanju dokazov, s katerimi bi lahko našo predpostavko potrdili ali ovrgli.

Z izjemo kasača AM iz Lexingtona prisotnost genotipa EAV-2 v naši državi sovpada z geografskim poreklom žrebcev pasme ameriški kasač. Najverjetneje sta se iz ZDA uvožena plemenjaka SL in PP z virusom EAV okužila že pred prihodom v Slovenijo. Uvrstitev seva AM-01 v genetsko skupino EAV-1 je jasen dokaz za to, da se ameriški kasač AM (letnik 1995) ni okužil v domovini, temveč v Evropi.

Rezultati filogenetske primerjave kažejo, da smo seva SM-02 in SM-03, ki smo ju dokazali v semenu finskega kasača SM (letnik 1988), dodelili skupini neuvrščenih izolatov (Slike 4-38, 4-39 in 4-40). V isto skupino so se razvrstili tudi izolati H5, H9, H10 in H21, ki so povezani z izbruhi KAK na Madžarskem, ter izolati iz Južnoafriške republike RSA4, RSA6 in RSA8. Slednjega so izolirali iz semena perzistentno okuženega lipicanca S (letnik 1973), rojenega v Đakovem, ki so ga leta 1981 izvozili v JAR. Ko so leta 1988 spoznali, da je žrebec S

izločevalec virusa EAV, so ga pridržali v karanteni do njegove smrti leta 1993. Izolacija in prepoved pripusta nista preprečila prenosa virusa EAV na druge konje. Kljub dobri vsakodnevni higieni praksi, ki jo izvajajo pred treningom, je v vzrejnem centru v Gautengu prišlo do horizontalnega prenosa virusa iz žrebca S na konje, ki so bili nastanjeni v individualnih boksih v sosednjih hlevih (Guthrie in sod., 2003).

Z raziskavo smo potrdili rezultate Stadejeka in sod. (1999), ki trdijo, da je ameriški izolat USA2, ki so ga leta 1963 izolirali pri konju pasme »American saddlebred«, najverjetneje evropskega izvora.

V nasprotju z Mittelholzerjem in sod. (2006), ki omenjene izolate ne uvrščajo v nobeno izmed treh genetskih skupin, rezultati naše analize kažejo, da se zgoraj omenjeni izolati razporejajo v samostojno skupino evropskih izolatov virusa EAV, ki je dobila najboljšo podporo na Bayesovem drevesu (0,95). To potrjujejo tudi novejša raziskava Zhanga in sod. (2007), ki so nevrščene izolate umestili v evropsko skupino EU-1.

Naše filogenetske analize so seve iz reje A prepoznale kot povsem samostojno skupino virusov EAV, ki v dosedanjih filogenetskih študijah še niso bili opisani.

Balasuriya in sod. (1995b, 2004c) so ugotovili, da so si zaporedja ORF5 evropskih in severnoameriških izolatov virusa EAV med seboj identična v 85 %. Skladno z navedenimi podatki je identičnost med nukleotidnimi zaporedji ORF5 kraških sevov in zaporedjem referenčnega seva Bucyrus od 79,8 do 84,8-odstotna.

Pri ugotavljanju razlik med zaporedji kraških sevov in zaporedji sevov iz drugih genetskih skupin (Tabela 4-9) smo največje razlike ugotovili med nevrščenimi izolati (RSA6, H9, H10, SM-02 in SM-03). Zaporedja iz reje A in nekateri predstavniki iz genetske skupine EAV-2 pa imajo največ identičnih nukleotidov (87,9 %).

Reja A aktivno sodeluje z lipicanskimi kobilarnami iz drugih držav (Piber v Avstriji, Đakovo na Hrvaškem, Vučijak v Bosni in Hercegovini, Szilvasvard in Kincsemlovaspark na Madžarskem ter Topolcianky na Slovaškem). Prizadevajo si zagotoviti ustrezno zastopanost plemenskih živali določenih rodov in linij z izposojami ali nakupom konjev iz tujine, zato obstaja velika možnost za vnos tujih sevov virusa EAV v rejo.

Toda rezultati filogenetskih analiz kažejo, da so sevi virusa EAV v reji A unikum. Kljub trgovanju s tujino se kraški sevi očitno razlikujejo tako od madžarskih (Tabele 3-6a, 3-6b, 3-6c in 3-6d ter Slike 4-38, 4-39 in 4-40) kot od hrvaškega seva RSA8 iz Đakova. Za potrditev

edinstvenosti genetske strukture in geografske izolacije kraških sevov bi bilo treba pridobiti in analizirati tudi zaporedja izolatov virusa EAV iz Hrvaške, Bosne in Hercegovine ter Slovaške. Žal pa podatkov, ki bi se nanašali na viruse EAV iz omenjenih držav, nimamo.

Položaj kraških sevov je na vseh treh filogenetskih drevesih zelo dobro podprt (NJ – 999, BI – 0,99, ML – 999) (Slike 4-38, 4-39 in 4-40). Znotraj samostojne genetske skupine so kraški sevi razporejeni v tri klade (Slika 4-42). Na vseh treh drevesih (Slike 4-38, 4-39 in 4-40) je dobro podprta monofilija klada, ki združuje seve, ki imajo s sevom 926-07, določenem pri enem izmed najstarejših žrebcev v reji A 926 (letnik 1986), istega skupnega prednika. Sevu 926-07 sorodne viruse EAV smo našli pri žrebcih (letnik od 1996 do 2002), ki so najmanj 10 let mlajši od lipicanca 926.

Sestrski klad omenjenemu kladu tvorita dve monofiletski skupini sevov. Prva skupina sevov si na drevesih NJ (Slika 4-38) in BI (Slika 4-39) s sevom 987-05, dokazanem pri žrebcu 987 (letnik 1988), deli istega zadnjega prednika virusa EAV. Potomce slednjega smo dokazali tudi pri žrebcih (letnik od 1990 do 1995), ki so mlajši od žrebca 987. Iz navedenega sklepamo, da so se mlajše živali najverjetneje okužile od starejših kroničnih nosilcev virusa EAV.

V drugi skupini sevov sta na drevesih NJ (Slika 4-38) in ML (Slika 4-40) zastopana seva 795-07 in 840-05, ki smo ju dokazali pri dveh najstarejših žrebcih v reji A (letnik 1981 in 1983) in sev 282-06, ki smo ga dokazali pri žrebcu (letnik 1999). Medtem ko je pozicija sevov 795-07 in 840-05 na drevesih BI (Slika 4-39) in ML (Slika 4-40) dobro podprta, je ostala pozicija seva 282-06 nerazrešena. Slednji se na drevesih NJ (Slika 4-38) in ML (Slika 4-40) združuje v monofiletsko skupino s sevoma 795-07 in 840-05, na Bayesovem drevesu (Slika 4-39) pa je sev 282-06 sestrski takson skupini sevov, ki s sevom 987-05 izhajajo iz skupnega prednika. Tudi filogenetski položaj slednjega in njemu sestrskega seva 987-01 se na drevesih NJ, BI in ML ne ujema.

Pri ugotavljanju sorodstvenih odnosov lahko kombinacija kratkih in izredno dolgih vej problematičnih taksonov 282-06, 987-01 in 987-05, ki so posledica velike hitrosti evolucije omenjenih sevov, privede do pojava, imenovanega privlak dolgih vej (*angl. »long branch attraction«*) (Felsenstein, 1978). Taksoni z dolgimi vejami se postavijo skupaj (npr. 282-06 se kot sestrski sev postavi skupaj s sevoma 795-07 in 840-05 na drevesih NJ in ML), ne glede na njihove resnične filogenetske odnose. Čeprav lahko iz filogenetskih dreves NJ (Slika 4-38) in ML (Slika 4-40) razberemo, da je s filogenetskega stališča sev 282-06 starejši od sevov 795-07 in 840-05, pa kljub temu dvomimo, da se žrebec 282 ni okužil od starejših nosilcev virusa

EAV. Glede na to, da je bil med našo raziskavo žrebec 282 vhlevljen v istem hlevu kot starejša žrebca 926 in 987, je filogenetski status seva 282-06, ki kaže, da je sev 282-06 sestrski takson kladu, iz katerega je bazalno odcepljen sev 987-05, še najboljše opredeljen na Bayesovem drevesu (Slika 4-39).

Za popolnejšo sliko filogenetskih odnosov med sevi virusa EAV v reji A bi bilo v analizo treba vključiti tudi zaporedja genomov virusov, ki bi jih dokazali v semenu tudi drugih serološko pozitivnih žrebcev sive starosti. Leta 2006 je bilo med njimi 10 serološko pozitivnih živali, starih od 18 do 33 let (rojenih pred letom 1990), katerih seme še nikoli ni bilo pregledano na virus EAV.

Če smo s hitro spreminjajočimi se zaporedji ORF5 razrešili odnose med posameznimi genetskimi skupinami (EAV-1, EAV-2, EAV-3, IIC, neuvrščeni in reja A), pa določenih odnosov med sevi na nivoju istega hleva nismo razrešili. Najverjetneje bi filogenetske odnose med virusi EAV v reji A bolje razrešili, če bi filogenetska drevesa izračunali na osnovi informacije zaporedja celotnega genoma virusa EAV.

S filogenetsko analizo variabilnega gena ORF5 (Slika 4-42) smo uspeli retrospektivno ugotoviti širjenje virusa EAV med nekaterimi žrebci v reji A. Tako so na primer bili v hlevu NHL z virusom EAV okuženi žrebci razporejeni v individualnih boksih v isti vrsti, in sicer tako, da so bili dne 15. januarja 2007 razvrščeni zaporedoma drug poleg drugega žrebec 840 (letnik 1983), žrebec 122 (letnik 1994) in žrebec 344 (letnik 2002) (Priloga B). Sodeč po epizootioloških podatkih, ki temeljijo na rezultatih seroloških preiskav in lokaciji omenjenih žrebcev, smo sprva domnevali, da sta se žrebca 122 in 344 okužila od starejšega žrebca 840. Filogram (Slika 4-42) pa nam je razkril, da nukleotidna zaporedja sevov 840-05, 122-03 in 344-07 niso sorodna, ker pripadajo različnim monofiletskim skupinam, kar je neizpodbiten dokaz, da žrebca 122 in 344 ni okužil žrebec 840. Ugotovljeni sorodstveni odnosi med zaporedji 344-07_I in II, 261-06_I in II ter zaporedji 122-03 in 031-03 so nas privedli do naslednjih ugotovitev: žrebec 344 se je najverjetneje okužil od žrebca 261, žrebec 122 pa od žrebca 031. Temu v prid govorijo tudi serološki rezultati (Tabela 4-1), iz katerih je razvidno, da je prišlo do okužbe z virusom EAV pri žrebcu 261 prej kot pri 344 in prej pri žrebcu 031 kot pri 122. Čeprav sta bila slednja dne 15. januarja 2007 vhlevljena v različnih hlevih (HL11L in NHL), zbrani epizootiološki podatki kažejo, da je bila razporeditev omenjenih

konjev po hlevih v preteklosti najverjetneje takšna, da so bili med njima omogočeni pogoji za prenos virusa EAV.

Rejskemu cilju primerno se posamezna kategorija konj v reji A namesti v določene hleve. Plemenski žrebci so vhlevljeni v individualnih boksih, kobile so vhlevljene v skupnem hlevu, delovni konji pa so razporejeni glede na zvrst rabe v hleve za turistični program in vprege, hleve za trening ter hlev za vojaško enoto jahanja. Na osnovi selekcijskega programa se lahko spreminja namembnost konja in s tem tudi njegova nastanitev. Kljub temu da so konji vhlevljeni v individualnih boksih, morajo po zoohigijskih normativih reje konj imeti možnost vidnega, slušnega in vonjalnega kontakta s sovrstniki (<http://www.bfro.uni-lj.si/Kat-genet/Konji/Pedagosko/Predavanja/05StuhecEtoZooNormativi.pdf>), kar pa v primeru premestitve izločevalcev virusa EAV ustvarja veliko možnost za širjenje virusa med konji. Z enega konja na drugega se okužba z virusom EAV lahko prenese tudi posredno s kontaminiranim priborom za nego in jemanje semena (umetna vagina), hlevskim orodjem in s slamo. Glede na to, da se virus EAV ob prisotnosti organske snovi ohrani v vlažnem in hladnem okolju tudi do 24 ur (http://www.cvmbs.colostate.edu/bms/erl/evaupdate_f06.pdf), prav tako ne smemo zanemariti možnosti prenosa virusa s steljo, ki je lahko onesnažena s spermo okuženih konj (Guthrie in sod., 2003).

Med perzistentno okužbo je pri virusu EAV kopičenje nukleotidnih zamenjav eden izmed pomembnejših mehanizmov, ki vplivajo na evolucijo močno variabilnega zaporedja ORF5 (Balasuriya in sod., 2004c). Na ravni zaporedja aminokislin se visoka mutabilnost izraža predvsem v regiji V₁ (aa 61–121), kjer se nahajajo poglavitne nevtralizacijske determinante virusa EAV (Balasuriya in sod., 1995a) (Slika 4-41).

Pri obravnavani skupini zaporedij, ki smo jih dokazali v vzorcih semena, odvzetih pri PI 168, 213, 068 in 087 v razmaku enega leta, so se dominantne variante virusa EAV v odseku gena ORF5 razlikovale v povprečju za 0,969 % na leto (Tabela 4-10). Za razliko od Hornyáka in sod. (2005), ki so ugotovili, da je lahko število raznolikih nukleotidnih mest med zaporedji tudi večje in znaša 2,73 % na leto, pa polimorfnost med slovenskimi zaporedji ORF5 ni presegla 1,4 % na leto (Tabela 4-10). Po daljšem času ločitve dveh homolognih zaporedij je bilo število nukleotidnih zamenjav pričakovano večje. Podatki v tabeli 4-11 kažejo, da je po petih letih med zaporedjema 213-02 in 213-07 odstotek razlik 2,2 %. Ta vrednost se ujema z oceno Balasuriya in sod. (2004c), ki so po enakem časovnem obdobju ugotovili med sevoma

CW96 in CW01 (na slikah 4-38 do 4-40 v genetski skupini EAV-3) 2,3 % razlik. Med zaporedjema 987-01 in 987-05 pa smo na odseku 495 nukleotidov ugotovili kar 40 mest z različnima nukleotidoma, kar ustreza 8 % razlik (Tabela 4-11). Vendar je ocenjevanje sorodnosti med dvema zaporedjema samo na podlagi neposredne primerjave njunih nukleotidnih zaporedij, tako da upoštevamo le mutacije, ki so se ohranile do danes, vedno pristransko, saj podcenjuje dejansko število substitucij.

Nastajanje mutacij je kontinuiran dinamičen proces, zato obstaja velika verjetnost, da se v obeh primerjanih zaporedjih, ki izhajata iz istega prednika, po določenem času ločitve začnejo kopičiti mutacije. Zaradi vzvratne in večkratne zamenjave ali hkratnih dogodkov, kot sta konvergentna in vzporedna zamenjava, se lahko na določenem mestu v obeh zaporedjih pojavita enaka nukleotida. Substitucije se bodo dogajale tudi na istih pozicijah, zato bomo zaznali manj mutacij, kot se jih je v resnici zgodilo.

Kadar se zaporedja ne razlikujejo preveč ($< 10\%$), se za izračunavanje evolucijskih odnosov med zaporedji poslužujemo preprostega enoparametričnega evolucijskega modela. Kadar pa so razlike med njimi večje ($10\text{--}20\%$), uporabimo kompleksnejši dvoparametrični model.

Znotraj skupine kraških sevov je bilo ujemanje najmanjše ($84,24\%$) med zaporedjema 168-06 in 987-01 ter zaporedjema 168-07 in 987-01. Primerjava je pokazala, da sta se omenjena para primerjanih zaporedij na odseku 495 nukleotidov v danem trenutku razlikovala za 78 nukleotidov ($15,76\%$). Da bi se čim bolj približali oceni pravega števila razlik med pari primerjanih zaporedji, smo za izračunavanje evolucijskih odnosov med njimi uporabili Kimurov dvoparametrični evolucijski model (Slika 4-42 in Tabela 4-10). Parne genetske razdalje homolognih zaporedij iz vzorcev semena perzistentnih izločevalcev 168, 213, 068 in 087 naraščajo sorazmerno s časom (Slika 4-42 in Priloga C).

Naši rezultati (Slika 4-43) so v skladu s sorodnimi študijami, ki prav tako kažejo, da ne poteka evolucija virusov EAV samo linearno, temveč tudi preko kvazivrst (Balasuriya in sod., 1995b; Hedges in sod., 1999). Gre za način organizacije vseh genomov v določeni populaciji virusov z RNA, za katere je poleg hitrega razmnoževalnega cikla (kratek generacijski čas) značilna tudi hitra nevtralna evolucija, ki lahko znaša od 10^{-2} do 10^{-3} zamenjav/nukleotidno mesto/leto (Steinhauer in Holland, 1987). Takšna substitucijska hitrost teoretično pomeni, da se posamezne molekule RNA v enem ali več nukleotidih razlikujejo od skupnega (konsenzusnega) zaporedja celotne populacije genomov (Domingo, 1997).

Če je še do nedavnega veljalo, da izhaja hitra molekulska evolucija virusov z RNA predvsem iz virusne RNA odvisne polimeraze RNA (RdRp), ki nima kontrolnega branja (eksonukleazne aktivnosti) (*angl. proofreading*) (Domingo in sod., 1997) kot tudi ne posttranskripcijskih popravljalnih mehanizmov (Steinhauer in sod., 1992), se skupina znanstvenikov (Freistadt in sod., 2007), ki proučujejo delovanje poliovirusne polimeraze 3D^{pol}, nagiba k drugačnemu stališču. Po njihovem mnenju so v evoluciji virusov z RNA na delu še drugi neznani mehanizmi. Visoko stopnjo variacij pri virusih z RNA pripisujejo virusnim ali gostiteljevim regulatornim faktorjem, rekombinacijam, delecijam, insercijam, tavitometriji baz, popravljalnim mehanizmom molekul RNA in selekciji (Freistadt in sod., 2007).

Kljub navedenemu za hitro evolucijo pri virusih z RNA ni enostavne razlage, kajti hitrost nukleotidne zamenjave je odvisna tako od pogostosti mutacije in verjetnosti za njeno fiksacijo kot od hitrosti razmnoževanja posameznega virusa (Jenkins in sod., 2002). Pokazalo se je, da je stopnja zamenjave nukleotidov pri virusu influence A in virusu HIV-1 skozi čas konstantna. Enakomerno nastajanje nevtralnih mutacij kaže na to, da evolucija pri omenjenih virusih sledi molekulski uri (Gojobori in sod., 1990; Albert in Leitner, 1999).

Molekulski filogenetiki so ugotovili, da za večino virusov z RNA, vključno z virusom EAV, teorija o molekulski uri ne velja (Jenkins in sod., 2002). Izvzeti niso niti sevi virusa EAV iz reje A, za katere smo s testom razmerja verjetij (LRT, *angl. likelihood ratio test*, $\Delta=2*(\ln L_1 - \ln L_0)$), ovrgli ničelno hipotezo o obstoju enakomerno spreminjajočih se virusnih linijah (hi-kvadrat = 430,24 pri 37 stopinjah prostosti, $P < 0,00001$) (Priloga D).

V okviru filogenetskih metod je evolucijski proces, ki poteka med dvema ekstremoma kontinuuma: med evolucijskim modelom brez korenine in modelom s striktno molekulsko uro, kjer je poleg vpogleda v sorodstvena razmerja med taksoni znan tudi čas njihove medsebojne divergence, najbližji dejanskemu poteku filogeneze. Vmesno rešitev predstavljajo »sproščeni« modeli molekulske ure (*angl. relaxed molecular clock*) na osnovi Bayesovega pristopa, ki temelji na Markovskih verigah (MCMC, *angl. Markov chain Monte Carlo*) (Hastings, 1970). Te metode omogočajo ugotavljanje filogenetskih odnosov med taksoni, ki se razvijajo različno hitro, poleg tega lahko z njimi ocenimo tudi čas medsebojne ločitve dveh zaporedij (Drummond in sod., 2006).

Virusi iz družine *Arteriviridae* imajo različne hitrosti molekulske evolucije. Medtem ko Hanada in sod. (2005) poročajo, da virus PRRS s hitrostjo evolucije sinonimnih zamenjav razreda 10^{-2} evoluiral izredno hitro, pa je iz tabele 4-10 razvidno, da je hitrost nukleotidnih

zamenjav pri kraških sevih virusa EAV, ki smo jo ocenili na podlagi genetskih razdalj, izračunanih po Kimurovem dvoparametričnem modelu K2P ($4,8 \times 10^{-3}$), 10-krat nižja. Ocenjena hitrost evolucije sovпада s povprečno hitrostjo ($3,41 \times 10^{-3}$, program Beast v1.4.8), ki smo jo na podlagi evlucijskega modela HKY pri vseh 39 kraških zaporedij ORF5 ugotovili z metodo sproščene molekulske ure (Priloga E).

Visoka stopnja polimorfizma ORF5 je virusom EAV iz reje A podelila svojevrstno zaporedje aminokislin, ki sestavljajo glikozilacijski protein GP₅. Iz poravnave z referenčnim sevom Bucyrus izstopajo predvsem mesta v variabilni regiji V₁ (Slika 4-41), kjer se nahajajo nevtralizacijske determinante B (61 aa), C (67–90 aa) in D (99–106 aa). Polimorfna mesta zajemajo aminokislino v področjih 64-91, 99-110 in 115-112 (zelena območja na sliki 4-41). Na nevtralizacijskih mestih C in D smo naleteli na aminokislino, po katerih se aminokislinska zaporedja kraških sevov razlikujejo od sevov iz drugih genetskih in neuvrščenih skupin. Naši rezultati deloma potrjujejo ugotovitve Balasuriye in sod. (1995b), ki so ugotovili, da so aminokislino med terenskimi izolati virusa EAV, vključenih v analizo, na mestih 79, 85, 89 in 90, ohranjene. Kot je razvidno iz poravnave aminokislinskih zaporedij na sliki 4-41, so kraška zaporedja izjeme, za katera zgoraj navedena ugotovitev ne velja povsem. V zaporedjih 213-02 in 168 se namreč na mestih 85 in 89 nahajajo aminokislino, po katerih se kraški sevi razlikujejo od vseh ostalih sevov v poravnavi. V zaporedju 213-02 je na mestu 85 fenilalanin, pri sevih iz semena žrebca 168 pa prolin. V semenu slednjega smo dokazali slovenska seva 168-03 in 168-06, edina, ki imata na mestu 89 aminokislino levcin. Polimorfni mest je na nevtralizacijskih epitopih C in D, kjer se aminokislino kraških sevov razlikujejo od aminokislin drugih sevov v poravnavi, še več. Na sliki 4-41 so označena s temno zeleno barvo.

V regiji V₁ se na ravni aminokislinskega zaporedja med seboj ne razlikujejo samo evropski in ameriški virusi EAV (Balasuriya in sod., 1995b; Balasuriya in sod., 1997; Balasuriya in sod., 1998), ampak tudi izolati iz zaporednih vzorcev semena istega PI. Raziskave so pokazale, da med spremenjenim aminokislinskim zaporedjem na nevtralizacijskih mestih B in C in nevtralizacijskim fenotipom obstaja tesna povezava (Balasuriya in sod., 1995a; Balasuriya in sod., 1997; Balasuriya in sod., 2004a; Balasuriya in sod., 2004c; Glaser in sod., 1995; Hedges in sod., 1999b). Kritične so predvsem tiste nesinonimne nukleotidne zamenjave v genu ORF5, ki se v imunodominantnih epitopih poglavitnega glikozilacijskega proteina GP₅ izrazijo z

zamenjavami aminokislin na mestih 61, 69, 99 in 104. Značilne zamenjave, kot so zamenjava lizina z glutamatom ali glutaminom na mestu 61 (K>E, Q), zamenjava levcina z alaninom na mestu 69 (L>A, P), zamenjava tirozina z valinom, levcinom, izolevcinom ali prolinom na mestu 99 (Y>V, L, I ali P) ter zamenjava aspartata z glicinom, valinom ali asparaginom na mestu 104 (D>G, V, N) ali zamenjava asparagina z aspartatom na enakem mestu (N>D), podeljujejo nekaterim terenskim izolatom virusa EAV in laboratorijskim mutantnim sevom EM (*angl. escape mutant*) rezistenco na nevtralizacijo z monoklonskimi protitelesi (Balasuriya in sod., 1993; Balasuriya in sod., 1995a; Balasuriya in sod., 1997; Deregt in sod., 1994), ki so uperjeni proti določenim linearnim ali konformacijsko odvisnim epitopom (Balasuriya in sod., 1995a; Balasuriya in sod., 1997; Glaser in sod., 1995; Hedges in sod., 1999, Balasuriya in sod., 2004a). Omenjeni polimorfizmi antigenskih determinant se fenotipsko odražajo v več kot štirikrat nižjem nevtralizacijskem titru (Balasuriya in sod., 1997; Hedges in sod., 1999b).

Glede na to, da so aminokislinske zamenjave, ki so pri kraških sevih nastale na mestih 69, 99 in 104, enake zamenjavam (Tabela 4-11), kot so jih ugotovili pri sevih EM, pridobljenimi s selekcijo *in vitro* (Balasuriya in sod., 1995a), in pri nekaterih terenskih izolatih virusa EAV, ki so naravno odporni proti nevtralizaciji (Glaser in sod., 1995), lahko sklepamo, da bi bila nevtralizacija kraških izolatov s specifičnimi monoklonskimi protitelesi manj učinkovita ali pa sploh ne. Vsekakor bi bilo treba to domnevo tudi empirično potrditi.

Med perzistentno okužbo nastale mutacije pri kraških sevih virusa EAV (Tabela 4-11), ki so se na ravni primarne strukture GP₅ pokazale v regiji V₁ kot zamenjave aminokislin s povsem drugačnim značajem, kot so ga imele prvotne, so v večini primerov privedle do nastanka novih, bolj hidrofilnih antigenskih determinant (Slika 4-45). Diametralno nasprotni so rezultati sorodne študije, v kateri poročajo, da so pri večini v analizo zajetih izolatov virusa EAV, ki pripadajo različnim filogenetskim skupinam, spremembe aminokislin v področju V₁ naredile površinski antigen bolj hidrofoben (Balasuriya in sod., 1995b). Takšen tip antigenske variacije smo zaznali le pri sevu 987-05 (Slika 4-45).

Velja omeniti še to, da zaradi konformacijskih interakcij med oddaljenimi epitopi (Balasuriya in sod., 2004a), segajo spremembe antigenskih determinant večkrat tudi v tista področja, kjer so aminokislinski ostanki med dvema primerjanima sevoma popolnoma identični (Slika 4-54).

Kot večina avtorjev (Balasuriya in sod., 2004c; Hedges in sod., 1999b) smo tudi mi dokazali, da se nesinonimne mutacije v genu ORF5, ki povzročajo spremembe aminokislinskega zaporedja v glikoproteinu GP₅, med perzistentno okužbo ne fiksirajo pogosto (Tabela 4-11). To vsekakor kaže na to, da pozitivna selekcija ni imela prevladujoče vloge pri evoluciji analiziranega odseka v ORF5. Izjema so dominantne variante v vzorcih semena PI 068, pri katerih so nesinonimne zamenjave bile bolj pogoste kot sinonimne (Tabela 4-11). Seleksijski pritisk učinkuje tako, da fiksira nesinonimne zamenjave, s čimer ustvarja nove variante virusa EAV, katerih glavni atribut je mimikrija nevtralizacijskih determinant. Ta jim omogoča, da se izognejo gostiteljevemu imunskemu odzivu (Balasuriya in sod., 2004b). Osamljen primer pozitivne selekcije priča, da bi lahko večje aminokislinske spremembe škodile strukturi proteina (Glaser in sod., 1995), zato imunski pritisk deluje na GP₅ le do take mere, da fiksira tiste mutacije, ki niso usodne za preživetje virusa. Popolnoma ohranjeni elementi sekundarne strukture glikoproteina GP₅ (Sliki 4-46 in 4-47) delujejo kot protiutež genomski pestrosti, ki virusom EAV iz reje A daje sposobnost, da se hitreje odzovejo na seleksijske pritiske.

Poleg glikozilacijskega mesta 56, ki je ključnega pomena za infektivnost virusa EAV (Balasuriya in sod., 2004b), je pri kraških sevih kot tudi pri večini drugih terenskih izolatih na mestu 81 aminokislina asparagin (N) povezana z aminosladkorjem (Slika 4-41) (Balasuriya in sod., 1995a; Balasuriya in sod., 1995b; Balasuriya in sod., 1999a; Snijder in sod., 2003). Za druge viruse iz rodu *Arterivirus* (PRRSV in LDV) na splošno velja, da odsotnost *N*-glikanov naredi površinske epitope bolj imunogene, spremeni tropizem virusa za celice in poveča njegovo virulenco (Balasuriya in sod., 2004c). Za razliko od prej naštetih virusov, pa izguba glikozilacijskega mesta 81 ne prizadene bioloških značilnosti virusa EAV (Balasuriya in sod., 2004a).

5.1.4 Biološke značilnosti slovenskih izolatov virusa EAV

Čeprav je med virusi EAV poznan le en serotip, se sevi virusa EAV ne razlikujejo samo v nevtralizacijskem fenotipu, temveč tudi v virulenci (Balasuriya in sod., 1998; Balasuriya in sod., 1999a; Balasuriya in sod., 1999b; Balasuriya in sod., 2004a; McCollum in Swerczek, 1978; McCollum in Timoney, 1999; Moore in sod., 2002; Patton in sod., 1999; Westcott in sod., 1995). Z razvojem reverzne genetike se na področju odkrivanja genetskih osnov za pojav razlik v virulenci kažejo boljši obeti. Ta tehnološki pristop je prispeval k razkritju

molekularnih mehanizmov, ki vplivajo na zmanjšanje virulence velogenega seva Bucyrus (VB, GenBank DQ846750, Balasuriya in sod., 2007). S pasažami tega seva v celičnih kulturah so pripravili atenuirano vakcino ARVAC® (Forte Dodge Animal Health, ZDA). Atenuirani fenotip lentogenega vakcinalnega seva naj bi bil povezan s štirimi aminokislinskimi zamenjavami v nestrukturnih proteinih virusne replikaze pp1ab (nsp1, nsp2 in nsp7) ter devetimi v strukturnih proteinih (GP₂, GP₄, GP₅ in M). Pri atenuaciji imajo večjo vlogo mutacije v strukturnih proteinih (Balasuriya in sod., 2008), med katerimi lahko posebej izpostavimo tri zamenjave v glikoproteinu GP₅, in sicer: zamenjave asparagina v aspartat na mestu 81 (N>D), serina v glicin na mestu 100 (S>G) in aspartata v glicin na mestu 104 (D>G). Omenjene zamenjave smo zasledili tudi v nekaterih aminokislinskih zaporedjih kraških sevov (Slika 4-41). Čeprav nam ohranjenost glikozilacijskega mesta 81 (N), serina (S) in aspartata (D) na mestih 100 in 104 (Slika 4-41) daje vtis, kot da bi lahko bili nekateri kraški izolati virusa EAV virulentni, pa v reji A še nismo ugotovili primera KAK z izraženo klinično sliko. Zato lahko domnevamo, da omenjene aminokislinske zamenjave očitno niso edini kritični molekularni dejavnik, ki bi vplival na izražanje virulence pri kraških sevih virusa EAV.

Vzrok za pojav avirulentnega fenotipa pri večini terenskih izolatov virusa EAV še ni raziskan (Balasuriya in sod., 2007). Balasuriya meni, da za avirulentnost terenskih izolatov ni odgovoren le en gen, temveč je pri zmanjšanju virulence vpletenih še več mutacij tudi v drugih delih virusnega genoma (osebno sporočilo).

Diagnoza KAK sloni na izolaciji virusa v celični kulturi, določitvi virusne nukleinske kisline z metodo RT-PCR ali na testiranju parnih serumskih vzorcev na prisotnost protiteles proti virusu EAV v akutnem obdobju in v rekonvalescenci (Balasuriya in sod., 2004b; Timoney in McCollum, 1993).

Tudi pri odkrivanju PI je izolacija virusa v celični kulturi RK-13 temeljna diagnostična metoda za dokazovanje virusa EAV v semenu. Za ciljno potrjevanje virusnega antigena običajno izvajamo encimsko imunske teste. Možna je tudi nevtralizacija virusa s poliklonskim konjskim serumom, ki je pripravljen z referenčnim virusom Bucyrus (Glaser in sod., 1995; Diagnostični priročnik OIE, 2004).

Kljub temu da so klasične virološke preiskave drage in dolgotrajne, ostaja metoda izolacije virusa EAV v celični kulturi RK-13 »zlati standard«. To potrjujejo tudi izsledki najnovejše

raziskave (Lu in sod., 2008), ki kažejo, da s stališča občutljivosti klasična metoda izolacije virusa v celični kulturi prekaša metodo RT-PCR v realnem času ne samo v primerih, ko je količina virusa EAV v semenu majhna, temveč tudi, ko je v odvzetem vzorcu semena večja količina smegme. Obstaja verjetnost, da so v smegmi navzoči inhibitorji pomnoževanja tarčne cDNA, zaradi katerih se lahko pojavijo lažno negativni rezultati.

V Referenčnem laboratoriju OIE za diagnostiko KAK, v katerem opravljajo potrditvene analize, ugotavljajo, da je v več kot 97 % vzorcev semena količina virusa EAV tako majhna ($< 1,5 \times 10^2$ PFU/ml), da ga tudi z metodo RT-PCR v realnem času večkrat ne zaznajo (Lu in sod., 2008).

Čeprav je za dokazovanje virusa EAV v semenu klasična metoda izolacije virusa v celični kulturi referenčna in s strani Mednarodne organizacije za zdravje živali (OIE) edina mednarodno priznana metoda, se v večini laboratorijev po svetu uporablja metoda RT-PCR, ki je kot presejalni in diagnostični test prevzela vodilno vlogo pri iskanju PI med serološko pozitivnimi žrebci in za potrjevanje izločevalcev virusa EAV s semenom (Chirnside in Spaan, 1990; Gilbert in sod., 1997; Ramina in sod., 1999; Stadejek in sod., 1999; Starick, 1998; St-Laurent in sod., 1994).

V našem laboratoriju smo dokazovanje virusa EAV v semenu serološko pozitivnih žrebcev zasnovali v dveh stopnjah. V prvi smo z metodo RT-PCR v vzorcih semena določali virusno nukleinsko kislino, v drugi pa smo iz vzorcev semena, pozitivnih z RT-PCR, poizkušali izolirati virus EAV (Tabeli 4-12 in 4-13). Navedeni postopek smo izbrali zato, ker smo na začetku naše raziskave zaznali velika odstopanja med rezultati obeh preiskav.

Tudi drugi avtorji ugotavljajo, da so molekularne metode za dokazovanje nukleinske kisline virusa EAV v semenu in organih abortiranih žrebet bolj občutljive kot tradicionalni postopek izolacije virusa v celični kulturi (Hornýák in sod., 2006; Ramina in sod., 1999; Starick, 1998; Szeredi in sod., 2005). Frakcija pridobljenega ejakulata, ki vsebuje malo semena in veliko semenske plazme, nepravilno rokovanje z odvzetim vzorcem semena (Huntington in sod., 1990), toksičnost semena (Chirnside in Spaan, 1990; Legeay in sod., 1997; St-Laurent in sod., 1994; Vernazza in sod., 1996) in manjša dovzetnost celic RK-13 za okužbo z virusom EAV (Horner, 2004; Larska in Lora, 2003) so dejavniki, zaradi katerih je lahko rezultat izolacije virusa EAV v celični kulturi lažno negativen.

V manjši študiji, v katero smo zajeli vzorce semena 16 serološko pozitivnih žrebcev, smo nukleinsko kislino virusa EAV dokazali v osmih vzorcih semena, iz katerih smo s postopkom

izolacije virusa v celični kulturi RK-13 uspešno namnožili le en izolat virusa EAV (Mankoč in sod., 2002). Tudi rezultati nadaljnjih raziskav niso bili prav vzpodbudni. Med 28 vzorci semena kraških žrebcev, v katerih je bil virus EAV predhodno potrjen z molekularnimi metodami (Tabele 4-4, 4-5, 4-6, 4-7 in 4-8), smo virus izolirali le iz štirinajstih vzorcev (V tabeli 4-12 so označeni z rožnato barvo).

Tudi iz semena kasačev smo izolirali zelo malo virusov (36 %) (Tabela 4-13). Vse štiri seve, ki smo jih uspeli izolirati (AM-01, SL-03, SM-03 in CV-05), uvrščamo v različne genetske skupine (Slike 4-38, 4-39 in 4-40).

Negativni rezultati izolacije v celični kulturi tudi pri virusih iz drugih genetskih skupin potrjujejo, da neuspešnost izolacije pri kraških sevih ni povezana z njihovo genetsko strukturo. Še več, naši poskusi kažejo, da med izolati virusa EAV iz različnih genetskih skupin obstajajo tudi določene stične točke v nekaterih bioloških značilnostih. Rast izolata 068-05, ki smo ga pridobili iz semena kraškega PI 068 (Slike 4-48 in 4-49), smo primerjali z rastjo izolata CV-05 iz semena slovenskega kasača CV (Slika 4-48) iz genetske skupine EAV-3 (Slike 4-38, 4-39 in 4-40). Enaka dinamika rasti in obseg poškodb celičnega sloja pri obeh sevih različnih genotipov nakazuje, da kraški izolati virusa EAV niso nikakršna posebnost. Trditev, da svojevrstni kraški genotip ni vzrok za lažno negativne rezultate izolacije virusa v celični kulturi, lahko potrdimo tudi na primeru PI 213. V njegovem semenu smo dokazali seve 213-02, 213-03, 213-05 in 213-07_I, ki na podlagi genetske informacije v odseku gena ORF5 pripadajo isti monofiletski skupini (Slika 4-42). Medtem ko smo iz vzorcev semena iz leta 2003 in 2005 (Tabela 4-12) uspeli izolirati virus EAV, je bilo prizadevanje za pridobitev izolatov iz vzorcev semena odvzetih leta 2002 in 2004 popolnoma neuspešno (Tabela 4-12). Verjetno je vpliv zamenjav v aminokislinskih zaporedjih GP₅ med omenjenimi sevi na to (Slika 4-41), da si pozitiven in negativen rezultat izmenoma sledita iz leta v leto (Tabela 4-12), zanemarljiv. Poleg tega ostaja sekundarna struktura GP₅ kljub štirim aminokislinskim zamenjavam med sevoma 213-02 in 213-07_I ohranjena (Slika 4-46). Heterodimerizacija med proteinoma GP₅ in M je preko cisteinskih ostankov povezana z infektivnostjo virusa EAV (Snijder in sod., 2003), zato bi veljalo preveriti, ali med aminokislinskimi zaporedji membranskega proteina M rastočih in ne rastočih sevov obstaja kakšno neskladje.

S serološko analizo vzorcev semena smo želeli preveriti še možnost, da bi nevtralizacijska protitelesa, ki se nahajajo v semenu, ovirala ali celo preprečila razmnoževanje virusa EAV v celični kulturi. O nasprotnem nas prepričata vzorca semena kraškega PI 068 in slovenskega kasača CV, iz katerih smo kljub nevtralizacijskim protitelesom (Tabeli 4-12 in 4-13) uspeli pridobiti izolata 068-05 in CV-05. To je dokaz, ki je ovrgel našo domnevo, da bi lahko nevtralizacijska protitelesa vplivala na izolacijo virusa v celični kulturi.

Vzrok za negativne rezultate pri nekaterih kraških sevih ni v njihovi necitopatogeni naravi, kot smo sicer sprva domnevali, temveč je bolj verjetno, da je večkratno zamrzovanje in odmrzovanje (najmanj trikrat) istega vzorca semena uničilo infektivnost virusa.

Kljub temu da smo dokazali, da so kraški sevi virusa EAV iz reje A s svojevrstnim genotipom posebnost ne samo v slovenskem, ampak tudi v svetovnem merilu, lahko zaključimo, da vzroka za neuspele izolacije ne moremo pripisati niti njihovi genetski osnovi niti nevtralizacijskim protitelesom.

Leta 2006 smo v okviru programa eradikacije KAK v reji A med 35 testiranimi serološko pozitivnimi žrebci ugotovili 10 PI. Iz dvajsetih vzorcev semena (prvi in drugi odvzem), ki so bili pozitivni z vsaj eno od molekularnih metod, nismo v celični kulturi RK-13 z običajnim vzdrževalnim gojiščem uspeli izolirati nobenega seva virusa EAV (Slika 4-50). Osem vzorcev semena PI 150, 260, 388 in 282 smo zato poslali v akreditiran laboratorij Dr. Böse GmbH (Harsum, Nemčija), v katerem so z vzdrževalnim gojiščem, ki je vsebovalo karboksimetilcelulozo (CMC), uspeli izolirati virus EAV iz vseh vzorcev (Priloga A).

Tudi v drugih diagnostičnih laboratorijih uporabljajo gojišče »oplemeniteno« s CMC, v katerem uspešno izolirajo virus EAV (Balasuriya in sod., 1998; Echeverria in sod., 2007; Horner, 2004), čeprav mehanizem delovanja CMC-ja še ni pojasnjen (Timoney osebno).

Pri nadaljnjih poskusih izolacije virusa EAV iz semena smo se zato oprli na priporočila iz Diagnostičnega priročnika OIE (2004, peta izdaja, poglavje 2.5.10. (1) (a)). V skladu s predpisanimi navodili smo izolacijo virusa v celični kulturi RK-13 izvajali v ploščah s šestimi jamicami ali steklenicah za celično kulturo T-25. Za gojišče pa smo uporabili vzdrževalno gojišče z 0,75 % CMC.

Kot je razvidno iz slik 4-51 in 4-52 je bilo gojišče s CMC bistveno za uspešno razmnoževanje kraških izolatov virusa EAV iz reje A. Virusne nukleokapsidne antigene smo dokazali s

specifičnimi monoklonskimi protitelesi v indirektnem imunoperoksidaznem testu (Slike 4-51 in 4-52). V prvi pasaži smo rast kraških sevov potrdili tudi z molekularnima metodama RT-PCR (Slika 4-54) in RT-PCR v realnem času (Slika 4-55).

Podobno kot pri kraških izolatih 150-06, 260-06, 282-06 in 388-06 (Slike 4-51 in 4-52) smo tudi pri izolatu BG-07 (Slika 4-53) iz semena švedskega kasača BG, ki smo ga umestili v genetsko skupino EAV-1, zasledili enak kronološki potek razvoja citopatskih sprememb. Pri vseh omenjenih izolatih je bil tudi izgled citopatskega efekta morfološko enak kot pri drugih raziskavah (Balasuriya in sod., 1998; Echeverria in sod., 2007). Presenetljivo pa se je izolat BG-07 v prvi pasaži hitreje razmnoževal, saj smo prve citopatske spremembe opazili že tretji dan po inokulaciji, pri kraških izolatih pa približno dva dni kasneje. Manjša sposobnost prilagoditve kraških sevov virusa EAV na rast pri pogojih *in vitro* je nakazovala na možnost, da genetska osnova vpliva na njihovo razmnoževanje v celični kulturi.

Naše izkušnje so pokazale, da so poleg gojišča s CMC, aktivno deleče se (od 3 do 5 dni stara celična kultura) celice RK-13 (ATCC CCL-37, ki niso okužene z virusom BVD, Weybridge), manjše število pasaż celic (do 30) in dovolj velik inokulum glede na gojitveno površino nujni pogoj za uspešno izolacijo virusa EAV iz semena.

Iz ameriškega referenčnega laboratorija za KAK »National Veterinary Services Laboratories« poročajo o popolnoma drugačnih izkušnjah. Po njihovih izkušnjah je za uspešno izolacijo virusa EAV iz semena pomembna pozna pasaża (395) celic RK-13Ky, ki so okužene z virusom BVD (Timoney in sod., 2004).

Moore in sod. (2002 in 2003) so ugotovili, da se različno patogeni sevi virusa EAV razlikujejo med seboj v velikosti plakov, ki nastanejo zaradi nekroze in apoptoze med razmnoževanjem virusa v primarni celični kulturi konjskih endotelnih celic EEC. V splošnem velja, da virulentni sevi virusa EAV povzročajo bolj obsežne poškodbe celičnega sloja (večji premer plakov) kot manj virulentni. Čeprav isti avtorji med različno patogenimi izolati virusa EAV, ki so jih gojili v celični kulturi RK-13, niso opazili večjih razlik v velikosti plakov, pa je bila razlika v premeru plakov med kraškimi izolati in referenčnim sevom Bucyrus, ki smo jih razmnožili v celični kulturi RK-13 po našem postopku izolacije, očitna (Slika 4-56). Postopka sta bila popolnoma enaka, le da smo namesto vzdrževalnega gojišča z 0,75 % CMC uporabili gojišče z 1-odstotno raztopino agaroze, ki se je v drugih študijah (Projekt SE0750 »Equine viral arteritis: virulence and immunity«, ki ga je finančno podprla britanska vladna

organizacija DEFRA, angl. »Department for Environment, Food and Rural Affairs«) izkazalo bolj uporabno kot gojišče s CMC, saj omogoča boljšo ločitev plakov, kar olajša njihovo štetje. Slovenska izolata sta povzročila približno štirikrat manjše poškodbe celičnega sloja kot referenčni virus Bucyrus (ATCC VR-796), kar potrjuje, da je manjši obseg citolize (premer plaka je bil 0,72 mm) povezan z manj virulentno naravo kraških izolatov. To povezanost so ugotovili tudi Moore in sod. (2002). Rezultati njihove raziskave kažejo, da avirulentni sev CA95, ki so ga leta 1995 izolirali iz semena perzistentno okuženega kasača iz Kalifornije, ni tako litičen (premer plakov je bil 1,16 mm) kot velogeni sev ATCC (ATCC VR-796), ki so ga s serijskimi pasażami na konjih pridobili iz originalnega virusa Bucyrus. Med omenjenima izolatoma so ugotovili približno trikratno razliko v premeru plakov.

Iz naših rezultatov lahko povzamemo, da se je celična kultura RK-13 v naših pogojih vseeno izkazala kot dober indikator napovedi patogenosti virusa EAV *in vitro*. Kljub temu pa bi v prihodnje veljalo izvesti izolacijo kraških sevov virusa EAV tudi v celični kulturi EEC, kajti le v tem primeru bi lahko bili rezultati obeh raziskav primerljivi.

Primerjava kinetike rasti v celični kulturi RK-13 z običajnim vzdrževalnim gojiščem je jasno pokazala, da med referenčnim virusom Bucyrus in kraškim izolatom 087-02 obstaja tako časovna razlika v razmnoževanju kot v obsegu poškodb celičnega sloja, ki smo jih ugotavljali z indirektnim imunoperoksidaznim testom (Slika 4-57). Iz rastne krivulje (Slika 4-57 A) je razvidno, da se je referenčni virus Bucyrus razmnoževal še enkrat hitreje kot izolat 087-02. Končni titer, ki je dosegel plato šele peti dan inkubacije, je bil približno 1000-krat manjši od titra referenčnega seva Bucyrus ($10^{7,4}$ TCID₅₀/ml).

Če primerjamo obseg vidnih citopatskih sprememb in delež okuženih celic RK-13 (Slika 4-57 B), vidimo, da je razmnoževanje izolata 087-02, ki se kaže v obliki združevanja okuženih celic v skupke, omejeno, medtem ko je rast seva Bucyrus zelo invazivna. Med področji s celicami, v katerih poteka intenzivna sinteza virusnega nukleoproteina, so vidna področja brez celic, ki se z napredovanjem litičnega razmnoževanja še povečujejo vse do petega dne po inokulaciji, ko je celični sloj že skoraj povsem uničen. Razen nabrekanja celic RK-13, med razmnoževanjem kraškega izolata 087-02, v celični kulturi nismo zaznali nobenih litičnih poškodb, ki lahko nastanejo zaradi smrti celic. Tudi pri izolaciji drugih kraških sevov virusa EAV (Slike 4-51 in 4-52) so bile citopatske spremembe v nativnih mikroskopskih preparatih bolj podobne morfološkim spremembam, ki nastanejo zaradi staranja celic (Slika 4-58). O

podobnih izkušnjah so poročali tudi strokovnjaki iz drugih laboratorijev, ki opisujejo, da so skupki starih celic RK-13 podobni žariščem citopatskega efekta (Horner, 2004).

S spremljanjem živosti celic RK-13 smo vrednotili vpliv virusa EAV na preživelost celic. Iz slike 4-57 C je razvidno, da je število živih celic med razmnoževanjem referenčnega seva Bucyrus zaradi nekroze drastično upadlo med 48 in 60 urami po inokulaciji, ko je virus dosegel svoj največji titer. Posledice razmnoževanja kraškega izolata 087-02 so bile za celice RK-13 komaj zaznavne. Živost celic RK-13, v katerih se je razmnoževal izolat 087-02, se v primerjavi s kontrolnimi celicami RK-13 ni bistveno spremenila. Potrebne so nadaljnje študije, ki bi lahko pojasnile, ali je slaba citolitična aktivnost izolata 087-02 povezana z njegovim manj virulentnim fenotipom in ali bi večje število zaporednih pasaž doprineslo k bolj izraženemu litičnemu razmnoževanju.

Ne glede na manj virulenten fenotip kraških izolatov virusa EAV, ki smo ga potrdili v pogojih *in vitro*, smo v primeru izolata iz mod kastrata 282 iz reje A (Sliki 4-59 in 4-60) dokazali, da imajo lahko kraški sevi *in vivo* tudi patološki značaj. Histološki pregled moda nam je razkril perivaskularne infiltrate iz limfocitov (Slika 4-61), ki so patognomonični za KAK (Holyoak in sod., 1993b).

Navedeni primer nazorno kaže, da je kastracija, edini učinkovit način, s katerim lahko pri perzistentnih izločevalcih preprečimo nadaljnje izločanje virusa EAV (Sliki 4-59 in 4-60) (Little in sod., 1992).

Kastracija je radikalen poseg, zaradi katerega lahko posamezen rejec ali vzrejni center, ki v svojih rejskih ciljih stremi k ohranjanju zadostnega števila plemenjakov posameznih žrebčevskih linij, utрпи veliko finančno izgubo. V vzrejnem centru redijo večje število živali, zato obstaja večje tveganje za okužbo z virusom EAV, saj prenos virusa težje omejimo. Prenos virusa olajšujejo tesni stiki z akutno okuženo živaljo in spolni stiki s perzistentnimi izločevalci.

KAK ima za vzrejo konj in druge športne panoge velike ekonomske izgube (Holyoak in sod., 2008), zato temelji preventivna dejavnost za preprečevanje KAK predvsem na cepljenju (Timoney in McCollum, 1988).

V okviru programa preprečevanja in izkoreninjenja KAK so v reji A leta 2006 začeli izvajati cepljenje z živim atenuiranim cepivom ARVAC[®], ki je varno in učinkovito za žrebce, nebreje

kobile in žrebeta. Po odstavitvi so serološko negativne žrebčke preselili iz skupnega hleva v reji A v žrebetišče Ravne, kjer so jih po navodilih proizvajalca cepili pri starosti šest mesecev (Tabela 4-14).

Uspešnost cepljenja pri žrebčkih smo spremljali z določevanjem protiteles proti referenčnemu virusu Bucyrus. Rezultati serološkega testiranja kažejo (Slika 4-62), da je cepivo uspešno spodbudilo tvorbo protiteles (razredov IgM in IgG), ki naj bi po zagotovilih proizvajalca ščitila konje pred klinično boleznijo (McCollum, 1969; McCollum, 1986) več let. Ne samo, da se z rednim ponovnim cepljenjem vsako leto doseže dosmrtna zaščita, temveč se tudi prepreči pojav perzistentnega izločanja pri žrebcih (Balasuriya in sod., 2004b).

Proti izolatu 087-02 v serumskih vzorcih cepljenih žrebčkov zaščitnih titrov protiteles nismo ugotovili (Slika 4-62), zato menimo, da bi lahko pri tistih žrebčkih, ki bi bili po prvem cepljenju preko spolnega stika ali z aerosolom izpostavljeni okužbi z divjim virusom EAV, prišlo do kratkotrajne okužbe spolnega trakta in prehodnega (do deset dni) izločanja virusa (McCollum in sod., 1988).

Učinkovitost cepljenja bo opazna v prihodnjih letih, ko bomo na virus EAV testirali vzorce semena tistih mladih žrebcev, ki so se jeseni leta 2009 vrnili iz žrebetišča Ravne v rejo A in bodo morda pri petih letih odbrani za plemenjake.

V primeru, da bomo v semenu odbranih plemenjakov dokazali kraški sev virusa EAV ali da bomo med cepljenimi plemenskimi žrebci odkrili celo perzistentne izločevalce, verjamemo, da bo pot do izkoreninjenja KAK iz reje A dolga. Z namenom, da se pred naravno okužbo z divjim virusom zaščiti tiste elitne plemenjake lipicanskih linij, ki so pomembni za zagotavljanje zadostne genetske pestrosti, bi na podlagi infrastrukturne danosti v reji A veljalo razmisliti o namestitvi cepljenih žrebcev v popolnoma ločene objekte.

5.2 SKLEPI

- ~ Rezultati seroloških preiskav so potrdili, da so v Sloveniji z virusom EAV okuženi tako konji različnih pasem iz zasebnih rej kot lipicanci iz reje A.
- ~ Več kot polovica lipicancev (55 %) iz reje A je bila vsaj enkrat v stiku z virusom EAV. Visoka stopnja seroprevalence kaže, da med konji v reji A virus EAV neprestano kroži.
- ~ Manjšo prekuženost smo ugotovili pri konjih iz zasebnih rej (26 %). Protitelesa proti virusu EAV smo največkrat dokazali pri uvoženih kobilah pasme kasač.
- ~ Večina žrebčkov v reji A se prvič sreča z virusom EAV po dopolnjenem prvem letu. Najverjetneje se z virusom EAV okužijo ob tesnih stikih z aerosoli izločkov okuženih starejših žrebcev ali posredno s kontaminirano opremo ter pripomočki za nego. Kobile se z virusom EAV srečajo pozneje, navadno v starosti pet let. Čas primarne okužbe je pri kobilah vezan na spolni stik s perzistentnim izločevalcem.
- ~ Med konji v reji A seroprevalenca narašča s starostjo in se po sedmem letu starosti med spoloma ne razlikuje. Kar 73 % žrebcev in 75 % kobil starih več kot sedem let ima protitelesa proti virusu EAV.
- ~ Molekularne metode, ki smo jih uvedli v naš laboratorij, so služile predvsem kot presejalne metode za odkrivaje izločevalcev virusa EAV s semenom. V vzorcih semena serološko pozitivnih žrebcev iz zasebnih rej smo navzočnost virusnega genoma največkrat dokazali pri kasačih. V reji A smo leta 2006 potrdili trajno izločanje virusa EAV s semenom pri 28 % plemenskih žrebcev. Ob tem velja pripomniti, da je realno število perzistentnih izločevalcev še večje, saj smo seme štirinajstih domnevnih izločevalcev vključili v molekularno testiranje le enkrat tekom celotne raziskave.
- ~ Rezultati sekvenčnih analiz potrjujejo, da je odsek v genu za nukleokapsido (ORF7) bolj ohranjen kot odsek v genu za polimerazo (ORF1b) in je zato primernejša tarča za diagnostiko KAK z molekularnimi metodami. Izkazalo se je, da so si nukleotidna zaporedja virusov EAV iz reje A v tem delu genoma med seboj od 98,3 do 100-odstotno identična.
- ~ Za dokazovanje virusov EAV smo razvili novo metodo RT-PCR v realnem času. Sondo MGB EAVMGBpr smo oblikovali tako, da se lahko teoretično specifično veže na vsa

znana zaporedja ORF7, ki so bila na dan izvedbe analize *in silico* dostopna v genski banki GenBank. Izjema je poljski izolat PLN02/3 (EF 102420.1), ki se na mestu prileganja sonde EAVMGBpr (na njenem 5' koncu) razlikuje za en nukleotid.

~ V vseh 40 vzorcih semena, ki smo jih analizirali z metodo RT-PCR v realnem času, smo uspešno in ponovljivo dokazali nukleinsko kislino virusov EAV.

~ Metoda RT-PCR v realnem času je 100-krat bolj občutljiva, kot je detekcija produktov RT-PCR z običajno elektroforezo v agaroznem gelu. V občutljivosti prekaša tudi metodo »semi-nested« PCR, ki ima 10-krat manjšo analitično občutljivost.

Občutljivost nove metode smo potrdili tudi pri dveh vzorcih semena (410/99-4 in 410/99-7), v katerih je bila količina virusa EAV tako majhna, da smo ga zaznali šele po dodatnem pomnoževanju obeh tarčnih regij (ORF1b in ORF7) s »semi-nested« PCR.

~ Hibridizacijska metoda RT-PCR-ELISA ni pokazala pričakovane občutljivosti. Dodaten korak čiščenja produktov RT-PCR iz agaroznega gela, ki je bil ključnega pomena, da smo z encimsko imunsko metodo dosegli enako občutljivost kot s klasično metodo RT-PCR, je postopek podaljšal in ga tudi podražil.

~ Pri perzistentnih in domnevnih izločevalcih smo z molekularnimi metodami dokazali virus EAV v vzorcih brisov sečnice. Po naših podatkih se tovrstnega načina diagnosticiranja KAK do zdaj ni lotil še nihče. Identiteto virusov smo potrdili z analizo nukleotidnih zaporedij ORF7.

~ Izolacija virusne nukleinske kisline s komercialnim kompletom MagMax™ Viral RNA Isolation Kit in pomnoževanje odseka v ORF7 z metodo RT-PCR v realnem času sta se izkazala kot najprimernejša za molekularno dokazovanje virusa EAV v brisih sečnice.

~ Pri enem perzistentnem izločevalcu (PI 085) in dveh domnevnih izločevalcih (261 in 289), katerih seme je bilo pozitivno na virus EAV, so bili rezultati pomnoževanja virusnega genoma iz brisov sečnic negativni. Zaključimo lahko, da bris sečnice ni ustrezna kužnina za dokaz PI.

~ Polni ejakulat je za določanje PI pri serološko pozitivnih žrebcih najprimernejši tip vzorca.

Kljub temu bi bilo v prihodnje smiselno raziskati, ali so za omenjene negativne rezultate krivi inhibitorji v brisih sečnice.

- ~ Genetska struktura virusov EAV pri žrebcih v Sloveniji še ni bila nikoli raziskana. Virusom EAV, ki smo jih dokazali v semenu žrebcev registriranih v Sloveniji, smo prvič določili nukleotidno zaporedje variabilnega gena ORF5 za poglavitni glikoprotein GP₅.
- ~ Na podlagi filogenetske analize ORF5 smo viruse EAV iz vzorcev semena žrebcev iz zasebnih rej razporedili v vse tri znane genetske skupine EAV-1, EAV-2 in EAV-3, ki z nekaterimi odstopanji ustrezajo geografskemu poreklu plemenjakov. V vzorcih semena finskega kasača SM smo zasledili seva SM-02 in SM-03, ki ju nismo uvrstili v nobeno od omenjenih genetskih skupin. Sevi iz skupine neuvrščenih izolatov so bili opisani tudi na Madžarskem, v ZDA in Južnoafriški republiki.
Izjemna genetska raznolikost med sevi virusa EAV, ki krožijo med konji v slovenskem prostoru, kaže, da je trgovanje s konji v Sloveniji živahno in sega tudi izven meja EU.
- ~ Gen za polimerazo ORF1b se je izkazal kot uporaben za preučevanje filogenetskih odnosov med različnimi virusi EAV. Hkrati je prikazal, da kraški sevi iz reje A predstavljajo genetsko posebnost v slovenskem in svetovnem merilu.
- ~ Filogenetska analiza na osnovi nukleotidnih zaporedij ORF5 je dokončno prikazala sorodstvene odnose med različnimi genotipi.
V vzorcih semena žrebcev iz reje A smo odkrili nov genotip virusa EAV, ki po do zdaj znanih podatkih iz literature še ni bil objavljen.
- ~ Filogenetski odnosi med sevi virusa EAV v reji A, ugotovljeni na podlagi ORF1b in ORF5, so statistično zelo dobro podprti.
- ~ Gen ORF5 se je izkazal tudi kot zanesljiv forenzični marker, s pomočjo katerega smo ugotovili, da so se mlajše živali najverjetneje okužile od starejših kroničnih nosilcev virusa EAV. Ugotovitev smo potrdili tudi z rezultati seroloških preiskav.
Filogenetska analiza na podlagi gena ORF5 se je izkazala uporabna tudi v primeru, ko smo na nivoju posameznega hleva ugotavljali povezavo med lokacijo žrebca in možnim izvorom okužbe.
- ~ Evolucija gena ORF5 je pri virusih iz reje A hitra in neenakomerna. Z metodo sproščene molekulske ure smo ocenili, da znaša povprečna hitrost evolucije kraških sevov $3,41 \times 10^{-3}$ zamenjav/na nukleotidno mesto/leto. Razvoj virusov EAV iz reje A ne poteka samo linearno, temveč tudi preko kvazivrste.
- ~ Osrednji mehanizem molekulske evolucije ORF5 pri večini kraških sevov iz zaporednih vzorcev semena istega PI je negativna, prečiščujoča selekcija, ki deluje v smislu

odstranjevanja neugodnih mutacij. To kaže, da je GP₅ občutljiv za strukturne spremembe, saj vemo, da skupaj s proteinom M tvori heterodimerni kompleks, ki je ključen za infektivnost virusa.

- ~ Kljub temu da so glede na celotno dolžino gena ORF5 sinonimne nukleotidne zamenjave bolj pogoste od nesinonimnih, se kraški sevi virusa EAV ponašajo s svojevrstnim aminokislinskim zaporedjem pglavitnega glikoproteina GP₅. Izstopajo predvsem po tistih nesinonimnih nukleotidnih zamenjavah v področju nevtralizacijskih epitopov C in D, ki so privedle do strukturnih sprememb površinskih antigenov.
- ~ V reji A še niso poročali o primerih s klinično obliko KAK. Perzistentne izločevalce smo odkrili šele takrat, ko smo v semenu žrebcev dokazali virusno nukleinsko kislino.
- ~ Molekularne metode, ki smo jih za odkrivanje PI vpeljali v naš laboratorij, nam omogočajo pregledovanje večjega števila vzorcev hkrati, izvedba diagnostičnih postopkov je hitra, metode so cenovno ugodne, specifične in občutljive. Čeprav zaradi naštetih lastnosti prednjačijo pred klasično metodo izolacije virusa v celični kulturi, pa je njihova velika pomanjkljivost v tem, da so omejene le na dokaz nukleinske kisline in ne na dokaz »živega« virusa.
- ~ Vseeno je treba med molekularnimi metodami izpostaviti metodo RT-PCR v realnem času, ki je izkazala veliko praktično uporabnost. Njena prednost v primerjavi z drugimi tradicionalnimi molekularnimi metodami je v tem, da omogoča natančno kvantifikacijo nukleinskih kislin. Prav zato smo jo uporabljali kot dopolnilno metodo za potrjevanje uspešnega razmnoževanja virusa EAV v celični kulturi.
- ~ Izolacijo virusov EAV v celični kulturi RK-13 smo izboljšali z dodatkom CMC v vzdrževalno gojišče. Tako smo preprečili lažno negativne rezultate, ki smo jih sprva pripisovali svojevrstni genetski osnovi kraških sevov EAV in nevtralizacijskim protitelesom v semenu.
- ~ Dokazali smo, da za uspešno razmnoževanje virusa EAV v celični kulturi ne potrebujemo samo celične kulture RK-13, ki ni okužena z virusom BVD, je redno tripsinizirana vsak tretji ali peti dan in njeno subkultiviranje ne preseže tridesete pasaže, temveč tudi dovolj velik inokulum vzorca semena.
- ~ Izolati iz reje A so citopatogeni. Okroglaste celice s poudarjeno celično membrano, ki se združujejo v grozdaste skupke, je za kraške izolate virusa EAV tipičen morfološki videz citopatskega efekta, ki smo ga največkrat zasledili v prvi pasaži.

- ~ Iz primerjave rasti med referenčnim virusom Bucyrus in kraškimi izolati virusa EAV smo izluščili naslednje: kraški izolati niso tako litični kot referenčni virus, kar se v celični kulturi RK-13 z gojiščem, ki vsebuje agarozo, kaže z manjšim premerom plakov; njihovo razmnoževanje je počasnejše in omejeno in delež okuženih celic je manjši. Naštete biološke značilnosti, ki jih kraški izolati virusa EAV izkazujejo pri pogojih *in vitro*, še dodatno utrjujejo spoznanje, da so virusi EAV iz reje A manj virulentni.

- ~ Z nevtralizacijskim testom, ki smo ga izvedli z referenčnim virusom Bucyrus, smo pri cepljenih žrebčkih ugotovili zaščitne titre protiteles, kar pomeni, da naj bi po zagotovilih proizvajalca aktivno imunizirani žrebčki bili zaščiteni pred klinično zaznavnim KAK. Vakcina ARVAC[®] ni vzpodbudila tvorbe nevtralizacijskih protiteles proti kraškemu izolatu 087-02 iz reje A, zato pri mladih lipicancih ni izključena možnost okužbe z lokalnim tipom virusa EAV.

6. POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Virus EAV, ki povzroča kužni arteritis kopitarjev (KAK), je razširjen med kopitarji po vsem svetu. Virus EAV se med konji prenaša s kužnim aerosolom in spolnimi stiki. Rezervoar virusa EAV je kronično okuženi žrebec. Približno 30 do 60 % serološko pozitivnih žrebcev lahko celo življenje izloča virus s semenom. Spolni odnos je poglavitni način prenosa virusa EAV iz perzistentno okuženega žrebca na kobilo (Balasuriya in MacLachlan, 2004b).

Zaradi velike gospodarske škode, ki bi lahko nastala zaradi abortusov in ovir pri mednarodnem prometu s perzistentnimi izločevalci (PI), pridobiva KAK vedno večji pomen.

Postavitev diagnoze KAK pri PI je težka predvsem zato, ker v večini primerov okuženi žrebci ne kažejo nobenih kliničnih znakov bolezni. Nevtralizacijska protitelesa proti virusu EAV so največkrat prvi in edini znak okužbe z virusom EAV, zato se diagnostični postopek odkrivanja PI začne s testiranjem seruma z eno od uveljavljenih seroloških metod. Čeprav se za določanje specifičnih protiteles proti virusu EAV v vzorcu seruma uporabljajo različni encimsko imunski testi ELISA (Çhirnside in sod., 1995b; Wagner in sod., 2003), nevtralizacijski test (NT) velja za »zlati standard« (Holyoak in sod., 2008) med serološkimi metodami.

V prvem delu naloge smo ugotavljali prekuženost z virusom EAV pri konjih različnih pasem v Sloveniji v obdobju od leta 2002 do leta 2007. V tem obdobju smo z NT pregledali 2898 serumskih vzorcev konjev različnih pasem iz zasebnih rej in 1170 serumov konj lipicanske pasme iz reje na slovenskem Krasu (reja A).

Pri konjih iz zasebnih rej je bila okuženost z virusom EAV največja leta 2003 (26 %). Nevtralizacijska protitelesa proti virusu EAV smo najpogosteje dokazali pri žrebcih in kobilah pasme kasač.

Precej več okuženih z virusom EAV smo ugotovili pri lipicancih iz reje A. V letu 2006 smo na prisotnost protiteles testirali vzorce serumov iz cele črede. Z virusom EAV je bila okužena več kot polovica konj (55 %). Žrebci so se prvič okužili po dopolnjenem prvem letu, kobile pa pri starosti pet let. Število okuženih konj v reji A s starostjo narašča, ne glede na spol, kar pomeni, da virus EAV stalno kroži med konji. Prevladujoči način prenosa virusa EAV med

žrebci je bil s kužnim aerosolom, medtem ko so se kobile v glavnem okužile pri spolnih stikih s PI.

Virus EAV iz vzorca semena dokazujemo s klasičnim virološkim postopkom, ki vključuje izolacijo virusa v celični kulturi RK-13 in določanje virusnih antigenov. Kljub temu, da izolacija virusa EAV v diagnostiki KAK velja za »zlati standard« (Lu in sod., 2008), prihajajo vedno bolj v ospredje sodobne molekularne metode kot so klasični RT-PCR, »nested« PCR, in RT-PCR v realnem času, s katerimi lahko v kliničnih vzorcih hitro in specifično potrdimo prisotnost virusne nukleinske kisline (Balasuriya in sod., 2002b; Chirnside in Spaan, 1990; Gilbert in sod., 1997; Lu in sod., 2008; Mankoč in sod., 2007; Ramina in sod., 1999; Sekiguchi in sod., 1995; St-Laurent in sod., 1994; Westcott in sod., 2003).

V drugem delu naloge smo primerjali občutljivost molekularnih metod, ki smo jih za dokazovanje virusa EAV vpeljali v našem laboratoriju. V vzorcih semena, ki smo jih pridobili od slovenskih seropozitivnih žrebcev smo z metodami RT-PCR, »semi-nested« PCR in RT-PCR-ELISA določevali dva različna odseka virusnega genoma (gen za polimerazo ORF1b in gen za nukleokapsido ORF7).

Pri pomnoževanju odseka v ORF1b smo s parom začetnih oligonukletidov EAV11/EAV12 dobili večje število pozitivnih rezultatov kot s parom EAV7/EAV8. Nukleinsko kislino virusa EAV smo dokazali v 38/40 (95 %) vzorcih semena. Enako število produktov RT-PCR smo določili tudi v primeru, ko smo za pomnoževanje odseka v ORF7 uporabljali par začetnih oligonukleotidov EAV7.53F/12664N. Genoma virusa EAV nismo dokazali v dveh vzorcih semena (410/99-4 in 410/99-7), v katerih je bila količina virusne RNA tako majhna, da smo jo uspešno dokazali šele po dodatnem pomnoževanju z metodo »semi-nested« PCR.

Da bi povečali občutljivost in specifičnost RT-PCR, smo vzorce semena testirali še z metodo RT-PCR-ELISA. Pri tem smo uporabili sondo EAVpr, ki je komplementarna odseku v ORF1b in sondo EAV7.92P, ki je komplementarna odseku v ORF7. Ugotovili smo, da detergenti v reakcijski mešanici za RT-PCR preprečujejo vezavo DNA na mikrotitersko ploščico oz. vezavo komplementarne sonde in tarčne DNA. Produkta RT-PCR smo zato očistili iz agaroznega gela in pri ponovnem testiranju prečiščenih produktov RT-PCR v vseh primerih dobili pozitiven rezultat.

Za izboljšanje diagnostike KAK smo razvili metodo RT-PCR v realnem času, ki nam omogoča hitro in specifično določanje genetsko pestrih različic virusa EAV.

Prvič smo v primerjalno analizo nukleotidnih zaporedij ORF1b in ORF7 vključili tudi slovenske seve virusa EAV. Primerjava je pokazala, da so zaporedja sevov virusa EAV na odseku ORF7 manj raznolika kot zaporedja ORF1b, zato smo začetne oligonukleotide in sonde MGB načrtovali na odseku gena za nukleokapsido (ORF7). Z uporabo specifične sonde EAVMGBpr, označene s triciklično organsko molekulo MGB (Mankoč in sod., 2007), skupaj z začetnima oligonukleotidoma EAV-F (Balasuriya in sod., 2002b) in EAV-R (Mankoč in sod., 2007) smo uspešno pomnožili del virusnega gena ORF7 pri vseh štiridesetih vzorcih semena.

Občutljivost molekularnih metod smo določali s pomnoževanjem razredčin celokupne RNA, ki smo jo izolirali iz inficirane celične kulture RK-13, v kateri se je razmnoževal referenčni sev Bucyrus. S pomnoževanjem odseka v ORF7 smo ugotovili, da je metoda RT-PCR v realnem času 100-krat bolj občutljiva kot je detekcija produktov RT-PCR in 10-krat bolj kot je detekcija produktov »semi-nested« PCR z elektroforezo v agaroznem gelu. Metoda RT-PCR v realnem času je po občutljivosti presegla tudi encimsko imunski test RT-PCR-ELISA, s katerim smo dosegli tolikšno občutljivost kot z običajno metodo RT-PCR, seveda šele potem, ko smo s čiščenjem odstranili detergente.

V tretjem delu naloge smo želeli raziskati možnost uporabe vpeljanih molekularnih metod za dokazovanje virusa EAV v brisu sečnice. Vzorec brisa sečnice bi lahko uporabljali kot kužnino v primerih ugotavljanja statusa PI, ko pri žrebcih odvzem semena ni mogoč. Poleg tega je za žrebca odvzem brisa sečnice enostaven in neboleč, za izvajalca pa preprostejši in varnejši kot jemanje semena z umetno vagino.

Znano je, da je koncentracija virusa EAV v brisih sečnice majhna (Neu in sod., 1988), zato smo se najprej posvetili iskanju najbolj primernega načina za izolacijo celokupne RNA. Med tremi metodami (opisane v točki 3.2.5.1), ki smo jih preizkusili tako na referenčnem sevu Bucyrus, kot tudi na kliničnih vzorcih (seme in brisi sečnice), se je najbolje izkazala izolacija nukleinskih kislin s komercialnim kompletom MagMax™ Viral RNA Isolation Kit. Virusno RNA, ki smo jo izolirali s paramagnetnimi delci, smo z metodo RT-PCR v realnem času določili v brisih sečnice skoraj pri vseh testiranih žrebcih. Izjemi sta bila žrebca 261 in 289, pri katerih, v brisih sečnice virusa EAV z molekularnimi metodami nismo zaznali. Poleg

premajhne količine virusov EAV, ki je lahko pod mejo določljivosti molekularnih metod, je možen razlog za negativen rezultat pomnoževanja virusne nukleinske kisline tudi v inhibitorjih reakcije RT-PCR, ki so pogosto prisotni v brisih sečnice. Seveda obstaja tudi možnost, da virusnih nukleinskih kislin v vzorcih brisov sečnice sploh ni bilo.

Ugotovili smo, da je v semenu PI lahko tudi do 7×10^6 več nukleinske kisline virusa EAV kot v brisih sečnice, zato se pridružujemo mnenju številnih raziskovalcev iz tujih diagnostičnih laboratorijev, da je za odkrivanje PI z molekularnimi metodami polni ejakulat najbolj primerna kužnina.

Slovenski sevi virusa EAV doslej še nikoli niso bili genetsko tipizirani. S filogenetsko analizo močno variabilnega zaporedja ORF5, ki nosi zapis za virusni poglavitni glikoprotein GP₅, smo ugotavljali sorodstvene odnose med slovenskimi sevi in sevi iz različnih območij Evrope ter drugih celin. V analizo smo vključili 58 nukleotidnih zaporedij lastnih sevov virusa EAV in 98 zaporedij iz genske banke GenBank.

Filogenetske analize so pokazale, da se sevi virusa EAV iz semena žrebcev različnih pasem iz Slovenije uvrščajo med vse tri znane genetske skupine EAV-1, EAV-2 in EAV-3, ki jih je s sodelavci objavil Mittelholzer (2006).

Viruse EAV iz vzorcev semena žrebcev pasme kasač smo v večini primerov uvrstili v genetski skupini EAV-1 in EAV-3, ki v glavnem zajemata evropske seve. V slednji smo razvrstili tudi seva, ki smo ju dokazali v vzorcih semena bavarskega in nizozemskega toplokrvnega konja RA_BT in ID_NT.

Po pričakovanjih smo v vzorcih semena plemenjakov pasme ameriški kasač (SL_AK in PP_AK) odkrili ameriški tip virusa EAV. Seve PP, SL-02 in SL-03 smo umestili v genetsko skupino EAV-2, med viruse iz severnoameriške celine.

Seva SM-02 in SM-03 iz semena finskega kasača sta sorodstveno povezana s sevi iz skupine, ki združuje neuvrščene izolate.

Naše filogenetske analize so seve iz reje kraških lipicancev (reja A) prepoznale kot povsem novo skupino virusov EAV, ki v dosedanjih filogenetskih študijah še niso bili opisani.

Znotraj samostojne monofiletske skupine, ki je statistično zelo dobro podprta na vseh treh filogenetskih drevesih (NJ – 999, BI – 0,99 in ML – 999), se sevi iz reje A razporejajo v tri ločene klade. V dveh kladah so bazalno odcepljeni sevi, ki smo jih določili pri dveh starejših žrebcih (926, letnik 1986 in 987, letnik 1988). Položaj sevov, ki smo jih določili pri žrebcih,

ki so mlajši od žrebcev 926 in 987, kaže na to, da so se mlajše živali najverjetneje okužile od starejših. Seva virusa EAV iz semena dveh najstarejših žrebcev iz reje A (795, letnik 1981 in 840, letnik 1983) tvorita klad, ki je na drevesih BI in ML statistično dobro podprt.

Visoko polimorfen ORF5, ki kodira GP₅, se je izkazal tudi kot uporaben marker, s katerim smo uspeli izslediti nekatere poti širjenja virusa EAV med posameznimi žrebci iz različnih hlevov v reji A. Znotraj te smo največ razlik ugotovili med paroma nukleotidnih zaporedji 168-06 in 987-01 ter 168-07 in 987-01. Omenjena para sta se na odseku 495 nukleotidov razlikovala kar za 78 nukleotidov (15,76 %). Nižjo stopnjo polimorfizma smo ugotovili med dominantnimi variantami virusov EAV iz vzorcev semena, ki so jih pri istem PI odvzeli v razmaku enega leta. Razlike med nukleotidnimi zaporedji ORF5 niso presegle 1,4 %. Visoka stopnja polimorfizma ORF5 nakazuje, da se virusi EAV pri žrebcih iz reje A zelo hitro spreminjajo. Hitra evolucija, ki pri sevih iz reje A znaša $3,41 \times 10^{-3}$ zamenjav/nukleotidno mesto/leto, ne poteka samo preko kopičenja enostavnih nukleotidnih zamenjav, temveč tudi preko kvazivrste. Pri določenih PI smo namreč odkrili, da v istem vzorcu semena soobstaja več različic virusa EAV.

Pri nekaterih sevih iz reje A so se nukleotidne zamenjave v genu ORF5 izrazile tudi na ravni njegovega produkta. S primerjalno analizo aminokislinskih zaporedij dela GP₅ smo v regiji V₁ (aa 61 – 121), kjer se nahajajo poglavitni nevtralizacijski epitopi A, B, C in D (Balasuriya in sod., 1997), našli aminokisline, po katerih se sevi iz reje A razlikujejo od vseh ostalih sevov v poravnavi. Čeprav so zamenjave aminokislin, ki smo jih ugotovili pri zaporedjih iz vzorcev semena, ki so bili istemu PI odvzeti s časovnim presledkom dveh let ali več, privedle do variacij površinskih antigenov, so ostali elementi sekundarne strukture GP₅ popolnoma ohranjeni. Pri večini PI so bile v genu ORF5 sinonimne nukleotidne zamenjave bolj pogoste od nesinonimnih, kar kaže, da evolucijo virusa EAV med perzistentno okužbo največkrat usmerja negativna selekcija. Očitno je za preživetje virusa EAV natančna gradnja glikoproteina GP₅, ki je v kompleksu s proteinom M ključen za infektivnost virusa EAV, pomembnejša od mimikrije površinskih antigenov.

Izolacija virusa EAV v celični kulturi RK-13 je osnovna metoda, s katero v semenu PI dokazujemo infektivni virus. Poleg diagnostičnega pomena, ima izolacija virusov EAV veliko vlogo pri prepoznavanju njihovih bioloških lastnosti.

Domneve o morebitnih vzrokih, ki smo jih za neuspešno pridobivanje izolatov iz semena pri žrebcih iz reje A sprva pripisovali nevtralizacijskim protitelesom in njihovi posebni genetski osnovi, so se kasneje, ko smo izolacijo v celični kulturi RK-13 izvajali z gojiščem s CMC, izkazale za neresnične. Naše izkušnje so pokazale, da so poleg gojišča s CMC, aktivno deleče se celice RK-13, ki niso okužene z virusom BVD, manjše število pasaž in dovolj velik inokulum glede na gojitveno površino, nujni pogoj za uspešno izolacijo virusa EAV iz semena. Poleg tega so se celice RK-13 v gojišču z 1 % agaroze, izkazale kot zelo uporabno orodje pri napovedovanju patogenosti virusa EAV *in vitro*. Slovenska izolata iz reje A sta povzročila štirikrat manjše plake kot referenčni virus Bucyrus, ki je patogen za konje. Pod svetlobnim mikroskopom je bilo razmnoževanje slovenskega seva 087-02 iz reje A mogoče prepoznati po bolj omejenem in neizrazitem CPE, brez litičnih poškodb. Sev 087-02 se je razmnoževal še enkrat počasneje kot referenčni sev Bucyrus. Prvi se je od slednjega razlikoval tudi po zanemarljivem vplivu na spremembo živosti celic RK-13. Vsa ta opažanja še dodatno utrjujejo naše spoznanje, da so slovenski izolati iz reje A manj virulentni.

Čeprav pri lipicancih iz reje A še nismo zabeležili uradno potrjenega primera KAK (klinični znaki in pozitivna serološka reakcija), je histopatološka preiskava mod kastrata 282 pokazala, da so virusi EAV iz omenjene reje sposobni izzvati spremembe v steni žil, ki so patognomonične za KAK.

V okviru programa preprečevanja in izkoreninjenja KAK so v reji A leta 2006 pričeli izvajati cepljenje z živim atenuiranim cepivom ARVAC[®]. Rezultati serološkega testiranja so pokazali, da so cepljeni žrebčki uspešno zaščiteni pred klinično boleznijo. Ali bodo žrebčke iz reje A ponovna cepljenja z ameriškim sevom zaščitila tudi pred trajno okužbo z lokalnim sevom virusa EAV, se bo izkazalo v prihodnje.

6.2 SUMMARY

The equine arteritis virus (EAV) causing equine viral arteritis (EVA) is found in equids worldwide. The EAV is transmitted among horses through infected aerosol and sexual contacts. The reservoir of the EAV is chronically infected stallion. Approximately 30 to 60 % of serologically positive stallions can shed the virus with their semen during all their lives. Sexual intercourse is the main way for transmitting the EAV from a persistently infected stallion to a mare (Balasuriya in MacLachlan, 2004b).

Due to a major economic damage which could result from abortuses and hindrances in the international traffic with persistent shedders (PS), EVA has been gaining on importance.

EVA is difficult to diagnose because the infected stallions in most cases do not display any clinical signs of disease. Neutralising antibodies to EAV are usually the first and only sign of infection with the EAV, consequently the diagnostic procedure for detecting a PS begins with testing the serum with one of the established serological methods. In order to detect specific antibodies to EAV, various ELISA enzyme-immune tests may be used (Chirnside et al., 1995b; Wagner et al., 2003); however, the neutralisation test (NT) is the »golden standard« (Holyoak et al., 2008) among serological methods.

In the first part of the thesis we established the seroprevalence with the EAV in horses of various breeds in Slovenia in the period from 2002 to 2007. In that period we examined 2898 serum samples belonging to horses of different breeds from private breeders and 1170 serums belonging to Lipizzan horses from the Slovenian Karst (stud farm A).

In horses from private breeders, the infection with the EAV was major in 2003 (26%). The neutralising antibodies against the EAV were most frequently proven in stallions and mares of the trotter breed.

Much more cases of EAV infections were established in Lipizzaners from stud farm A. In 2006, we tested serum samples from the whole herd against the presence of antibodies to EAV. The EAV was present in more than a half of the horses (55%). Stallions were infected for the first time after they had reached their first year and mares at the age of five. The number of infected horses within the stud farm A rises with age regardless their sex, which means that the EAV circulates constantly among horses. The prevalent manner of transmitting

the EAV among horses was exposure to infected aerosol, while mares were mainly infected during sexual contacts with PS.

The EAV from semen sample is detected by a standard virological procedure which includes virus isolation in the RK-13 cell culture and determining the virus antigens. Despite the fact that EAV isolation in EVA diagnostics represents the »golden standard« (Lu et al., 2008), contemporary molecular methods are gaining ground, such as classical RT-PCR, »nested« PCR, and real-time RT-PCR, by means of which viral nucleic acids in clinical samples can be quickly and specifically confirmed (Balasuriya et al., 2002b; Chirnside et Spaan, 1990; Gilbert et al., 1997; Lu et al., 2008; Mankoč et al., 2007; Ramina et al., 1999; Sekiguchi et al., 1995; St-Laurent et al., 1994; Westcott et al., 2003).

In the second part of the thesis, we compared the sensitivity of molecular methods which were introduced in our laboratory for detecting the EAV. In the semen samples taken from Slovenian seropositive stallions, the RT-PCR, »semi-nested« PCR and RT-PCR-ELISA methods were used to determine two different regions of the viral genome (ORF1b polymerase gene and ORF7 nucleocapsid gene).

In amplifying the ORF1b gene region, a higher number of positive results were obtained with a primer pair EAV11/EAV12 than with the EAV7/EAV8 pair. Nucleic acid of the EAV was detected in 38/40 (95%) semen samples. The same number of RT-PCR products was determined in the case where a primer pair EAV7.53F/12664N was used for amplifying the ORF7 gene region. The EAV genome was not detected in two semen samples (410/99-4 and 410/99-7) where the quantity of the viral RNA was so small that it was successfully proven only after additional amplification with the »semi-nested« PCR method.

In order to increase the sensitivity and specificity of RT-PCR, the semen samples were additionally tested with the RT-PCR-ELISA method. EAVpr probe was used, which is complementary to the sequence of the ORF1b gene region, and EAV7.92P probe, which is complementary to the sequence of the ORF7 gene region. It was established that detergents in the reagent mixture for RT-PCR prevent the binding of DNA to the microtiter plate or impairing the probe to bind to the target DNA. Consequently, the RT-PCR products were purified from agarose gel and in repeated testing of purified RT-PCR products, a positive result was obtained in all cases.

In order to improve the EVA diagnostics, real-time RT-PCR method was developed, which enables fast and specific determination of genetically varied EAV variants.

For the first time, ORF1b and ORF7 nucleotide sequences of Slovenian EAV strains were included in the comparative analysis. The comparison showed that at the ORF7 gene region the sequences of the EAV strains are less varied than at the ORF1b gene region, as a result the primers and the MGB probe were designed in the nucleocapsid gene region (ORF7). By using the specific EAVMGBpr probe with conjugated tricyclic organic molecule MGB (Mankoč et al., 2007) together with the primers EAV-F (Balasuriya et al., 2002b) and EAV-R (Mankoč et al., 2007) we successfully amplified a part of the ORF7 viral gene in all forty semen samples.

The sensitivity of molecular methods was determined by amplification of dilutions from the total RNA which was isolated from the infected RK-13 cell culture in which the reference Bucyrus strain was propagated. By amplifying the ORF7 gene region, it has been established that the real-time RT-PCR method is by 100 times more sensitive than the detection of RT-PCR products, and by 10 times more than the detection of »semi-nested« PCR products with electrophoresis in agarose gel. The real-time RT-PCR method is more sensitive than the enzyme-immune RT-PCR-ELISA test with which we achieved such sensitivity as with the conventional RT-PCR method, of course only after we have removed detergents by means of purification.

In the third part of the thesis, we wanted to investigate the possibility of using the established molecular methods for detecting the EAV in urethral swabs. The urethral swab could be used as a sample in cases of establishing the PS status when it is not possible to take semen from stallions. Besides, taking of urethral swab is simple and painless for the stallion and at the same time easier and safer for the performer in comparison to taking semen with an artificial vagina.

It is a known fact that the concentration of the EAV in urethral swabs is small (Neu et al., 1988), for this reason we first concentrated on finding the appropriate manner for isolating the total RNA. Among the three methods (described in point 3.2.5.1), which were tested on the Bucyrus reference strain as well as on clinical samples (semen and urethral swabs), the most effective was isolation of nucleic acids with commercial MagMax™ Viral RNA Isolation Kit. The total viral RNA, isolated with paramagnetic beads, was determined by means of real-time RT-PCR method in urethral swabs in all tested stallions. Exceptions were the stallions 261

and 289 where the EAV in urethral swabs was not detected with molecular methods. In addition to a too small quantity of EAV which can be under the detection limit of molecular methods, the possible reason for negative result of amplifying viral nucleic acid is in RT-PCR reaction inhibitors which are often present in urethral swabs. Of course, the possibility exists that viral nucleic acids were never present in urethral swab samples.

It was established that in the semen of PS there can be by 7×10^6 more nucleic acid of the EAV as in urethral swabs, therefore we share the opinion of many researchers from foreign diagnostic laboratories that for detecting PS with molecular methods, the entire ejaculate is the most appropriate sample.

The Slovenian EAV strains have never been genotyped yet. By phylogenetic analysis of the ORF5 variable sequence that encodes for the main viral glycoprotein GP₅, we established the evolutionary connections among Slovenian strains and strains from different European regions and other continents. 58 nucleotide sequences of own EAV strains and 98 sequences from the genetic sequence database GenBank were included in the analysis.

Phylogenetic analyses show that the EAV strains from the semen of stallions of different breeds from Slovenia belong among all the three known genetic groups EAV-1, EAV-2 and EAV-3, which were published by Mittelholzer and his colleagues (2006).

Viruses from semen samples belonging to the trotter breed were in the majority of cases placed in the EAV-1 and EAV-3 genetic groups, which predominantly include European strains. In the latter group the strains which were detected in the semen samples of Bavarian and Dutch warmblood horses RA_BT and ID_NT were classified.

According to expectations, the American type of EAV was detected in semen samples of American trotters (SL_AK and PP_AK). PP, SL-02 and SL-03 strains were placed in the EAV-2 genetic group, among the viruses from the North-American continent.

SM-02 and SM-03 strains from the semen of a Finnish trotter are related to strains from the group which unites unclassified isolates.

Our phylogenetic analyses have identified the strains from Lipizzaner stallions (stud farm A) as a completely new group of the EAV which have not been described yet in the accomplished phylogenetic studies.

Inside the independent monophyletic group, which is statistically very well supported in all three phylogenetic trees (NJ – 999, BI – 0,99 and ML – 999), strains from stud farm A are

classified in three separated clades. In the case of two clades, there are basal splits of strains which were determined in two elderly stallions (926, year 1986 and 987, year 1988). The position of strains which were determined in stallions that were younger than stallions 926 and 987 points to the fact that younger animals probably got infected from the older ones. The EAV strains from semen of the oldest two stallions from stud farm A (795, year 1981, and 840, year 1983) constitute a clade which is statistically well supported on BI and ML trees.

The highly polymorphic ORF5 that encodes for GP₅ has proven to be a good marker with which we succeeded in tracking some paths of spreading the EAV among individual stallions from different stables from stud farm A. The majority of differences were established between the nucleotide sequence pairs 168-06 and 987-01 as well as 168-07 and 987-01. On a segment of 495 nucleotides, the mentioned pairs differed by 78 nucleotides (15.76%). A lower rate of polymorphism was established among the dominant variants of the EAV from semen samples which were taken from the same PS at two occasions separated by 1 year. The differences between the ORF5 nucleotide sequences did not exceed 1.4%. A high level of ORF5 polymorphism indicates that the EAV change very fast in stallions from stud farm A. Fast evolution, which is 3.41×10^{-3} substitutions/nucleotide position/year in strains from stud farm A, does not occur only through the accumulation of simple nucleotide substitutions but also through quasispecies. In certain PS it has been established that in the same semen sample there coexist different EAV variants.

In some strains from stud farm A, nucleotide substitutions in the ORF5 gene were expressed at the level of their product. By comparative analysis of the GP₅ amino acid sequences, the V₁ region (aa 61 – 121), where the main neutralising epitopes A, B, C and D are found (Balasuriya et al., 1997), we found amino acids where strains from stud farm A differ from all the other strains in the alignment. Although the amino acid substitutions which were established in sequences from semen samples taken from the same PS at occasions at least two years apart resulted in variations of surface antigens, other elements of the GP₅ secondary structure have been fully preserved. In the majority of PS, synonymous nucleotide substitutions in the ORF5 gene were more frequent than non-synonymous, indicating that during infection the EAV evolution is predominantly guided by negative selection. For the virus viability, precise construction of glycoprotein GP₅ – which is, in a complex with protein M, the key element for EAV infectivity – is more important than the mimicry of surface antigens.

The EAV isolation in the RK-13 cell culture is the basic method for determining the infectious virus in the semen of PS. Along with the diagnostic importance the virus isolation has got a substantial role in recognizing their biological characteristics.

Assumptions on possible causes for unsuccessful isolations of EAV from semen coming from stallions of the stud farm A that were at first attributed to neutralising antibodies and their specific genetic basis, later, when isolation in the RK-13 cell culture was performed with the CMC in the culture medium, proved to be incorrect. Our experience show that, besides the CMC in the culture medium, RK-13 actively dividing cells which have not been infected with the BVD virus, fewer number of passages and an inoculum of adequate size in relation to the growth surface are the necessary condition for successful isolation of the EAV from semen. Additionally, RK-13 cells in the culture medium with 1% agarose proved to be a very useful tool for determining the EAV pathogenicity *in vitro*. The Slovenian isolates from the stud farm A produced the plaques that were by four times smaller than the Bucyrus virus which is pathogenic for horses. Under an optical microscope, the replication of 087-02 Slovenian strain from stud farm A could be recognised by a more limited and inexpressive CPE without lytic damages. The 087-02 strain replicated twice as slow than the reference Bucyrus strain. The former differed from the latter in a negligent influence on the change in the viability of RK-13 cells. All these observations additionally strengthen our conclusion that Slovenian isolates from stud farm A are less virulent.

Although an officially confirmed case of EVA has not yet been noted with Lipizzan horses from stud farm A (clinical signs and positive serological reaction), histopathological examination of testicles belonging to gelding 282 showed that viruses from the mentioned breeding are capable to provoke changes in blood vessel walls that are pathognomonic for EVA.

In the framework of EVA prevention and eradication programme, vaccination with live attenuated vaccine ARVAC[®] began in 2006. The results of serological testing showed that vaccinated colts are successfully protected from the clinical disease. Whether colts from stud farm A will be protected from permanent infection with local EAV strains by means of repeated vaccinations will be revealed in the future.

7. ZAHVALA

Za financiranje usposabljanja do doktorata se zahvaljujem Agenciji za raziskovalno dejavnost RS, Ministrstva za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo.

Članoma komisije prof. Marjanu Koscu, dekanu Veterinarske fakultete in prof. dr. Tatjani Avšič Županc se zahvaljujem za tehten pregled doktorske naloge in nasvete.

Mentorici izr. prof. dr. Darji Barlič - Maganja: »Hvala, ker si mi stala ob strani in me bodrila, ko sem v svetu molekularne virologije zašla v slepe ulice. Prevezel me je tvoj preudaren in miren um.«
»Bistvo je očem nevidno«, je napisal A. de Saint - Exupéry. Sedaj razumem tvoje besede.

Somentorju izr. prof. dr. Petru Hostniku: »Hvala, da si mi dal priložnost, da sem ob tebi s pipeto v roki gor zrasla. Klasična virologija je kakor črna luknja, ki te posrka vase. Odpira vrata na neznane poti, ki jim ni videti konca.«

Mecenu prof. dr. Jožetu Gromu: »Moji vagoni, bilo jih je veliko, so večkrat iztirili. Hvala, za usmeritev na pravi tir.«

Darinki: »Hvala za tople objem. Vedno si znala posušiti moje solze.«

Štefki: »S celicami RK-13 se pogovarjam kot s svojima otrokoma. Prav potihoma jim prigovarjam, da so one edinstvene na svetu.«

Janezu: »Ti si z vrečko in zvezkom pod pajsko tekkel v secirnico, jaz pa v laboratorij. Vseskozi se zdi, da se življenju nekam mudi.«

Feriju: »Ena paketa, dva paketa...« »Hvala za prijateljstvo in kemijski poduk.« Ireni: »Pridem na kavo.«

Cimri Adeli: »Ma ke sreča, da imam tebe. Lepo je bilo počokolati po domače. Pa glej, da si se kej naučila od mene. Ne samo to, da si razmetana, ampak tudi natančna ne smeš biti preveč, kr če ne bo vse dehidriralo (spomni se na celice).«

Urški Cigici: »Tvoje dolge noge, z mano vštric so po laboratoriju hodile, le poglej tvoj nasmeh, krokodilčke v očeh...Še dobro, da so bile hrenovke, jajca in čufti. Brez njih sekvence še danes ne bi bile urejene.«

Danijeli: »Tvoje roke so zlate in prihodnost virologije je v tvojih rokah. Le tako naprej!«

Aleksandri: »Hvala za požrtvovalnost na kurirski poti Jesenice – Ljubljana. Tišina je lepa.« »In vendar se v tišini nekaj lesketa...« (A. de Saint - Exupéry)

Urški Kuhar: »Zvezde pomenijo ljudem vsakemu kaj drugega. Popotnikom so vodnice. Drugim so samo drobne lučke. Znanstvenikom so uganke.« (A. de Saint - Exupéry)

Za natančen in skrben pregled citirane literature se zahvaljujem vodji Centra za informatiko in knjižnico na Veterinarski fakulteti mag. Brigiti Grecs - Smole. »Hvala za ekspresno dostavo člankov, ki sem jih naročala tekom študija.«

Da vejice in pike stojijo tako kot pravopis veli, lektorica Vida Meško poskrbi. »Hvala, da si popravila mojo primorsko slovenščino.«

Maji hvala za stilsko preobrazbo.

Aleš mi je omogočil, da ne tipkam po abakusu. Za stilsko preobrazbo je poskrbela Maja.

Matjažu Petroviču se zahvaljujem za vzorce semena. »Korajža velja.«

Prof. dr. Poloni Juntas in dr. Tanji Švara se zahvaljujem za opravljene patohistološke preiskave in mikroskopske posnetke tkiva mod.

Matjažu Mesariču in Marku Cotmanu: »V vajini družbi je bilo prijetno pokramljati in se nasmejati.«

Vsem MOJIM, ki jih imam RADA: Mami, Jani, Mirotu, Mami Veri, Tilnu, Ivi, Juliji, Petru, Janžu in Ruju.
Želja po odkrivanju novih svetov mi je dala krila. Veter še vedno piha, jaz pa sem varno pristala. Hvala.

Nona, tvoji pažgeti so najboljši. Vedno me spremljajo tvoje besede: »Quidquid agis, prudenter agas, et respice finem.«

Jože je rekel: »Ustavi konje!«

Pa sem jih le.

8. VIRI

Afonina IA, Zivarts M, Kutuyavin I, Lukhtanov E, Meyer RB (1997). Efficient priming of PCR short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 25: 2657-60.

Afonina IA, Reed MW, Lusby E, Shishkina IG, Belousov YS (2002). Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. *Biotechniques* 32:940-9.

Albert J, Leitner T (1999). The molecular clock of HIV-1 unveiled through analysis of a known transmission history. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10752-7.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-10.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-402.

Anderson GW, Palmer GA, Rowland RRR, Even C, Plagemann PGW (1995). Lactate dehydrogenase-elevating virus entry into the central nervous system and replication in anterior horn neurons. *J Gen Virol* 76:581-92.

Antony T, Thomas T, Shirahata A, Thomas TJ (1999). Selectivity of polyamines on the stability of RNA-DNA hybrids containing phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides. *Biochemistry* 38:10775-84.

Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com.au/sdsnews.htm).

Archambault D, St-Laurent G (2000). Induction of apoptosis by equine arteritis virus infection. *Virus Genes* 20:143-7.

Asagoe T, Inaba Y, Jusa ER, Kouno M, Uwatoko K, Fukunaga Y (1997). Effect of heparin on infection of cells by equine arteritis virus. *J Vet Med Sci* 59:727-8.

Balasuriya UBR, Rossitto PV, DeMaula CD, MacLachlan NJ (1993). A 29K envelope glycoprotein of equine arteritis virus expresses neutralization determinants recognized by murine monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 74:2525-9.

Balasuriya UBR, MacLachlan NJ, de Vries AAF, Rossitto PV, Rottier PJM (1995a). Identification of a neutralization site in the major envelope glycoprotein (G_L) of equine arteritis virus. *Virology* 207:518-27.

Balasuriya UBR, Timoney PJ, McCollum WH, MacLachlan NJ (1995b). Phylogenetic analysis of open reading frame 5 of field isolates of equine arteritis virus and identification of conserved and nonconserved regions in the G_L envelope glycoprotein. *Virology* 214:690-7.

Balasuriya UBR, Patton JF, Rossitto PV, Timoney PJ, McCollum WH, MacLachlan NJ (1997). Neutralization determinants of laboratory strains and field isolates of equine arteritis virus: identification of four neutralization sites in the amino-terminal ectodomain of the G_L envelope glycoprotein. *Virology* 232:114-28.

Balasuriya UBR, Evermann JF, Hedges JF et al. (1998). Serologic and molecular characterization of an abortigenic strain of equine Arteritis virus derived from infective frozen semen and an aborted equine fetus. *J Am Vet Med Assoc* 213:1586-9.

Balasuriya UBR, Hedges JF, Timoney PJ, McCollum WH, MacLachlan NJ (1999a). Genetic stability of equine arteritis virus during horizontal and vertical transmission in an outbreak of equine viral arteritis. *J Gen Virol* 80:1949-58.

Balasuriya UBR, Snijder EJ, van Dinten LC et al. (1999b). Equine arteritis virus derived from an infectious cDNA clone is attenuated and genetically stable in infected stallions. *Virology* 260:201-8.

Balasuriya UBR, Heidner HW, Hedges JF et al. (2000). Expression of two envelope proteins of equine arteritis virus as heterodimer is necessary for induction of neutralizing antibodies in mice immunized with recombinant Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *J Virol* 74:10623-30.

Balasuriya UBR, Hedges JF, MacLachlan NJ (2001). Molecular epidemiology and evolution of equine arteritis virus. *Adv Exp Med Biol* 494:19-24.

Balasuriya UBR, Heidner HW, Davis NL (2002a). Alphavirus replicon particles expressing the two major envelope proteins of equine arteritis virus induce high level protection against challenge with virulent virus in vaccinated horses. *Vaccine* 20:1609-27.

Balasuriya UBR, Leutenegger CM, Topol JB, McCollum WH, Timoney PJ, MacLachlan NJ (2002b). Detection of equine arteritis virus by real-time TaqMan[®] reverse transcription-PCR assay. *J Virol Methods* 101:21-8.

Balasuriya UBR, Dobbe JC, Heidner HW et al. (2004a). Characterization of neutralization determinants of equine arteritis virus using recombinant chimeric viruses and site-specific mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Virology* 321:235-46.

Balasuriya UBR, MacLachlan NJ (2004b). The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses. *Vet Immunol Immunopathol* 102:107-29.

Balasuriya UBR, Hedges JF, Smalley JF et al. (2004c). Genetic characterization of equine arteritis virus during persistent infection of stallions. *J Gen Virol* 85:379-90.

Balasuriya UBR, Snijder EJ, Heidner HW et al. (2007). Development and characterization of an infectious cDNA clone of the virulent Bucyrus strain of equine arteritis virus. *J Gen Virol* 88:918-24.

Barltrop JA, Owen TC, Cory AH, Cory JG (1991). 5-(-3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans As cell-viability indicators. *Bioorg Med Chem Lett* 1:611-14.

Barrette-Ng IH, Ng KK, Mark BL, van Aken D, Cherney MM, Garen C et al. (2002). Structure of arterivirus nsp4: the smallest chymotrypsin-like proteinase with an α/β C-terminal extension and alternate conformations of the oxyanion hole. *J Biol Chem* 277:39960-6.

Beerens N, Snijder EJ (2006). RNA signals in the 3' terminus of the genome of equine arteritis virus are required for viral RNA synthesis. *J Gen Virol* 87:1977-83.

Beerens N, Snijder EJ (2007). An RNA pseudoknot in the 3' end of the arterivirus genome has a critical role in regulating viral RNA synthesis. *J Virol* 81:9426-36.

Belák S, Ballagi-Pordany A, Timoney PJ et al. (1995). Evaluation of nested PCR assay for the detection of equine arteritis virus. In: Nakajima H, Plowright W, eds. *Equine infectious diseases VII. Proceedings of the 7th international conference on equine infectious diseases*. Tokyo, 1994. Newmarket: R & W Publications, 33-8.

Bengtsson M, Karlsson HJ, Westman G, Kubista M (2003). A new minor groove binder asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 31:e45.

Bergman AM (1913). Beiträge zur Kenntnis der Virusträger bei Rotlaufseuche, Influenza erysipelatos, des Pferdes. *Zentralbl Infektionskrankh* 13:161-74.

Beridge MV, Tan AS (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303:474-82.

Boger DL, Coleman RS, Invergo BJ (1987). Studies on the total synthesis of CC-1065: Preparation of a synthetic, simplified 3-carbamoyl-1,2-dihydro-3H-pyrrolo[3,2-e]indole dimer/trimer/tetramer (CDPI dimer/trimer/tetramer) and development of methodology for PDE-I dimer methyl ester formation. *J Org Chem* 52: 1521-30.

Breese SS, McCollum WH (1970). Electron-microscopic characterization of equine arteritis virus. In: Bryans JT, Gerber H, eds. *Equine infectious diseases II. Proceedings of the 2nd international conference on equine infectious diseases*. Paris, 1969. Basle: S. Karger, 133-9.

Breese SS, McCollum WH (1973). Electron-microscopic studies of tissues of horses infected by equine arteritis virus. In: Bryans JT, Gerber H, eds. *Equine infectious diseases III. Proceedings of the 3rd international conference on equine infectious diseases*. Paris, 1972. Basle: S. Karger, 273-81.

Brion A, Fontaine M, Moraillon R (1967). Fièvre typhoïde du cheval. Artérite à virus. *Recl Méd Vét* 143:17-27.

- Brierley I (1995). Ribosomal frameshifting on viral RNAs. *J Gen Virol* 76:1885-92.
- Bryans JT, Crowe MEW, Doll ER, McCollum WH (1957a). Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares: its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. *Cornell Vet* 47:3-41.
- Bryans JT, Doll ER, Knappenberger RE (1957b). An outbreak of abortion caused by the equine arteritis virus. *Cornell Vet* 47:69-75.
- Bürki F (1965). Eigenschaften des virus der equinen arteritis. *Pathol Microbiol* 28:939-49.
- Bürki F (1970). The virology of equine arteritis. In: Bryans JT, Gerber H, eds. *Equine infectious diseases II. Proceedings of the 2nd international conference on equine infectious diseases*. Paris, 1969. Basle: S. Karger, 125-9.
- Bürki F, Gerber H (1966). Ein virologisch gesicherter Großausbruch von Equiner Arteritis. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 79:391-5.
- Bürki F, Hofer A, Nowotny N (1992). Objective data plead to suspend import-bans for seroreactors against equine arteritis virus except for breeder stallions. *J Appl Anim Res* 1:31-42.
- Bustin SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25:169-93.
- Bustin SA, Nolan T (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 15:155-66.
- Bustin SA, Mueller R (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci* 109:365-79.
- Campsall PA, Au NH, Prendiville JS, Speert DP, Tan R, Thomas EE (2004). Detection and genotyping of varicella-zoster virus by TaqMan allelic discrimination real-time PCR. *J Clin Microbiol* 42:1409-13.
- Carman S, Rae C, Dubovi E (1988). Equine arteritis virus isolated from a standardbred foal with pneumonia. *Can Vet J* 29:937.
- Castillo-Olivares J, de Vries AAF, Raamsman MJB et al. (2001). Evaluation of a prototype sub-unit vaccine against equine arteritis virus comprising the entire ectodomain of the virus large envelope glycoprotein (G_L): induction of virus-neutralizing antibody and assessment of protection in ponies. *J Gen Virol* 82:2425-35.
- Castillo-Olivares J, Wieringa R, Bakonyi T, de Vries AAF, Davis-Poynter NJ, Rottier PJM (2003). Generation of candidate live marker vaccine for equine arteritis virus by deletion of the major virus neutralization domain. *J Virol* 77:8470-80.

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

Chao L (1990). Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. Nature 348:454-55.

Chirnside ED (1992). Equine arteritis virus: an overview. Br Vet J 148:181-97.

Chirnside ED, Spaan WJM (1990). Reverse transcription and cDNA amplification by polymerase chain reaction of equine arteritis virus (EAV). J Virol Methods 30:133-40.

Chirnside ED, Wearing CM, Binns MM, Mumford JA (1994). Comparison of M and N gene sequences distinguishes variation amongst equine arteritis virus isolates. J Gen Virol 75:1491-7.

Chirnside ED, Francis PM, Mumford JA (1995a). Expression cloning and antigenic analysis of the nucleocapsid protein of equine arteritis virus. Virus Res 39:277-88.

Chirnside ED, Francis PM, de Vries AAF, Sinclair R, Mumford JA (1995b). Development and evaluation of an ELISA using recombinant fusion protein to detect the presence of host antibody to equine arteritis virus. J Virol Methods 54:1-13.

Chirnside ED, de Vries AAF, Mumford JA, Rottier PJM (1995c). Equine arteritis virus-neutralizing antibody in the horse is induced by a determinant on the large envelope glycoprotein G_L. J Gen Virol 76:1989-98.

Cho HJ, Entz SC, Deregt D, Jordan LT, Timoney PJ, McCollum WH (2000). Detection of antibodies to equine arteritis virus by a monoclonal antibody-based blocking ELISA. Can J Vet Res 64:38-43.

Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162:156.

Clark J (1892). Transmission of pink-eye from apparently healthy stallions to mares. J Comp Pathol 5:261-4.

Clarke DK, Duarte EA, Elena SF, Moya A, Domingo E, Holland JJ (1994). The Red Queen reigns in the kingdom of RNA viruses. Proc Natl Acad Sci USA 91:4821-4.

Clayton H (1987). The outbreak of EVA in Alberta, Canada. J Equine Vet Sci 7:101.

Clegg RM (1992). Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. Methods Enzymol 211:353-88.

Coignoul FL, Cheville NF (1984). Pathology of the maternal genital tract, placenta and foetus in equine viral arteritis. Vet Pathol 21:333-40.

Cole JR, Hall RF, Gosser HS et al. (1986). Transmissibility and abortigenic effect of equine viral arteritis in mares. J Am Vet Med Assoc 189:769.

Cole C, Barber JD, Barton GJ (2008). The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* 36 (Web server issue): W197-201. Epub May 7.

Collins JK, Kari S, Ralston SL, Bennet DG, Traub Dargatz JL, McKinnon AO (1987). Equine viral arteritis in a veterinary teaching hospital. *Prev Vet Med* 4:389-97.

Crawford TB, Henson JB (1973). Immunofluorescent, light-microscopic and immunologic studies of equine viral arteritis. In: Bryans JT, Gerber H, eds. *Equine infectious diseases III. Proceedings of the 3rd international conference on equine infectious diseases*. Paris, 1972. Basle: S. Karger, 282-302.

Del Piero F, Wilkins PA, Lopez JW et al. (1997). Equine viral arteritis in newborn foals: clinical, pathological, serological, microbiological and immunohistochemical observations. *Equine Vet J* 29:178-85.

Del Piero F (2000a). Equine viral arteritis. *Vet Pathol* 37:287-96.

Del Piero F (2000b). Diagnosis of equine arteritis virus infection in two horses by using monoclonal antibody immunoperoxidase histochemistry on skin biopses. *Vet Pathol* 37:486-7.

Deregt D, de Vries AAF, Raamsman MJB, Elmgren LD, Rottier PJM (1994). Monoclonal antibodies to equine arteritis virus proteins identify the G_L protein as a target for virus neutralization. *J Gen Virol* 75:2439-44.

de Vries AAF, Chirnside ED, Bredenbeek PJ, Gravestien LA, Horzinek MC, Spaan WJM (1990). All subgenomic mRNAs of equine arteritis virus contain a common leader sequence. *Nucleic Acids Res* 18:3241-7.

de Vries AAF, Chirnside ED, Horzinek MC, Rottier PJM (1992). Structural proteins of equine arteritis virus. *J Virol* 66:6294-303.

de Vries AAF (1994). The molecular biology of equine arteritis virus. PhD thesis. Utrecht: University

de Vries AAF, Raamsman MJB, van Dijk HA, Horzinek MC, Rottier PJM (1995a). The small envelope glycoprotein (G_S) of equine arteritis virus folds into three distinct monomers and a disulfide-linked dimer. *J Virol* 69:3441-8.

de Vries AAF, Post SM, Raamsman MJB, Horzinek MC, Rottier PJM (1995b). The two major envelope proteins of equine arteritis virus associate into disulfide-linked heterodimers. *J Virol* 69:4668-74.

de Vries AAF, Rottier PJM, Glaser AL, Horzinek MC (1996). Equine viral arteritis. In: Studdert MJ, Horzinek MC, eds. *Virus infections of equines*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 171-200.

de Vries AAF, Horzinek MC, Rottier PJM, de Groot RJ (1997). The genome organization of the *Nidovirales*: similarities and differences between arteri-, toro- and coronaviruses. *Semin Virol* 8:33-47.

den Boon JA, Snijder EJ, Chirnside ED et al. (1991). Equine arteritis is not a togavirus but belongs to the coronaviruslike superfamily. *J Virol* 65:2910-20.

den Boon JA, Spaan WJM, Snijder EJ (1995). Equine arteritis virus subgenomic RNA transcription: UV inactivation and translation inhibition studies. *Virology* 213:364-72.

den Boon JA, Kleijnen MF, Spaan WJM, Snijder EJ (1996). Equine arteritis virus subgenomic mRNA synthesis: analysis of leader-body junctions and replicative-form RNAs. *J Virol* 70:4291-8.

Deshpande A, Wang S, Walsh MA, Dokland T (2007). Structure of the equine arteritis virus nucleocapsid protein reveals a dimer-dimer arrangement. *Acta Cryst D* 63:581-6.

Didenko VV (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 31:1106-21.

Dimmock NJ (1984). Mechanisms of neutralization of animal viruses. *J Gen Virol* 65:1015-22.

Dimmock NJ (1987). Multiple mechanisms of neutralization of animal viruses. *Nature* 70-5.

Dobbe JC, van der Meer Y, Spaan WJM, Snijder EJ (2001). Construction of chimeric arteriviruses reveals that the ectodomain of the major glycoprotein is not the main determinant of equine arteritis virus tropism in cell culture. *Virology* 288:283-94.

Doll ER, Bryans JT, Wilson JC, McCollum WH (1968). Immunization against equine viral arteritis using modified live virus propagated in cell cultures of rabbit kidney. *Cornell Vet* 58:497-524.

Domingo E (1997). Rapid evolution of viral RNA genomes. *J Nutr* 127:958-61.

Domingo E, Sabo DL, Taniguchi T, Weissmann C (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* 13:735-44.

Domingo E, Diez J, Martinez MA, Hernandez J, Holguin A, Borrego B, Mateu MG (1993). New observations on antigenic diversification of RNA viruses. Antigenic variation is not dependent on immune selection. *J Gen Virol* 74:2039-45.

Domingo E, Holland JJ (1994). Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In: Morse SS, ed. *Evolutionary biology of viruses*. New York: Raven Press, 161-84.

Domingo E, Holland JJ (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 51:151-78.

Domingo E, Menendez - Arias L, Holland JJ (1997). RNA virus fitness. *Rev Med Virol* 7:87-96.

Domingo E, Escarmis C, Sevilla N et al. (1996). Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J* 10:859-64.

Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991). "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19:4008.

Drake JW (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7160-4.

Drake J (1993). Rates of spontaneous mutations among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:4171-5.

Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 4(5):e88. Epub Mar 14.

Duarte E, Clarke D, Moya A, Domingo E, Holland JJ (1992). Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6015-9.

Duarte EA, Novella IS, Ledesma S et al. (1994). Subclonal components of consensus fitness in an RNA virus clone. *J Virol* 68:4295-301.

Dyer JR, Gilliam BL, Eron JJ, Grosso L, Cohen MS, Fiscus SA (1996). Quantitation of HIV-1 RNA in cell free seminal plasma. *J Virol Methods* 60:161-70.

Echeverria MG, Diaz S, Metz GE, Serena MS, Panei CJ, Noretto E (2007). Genetic typing of equine arteritis virus isolates from Argentina. *Virus Genes* 35:313-20.

Eichorn W, Heilmann M, Kaaden OR (1995). Equine viral arteritis with abortions: Serological and virological evidence in Germany. *Zentralbl Veterinarmed B* 42:574-6.

Eigen M, Biebricher CK (1988). Sequence space and quasispecies distribution. In: Domingo E, Holland JJ, Ahlquist P, eds. *RNA genetics*. Boca Raton: CRC Press, 211-45.

Eigen M, Schuster P (1977). A principle of natural self-organization. *Naturwissenschaften* 64:541-65.

Eigen M (1987). New concepts for dealing with the evolution with nucleic acids. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 52:307-19.

Eigen M (1993). Viral quasispecies. *Sci Am* 269:42-9.

Eigen M (1996). On the nature of viral quasispecies. *Trends Microbiol* 4:216-8.

Eigen M, McCaskill J (1988). Molecular quasi-species. *J Phys Chem* 92:6881-91.

Enjuanes L, Spaan W, Snijder EJ, Cavanagh D (2000). *Nidovirales*. In: van Regenmortel MHV et al., eds. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. San Diego: Academic Press, 827-34.

Estes PC, Cheville NF (1970). The ultrastructure of vascular lesions in equine viral arteritis. *Am J Pathol* 58:235-53.

Faaberg KS, Palmer GA, Even C, Anderson GW, Plagemann PGW (1995). Differential glycosilation of the ectodomain of the primary envelope glycoprotein of two strains of lactate dehydrogenase-elevating virus that differ in neuropathogenicity. *Virus Res* 39:331-40.

Felsenstein J (1978). Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst Zool* 27:401-10.

Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenetics: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-91.

Felsenstein J (2006). PHYLIP Phylogeny inference package. Version 3.66, September 2006. Seattle: Department of Genome Sciences and Department of Biology, University of Washington.

Felsenstein J (2008). PHYLIP Phylogeny inference package, Version 3.68, July 2008. Seattle: Department of Genome Sciences and Department of Biology, University of Washington.

Felsenstein J, Churchill GA (1996). A hidden Markov model approach to variation among sites in rate of evolution. *Mol Biol Evol* 13:93-104.

Feuerstein BG, Pattabiraman N, Marton LJ (1986). Spermine-DNA interactions: a theoretical study. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5948-52.

Fitch WM, Margoliash E (1967). Construction of phylogenetic trees. *Science* 155:279-84.

Förster T (1984). Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann Phys* 6:55-75.

Freeman KP, Cline JM, Simmons R, Wilkins PA, Cudd TA, Perry BJ (1989). Recognition of bronchopulmonary dysplasia in a newborn foal. *Equine Vet J* 21:292-6.

Fredericks DN, Relman DA (1999). Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 29:475-86.

Freistadt MS, Vaccaro JA, Eberle KE (2007). Biochemical characterization of the fidelity of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Virol J* 4:44.

Fukunaga Y, McCollum WH (1977). Complement-fixation reactions in equine viral arteritis. *Am J Vet Res* 38:2043-6.

Fukunaga Y, Imagawa H, Tabuchi E, Akiyama Y (1981). Clinical and virological findings on experimental equine viral arteritis in horses. *Bull Equine Res Inst* 18:110-8.

Fukunaga Y, Wada R, Hirasawa K, Kamada M, Kumanomido T, Akiyama Y (1982). Effect of the modified Bucyrus strain of equine arteritis virus experimentally inoculated into horses. *Bull Equine Res Inst* 19:97-101.

Fukunaga Y, Wada R, Matsumura T et al. (1992). An attempt to protect against persistent infection of equine viral arteritis in the reproductive tract of stallions using formalin-inactivated virus vaccine. In: Plowright W, Rosedale PD, Wade JF, eds. *Equine infectious diseases VI. Proceedings of the 6th international conference on equine infectious diseases*. Cambridge, 1991. Newmarket: R & W Publications, 239-44.

Fukunaga Y, Imagawa H, Kanemaru T, Kamada M (1993). Complement-dependent serum neutralization with virulent and avirulent Bucyrus strain of equine arteritis virus. *Vet Microbiol* 36:379-83.

Fukunaga Y, Wada R, Kanemaru T, Imagawa H, Kamada M (1994). Failure in the development of carrier state of equine viral arteritis in colts. *J Equine Sci* 5:45-8.

Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12:543-8.

Gibson UEM, Heid CA, Williams PM (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6:995-1001.

Giese M, Bahr U, Jakob NJ et al. (2002). Stable and long-lasting immune response in horses after DNA vaccination against equine arteritis virus. *Virus Genes* 25:159-67.

Gilbert SA, Timoney PJ, Deregt D (1997). Detection of equine arteritis virus in the semen of carrier stallions by using a sensitive nested PCR assay. *J Clin Microbiol* 35:2181-3.

Ginzinger DG (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 30:503-12.

Glaser AL, de Vries AAF, Dubovi EJ (1995). Comparison of equine arteritis virus isolates using neutralizing monoclonal antibodies and identification of sequence changes in G_L associated with neutralization resistance. *J Gen Virol* 76:2223-33.

Glaser AL, Rottier PJM, Horzinek MC, Colenbrander B (1996). Equine arteritis virus: a review of clinical features and management aspects. *Vet Q* 18:95-9.

Glaser AL, Chirnside ED, Horzinek MC, de Vries AAF (1997). Equine arteritis virus. *Theriogenology* 47:1275-95.

Gojobori T, Moriyama EN, Kimura M (1990). Molecular clock of viral evolution and the neutral theory. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:10015-8.

Golnik W, Michalaska Z, Michalak T (1981). Natural equine viral arteritis in foals. *Schweiz Arch Tierheilkd* 123:523-33.

González JM, Gomez-Puertas P, Cavanagh D, Gorbalenya AE, Enjuanes L (2003). A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family *Coronaviridae*. *Arch Virol* 148: 2207-35.

Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM (1989a). Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 17:4847-61.

Gorbalenya AE, Donchenko AP, Blinov VM, Koonin EV (1989b). Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Lett* 243:103-14.

Gorbalenya AE, Koonin EV (1993). Comparative analysis of amino acids sequences of key enzymes of replication and expression of positive-strand RNA viruses. Validity of approach and functional and evolutionary implications. *Sov Sci Rev D Physicochem Biol* 11:1-84.

Gorbalenya AE, Enjuanes L, Zeibuhr J, Snijder EJ (2006). *Nidovirales*: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res* 117:17-37.

Guindon S, Gascuel O (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696-704.

Gunson RN, Collins TC, Carman WF (2006). Practical experience of high throughput real time PCR in routine diagnostic virology setting. *J Clin Virol* 35:355-67.

Guthrie AJ, Howell PG, Hedges JF et al. (2003). Lateral transmission of equine arteritis virus among Lipizazner stallions in South Africa. *Equine Vet J* 35:596-600.

Hamming RW (1950). Error detecting and error correcting codes. *Bell Syst Techn J* 26:147-60.

Hanada K, Suzuki Y, Nakane T, Hirose O, Gojobori T (2005). The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Mol Biol Evol* 22:1024-31.

Harry TO, McCollum WH (1981). Stability of viability and immunizing potency of lyophilized, modified equine arteritis live virus vaccine. *Am J Vet Res* 42:1501-5.

Hastings WK (1970). Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika* 57:97-109.

Hedges JF, Balasuriya UBR, Shabbir A et al. (1998). Detection of antibodies to equine arteritis virus by enzyme linked immunosorbent assay utilizing G_L, M and N proteins expressed from recombinant baculoviruses. *J Virol Methods* 76:127-37.

Hedges JF, Balasuriya UBR, MacLachlan NJ (1999a). The open reading frame 3 of equine arteritis virus encodes an immunogenic glycosylated integral membrane protein. *Virology* 264:92-8.

Hedges JF, Balasuriya UBR, Timoney PJ, McCollum WH, MacLachlan NJ (1999b). Genetic divergence with emergence of phenotypic variants of equine arteritis virus during persistent infection of stallions. *J Virol* 73:3672-81.

Heller MJ, Morrison LE (1985). Chemiluminescent and fluorescent probes for DNA hybridization. In: Kingsbury DT, Falkow S, eds. Rapid detection and identification of infectious agents. New York: Academic Press, 245-56.

Henson JB, Crawford TB (1974). The pathogenesis of virus-induced arterial disease: Aleutian disease and equine viral arteritis. *Adv Cardiol* 13:183-91.

Hermann JR, Brockmeier SL, Yoon KJ, Zimmerman JJ (2008). Detection of respiratory pathogen in air samples from acutely infected pigs. *Can J Vet Res* 72:367-70.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10:413-7.

Himeur D (1976). Incidence in Morocco of equine infectious anemia, rhinopneumonitis and viral arteritis. Epidemiologic survey, prophylaxis. *Vet Bull* 46:11.

Holyoak GR, Little TV, McCollum WH, Timoney PJ (1993a). Relationship between onset of puberty and establishment of persistent infection with equine arteritis virus in the experimentally infected colts. *J Comp Path* 109:29-46.

Holyoak GR, Giles RC, McCollum WH, Little TV, Timoney PJ (1993b). Pathological changes associated with equine arteritis virus infection of the reproductive tract in prepubertal and peripubertal colts. *J Comp Pathol* 109:281-93.

Holyoak GR, Balasuriya UBR, Broaddus CC, Timoney PJ (2008). Equine viral arteritis: current status and prevention. *Theriogenology* 70:403-14.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7276-80.

Holland JJ, de la Torre JC, Steinhauer DA (1992). RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* 176:1-20.

Horner GW (2004). Equine viral arteritis control scheme: a brief overview with emphasis on laboratory aspects of the scheme in New Zealand. *N Z Vet J* 52: 82-4.

Hornyák Á, Bakonyi T, Tekes G, Szeredi L, Rusvai M (2005). A novel subgroup among genotypes of equine Arteritis virus: genetic comparison of 40 strains. *J Vet Med B* 52:112-8.

Hornyák Á, Bakonyi T, Kulik M, Kecskeméti, Rusvai M (2006). Application of polymerase chain reaction and virus isolation techniques for the detection of viruses in aborted and newborn foals. *Acta Vet Hung* 54:271-9.

Horzinek MC, Maess J, Laufs R (1971). Studies on substructure of togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhea, and hog cholera viruses. *Arch Gesamte Virusforsch* 33:306-18.

Hostnik P, Grom J (1996). Virusni arteritis konj: seroepizootiološka situacija v Sloveniji. In: 4. Problemska veterinarska konferenca. Maribor, 1996, Ljubljana: Slovenska veterinarska zveza, 125-8.

Hullinger PJ, Wilson WD, Rossitto PV, Patton JF, Thurmond MC, MacLachlan NJ (1998). Passive transfer, decay and protein specificity of equine arteritis virus antibodies in an endemically-infected standardbred herd. *J Am Vet Med Assoc* 213:839-42.

Hullinger PJ, Gardner IA, Hietala SK, Ferraro GL, MacLachlan NJ (2001). Seroprevalence of antibodies against equine arteritis virus in horses residing in the United States and imported horses. *J Am Vet Med Assoc* 219:946-9.

Huntington PJ, Forman AJ, Ellis PM, Forman AJ, Timoney PJ (1990). Equine viral arteritis. *Aust Vet J* 67:429-31.

Huovilainen A, Ek-Kommonen C (1998). Equine viral arteritis, current status in Finland. *Adv Exp Med Biol* 440:649-53.

Hurley LH, Reynolds VL, Swenson DH, Petzold GL, Scahill TA (1984). Reaction of the antitumor antibiotic CC-1065 with DNA: structure of a DNA adduct with DNA sequence specificity. *Science* 226:843-4.

Hyllseth B (1969). A plaque assay of equine arteritis virus in BHK-21 cells. *Arch Gesamte Virusforsch* 28:26-33.

Hyllseth B (1970). Buoyant density studies on equine arteritis virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 30:97-104.

Hyllseth B, Pettersson U (1970). Neutralization of equine arteritis virus; enhancing effect of guinea pig serum. *Arch Gesamte Virusforsch* 32:337-47.

Igarashi K, Kashiwagi K (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 271:559-64.

Iniguez P, Zientara S, Marault M, Machin IB, Hannant D, Cruciere C (1998). Screening of horse polyclonal antibodies with a random peptide library displayed on phage: identification of ligands used as antigens in an ELISA test to detect the presence of antibodies to equine arteritis virus. *J Virol Methods* 73:175-83.

Ivanov KA, Hertzog T, Rozanov M, Bayer S, Thiel V, Gorbalenya AE, Ziebuhr J (2004). Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12694-9.

Jameson BA, Wolf H (1988). The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput Appl Biosci* 4:181-6.

Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG, Holmes EC (2002). Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J Mol Evol* 54:156-65.

Jerman I, Štern A (1999). Okolje in evolucija. In: Resinovič B, ed. *Evolucija s teoretično biologijo*. 1st ed. Ljubljana: ŠOU-Študentska založba, 38-43.

Johnson B, Baldwin C, Timoney P, Ely R (1991). Arteritis in equine fetuses aborted due to equine viral arteritis. *Vet Pathol* 28:248-50.

Jones TC, Doll ER, Bryans JT (1957). The lesions of equine viral arteritis. *Cornell Vet* 47:52-68.

Jones TC (1969). Clinical and pathologic features of equine viral arteritis. *J Am Vet Med Ass* 155:315-7.

Jones DT (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 292:195-202.

Jung R, Soondrum K, Neumaier N (2000). Quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 38:833-6.

Kheyar A, Martin S, St-Laurent G, Timoney PJ, McCollum WH, Archambault D (1997). Expression cloning and humoral immune response to the nucleocapsid and membrane proteins of equine arteritis virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 4(6):648-52.

Kidd IM, Clark DA, Emery VC (2000). A non-radioisotopic quantitative competitive polymerase chain reaction method: application in measurement of human herpesvirus 7 load. *J Virol Methods* 87:177-81.

Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-20.

Kimura M (1984). *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge: University Press.

Klasse PJ, Sattentau QJ (2001). Mechanisms of virus neutralization by antibody. *Curr Top Microbiol Immunol* 260:87-108.

Klasse PJ, Sattentau QJ (2002). Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *J Gen Virol* 83:2091-108.

Kondo T, Sugita S, Fukunaga Y, Imagawa H (1998a). Identification of the major epitope in the GL protein of equine arteritis virus (EAV) recognized by antibody in EAV-infected horses using synthetic peptides. *J Equine Sci* 9:19-23.

Kondo T, Fukunaga Y, Sekiguchi K, Sugiura T, Imagawa H (1998b). Enzyme-linked immunosorbent assay for serological survey equine arteritis virus in racehorses. *J Vet Med Sci* 60:1043-5.

Konishi S, Akashi H, Sentsui H, Ogata M (1975). Studies on equine viral arteritis. I. Characterization of the virus and trial survey on antibody with Vero cell cultures. *Jpn J Vet Sci* 37:259-67.

Koonin EV, Dolja VV (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 28:375-430.

Kreuzer KA, Bohn A, Lass U, Peters UR, Schmidt CA (2000). Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using TaqMan probe format in the LightCycler instrument. *Mol Cell Probes* 14:57-60.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27:95-125.

Kumar S, Reed MW, Gamper HB et al. (1998). Solution structure of a highly stable DNA duplex conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 26:831-8.

Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A et al. (2000). 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 28:655-61.

Kutyavin IV, Lokhov SG, Afonina IA et al. (2002). Reduced aggregation and improved specificity of G-rich oligodeoxyribonucleotides containing pyrazolo[3,4-d] pyrimidine guanine bases. *Nucleic Acids Res* 30:4952-9.

Kwok S, Higuchi R (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237-8.

Kwok S, Kellogg DE, McKinney N et al. (1990). Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res* 18:999-1005.

Kwok S, Chang SY, Sninsky JJ, Wang A (1994). A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *Genome Res* 3:39-47.

Lande R (1985). Expected time for random genetic drift of a population between stable phenotypic states. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7641-5.

Landt O. Selection of hybridization probes for real-time quantification and genetic analysis. Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, eds. *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications* 2001:35-41. Springer Verlag Berlin.

Larsen EL, Storgaard T, Holm E (2001). Phylogenetic characterisation of the GL sequences of equine arteritis virus isolated from semen of asymptomatic stallions and fatal cases of equine viral arteritis in Denmark. *Vet Microbiol* 80:339-46.

Larska M, Rola J (2003). RT-PCR as effective detection method of equine arteritis virus in the semen of naturally infected stallion. *Bull Vet Inst Pulawy* 47:307-13.

Larska M, Rola J (2008a). Epizootiology of equine arteritis virus (EAV) infection in the horse population in Poland. In: Timoney PJ, ed. *Proceedings of the 2nd International workshop on the diagnosis of equine arteritis virus infection*. Lexington: Maxell H. Gluck Equine Research Center, 32.

Larska M, Rola J (2008b). Molecular epizootiology of equine arteritis virus isolates from Poland. *Vet Microbiol* 127:392-8.

Legeay O, Bounaix S, Denis M et al. (1997). Development of a RT-PCR test coupled with a microplate colorimetric assay for the detection of a swine aretrivirus (PRRSV) in boar semen. *J Virol Methods* 68:65-80.

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

Létant SE, Ortiz JI, Bentley-Tammero LF et al. (2007). Multiplexed reverse transcriptase PCR assay for identification of viral respiratory pathogens at the point of care. *J Clin Microbiol* 45:3498-505.

Leutenegger CM (2001). The real-time TaqMan PCR and applications in veterinary medicine. *Veterinary Sciences Tomorrow* 1:1-15. (www.vetscite.org/issue1/txt_leut_0800.htm)

Li WH (1997). *Molecular evolution*. Sunderland: Sinauer Associates.

Li WH, Wu CI, Luo CC (1985). A new method for estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Mol Biol Evol* 2:150-74.

Lind K, Ståhlberg A, zoric N, Kubista M (2006). Combining sequence-specific probes and DNA binding dyes in real-time PCR for specific nucleic acid quantification and melting curve analysis. *Biotechniques* 40:315-9.

Little TV, Holyoak GR, McCollum WH, Timoney PJ (1992). Output of equine arteritis virus from persistently infected stallions is testosterone-dependent. In: Plowright W, Rossdale PD, Wade JF, eds. *Equine infectious diseases VI. Proceedings of the 6th international conference on equine infectious diseases*. Cambridge, 1991. Newmarket: R & W Publications, 225.

Little TV, Deregt D, McCollum WH, Timoney PJ (1995). Evaluation of an immunocytochemical method for rapid detection and identification of equine arteritis virus in natural cases of infection. In: Nakajima H, Plowright W, eds. *Equine infectious diseases VII. Proceedings of the 7th international conference on equine infectious diseases*. Tokyo, 1994. Newmarket: R & W Publications, 27-31.

Lopez JW, del Piero F, Glaser A, Finazzi M (1996). Immunoperoxidase histochemistry as a diagnostic tool for detection of equine arteritis virus antigen in formalin fixed tissues. *Equine Vet J* 28:77-9.

Lu Z, Branscum AJ, Shuck KM, Zhang J, Dubovi EJ, Timoney PJ, Balasuriya UBR (2008). Comparison of two real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for the detection of equine arteritis virus nucleic acid in equine semen and tissue culture fluid. *J Vet Diagn Invest* 20:147-55.

Lugaro G, Campagnari F, Moretti R, Casellato MM (1988). Inhibition of DNA polymerization and DNA transcription to RNA by seminal plasma peptides. *Biochim Biophys Acta* 950:420-8.

Mackay IM (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 10:190-212.

Mackay IM, Mackay JF, Nissen MD, Sloots TP (2007). Real-time PCR: history and fluorogenic chemistries. In: Mackay IM, ed. *Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization*. Wymondham: Caister Academic Press, 1-69.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 30:1292-305.

MacLachlan NJ, Balasuriya UBR (2006). Equine viral arteritis. In: Perlman S, Holmes KV, eds. *The nidoviruses: toward control of SARS and other nidovirus diseases*. Adv Exp Med Biol 581:429-33.

MacLachlan NJ, Balasuriya UBR, Rossitto PV, Hullinger PA, Patton JF, Wilson WD (1996). Fatal experimental equine arteritis virus infection in pregnant mare: cellular tropism as determined by immunohistochemical staining. *J Vet Diagn Invest* 8:367-74.

MacLachlan NJ, Balasuriya UBR, Hedges JF et al. (1998). Serologic response of horses to the structural proteins of equine arteritis virus. *J Vet Diagn Invest* 10:229-36.

Maess J, Reckzo E, Böhm HO (1970). Das Pferdearteritisvirus (equine arteritis virus): Seine Vermehrung in BHK 21-Zellen, die Bestimmung der Flotationsdichte und die elektronenoptische Darstellung. *Arch Gesamte Virusforsch* 30:47-58.

Maess J (1971). Complement dependent neutralization of equine arteritis virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 33:194-6.

Magnusson P, Hyllseth B, Marusyk H (1970). Morphological studies on equine arteritis virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 30:105-12.

Mankoč S, Barlič-Maganja D, Grom J et al. (2002). Dokazovanje virusa kužnega arteritisa kopitarjev v semenu serološko pozitivnih žrebcev. *Vet Nov* 28 (suppl. 2): 213-9.

Mankoč S, Hostnik P, Grom J et al. (2007). 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* 146:341-54.

McCollum WH, Doll ER, Wilson JC, Johnson CB (1961). Propagation of equine arteritis virus in monolayer cultures of equine kidney. *Am J Vet Res* 22:731-5.

McCollum WH, Doll ER, Wilson JC, Cheatham J (1962a). Isolation and propagation of equine arteritis virus in monolayer cell cultures of rabbit kidney. *Cornell Vet* 52:452-8.

McCollum WH, Doll ER, Wilson JC (1962b). The recovery of virus from horses with experimental cases of equine arteritis using monolayer cell cultures of equine kidney. *Am J Vet Res* 23:465-9.

McCollum WH (1969). Development of a modified virus strain and vaccine for equine viral arteritis. *J Am Vet Med Assoc* 155:318-22.

McCollum WH (1970). Vaccination for equine arteritis virus. In: Bryans JT, Gerber H, eds. *Equine infectious diseases II. Proceedings of the 2nd international conference on equine infectious diseases*. Paris, 1969. Basle: S. Karger, 143-51.

McCollum WH (1976). Studies of passive immunity in foals to equine viral arteritis. *Vet Microbiol* 1:45-54.

McCollum WH (1981). Pathological features of horses given avirulent virus intramuscularly. *Am J Vet Res* 42:1218-20.

McCollum WH (1986). Response of horses vaccinated with avirulent modified-live equine arteritis virus propagated in the E, Derm (NBL-6) cell line to nasal inoculation with virulent virus. *Am J Vet Res* 47:1931-4.

McCollum WH, Prickett ME, Bryans JT (1971). Temporal distribution of equine arteritis virus in respiratory mucosa, tissues and body fluids of horses infected by inhalation. *Res Vet Sci* 2:459-64.

McCollum WH, Bryans JT (1973). Serological identification of infection by equine arteritis virus in horses of several countries. In: Bryans JT, Gerber H, eds. *Equine infectious diseases III. Proceedings of the 3rd international conference of equine infectious diseases*. Paris, 1972. Basle: S. Karger, 256-63.

McCollum WH, Swerczek TW (1978). Studies of an epizootic of equine viral arteritis in racehorses. *Equine Vet J* 2:293-9.

McCollum WH, Timoney PJ (1984). The pathogenic qualities of the 1984 strain of equine arteritis virus. In: *Proceedings of the Grayson Foundation International Conference of Thoroughbred Breeders Organizations*. Dromoland Castle, 34-47.

McCollum WH, Timoney PJ, Roberts AW, Willard JE, Carswell GD (1988). Response of vaccinated and non-vaccinated mares to artificial insemination with semen from stallions persistently infected with equine arteritis virus. In: Powell DG, ed. Equine infectious diseases V. Proceedings of the 5th international conference on equine infectious diseases. Lexington, 1987. Lexington: University Press of Kentucky, 13-8.

McCollum WH, Little TV, Timoney PJ, Swerczek TW (1994). Resistance of castrated male horses to attempted establishment of the carrier state with equine arteritis virus. J Comp Pathol 111:383-8.

McCollum WH, Timoney PJ, Tengelson LA (1995). Clinical, virological and serological responses of donkeys to intranasal inoculations with the KY-84 strain of equine arteritis virus. J Comp Pathol 112:207-11.

McCollum WH, Timoney PJ (1999). Experimental observation on the virulence of isolates of equine arteritis virus. In: Wernery U et al., eds. Equine infectious diseases VIII. Proceedings of the 8th international conference on equine infectious diseases. Dubai, 1998. Newmarket: R & W Publications, 558-9.

McCollum WH, Timoney PJ, Lee Jr JW, Habacker PL, Balasuriya UBR, MacLachlan NJ (1999). Features of an outbreak of equine Arteritis on a breeding farm associated with abortion and fatal interstitial pneumonia in neonatal foals. In: Wernery U et al., eds. Equine infectious diseases VIII. Proceedings of the 8th international conference on equine infectious diseases. Dubai, 1998. Newmarket: R & W Publications, 559-60.

McIntosh K (1974). Coronaviruses: a comparative review. Curr Top Microbiol Immunol 63:86-129.

McKinnon AO, Colbern GT, Collins JK, Bowen RA, Voss JL, Umphenour JW (1986). Vaccination of stallions with a modified live equine arteritis virus vaccine. J Equine Vet Sci 6:66-9.

Meulenbergh JJ, Hulst MM, de Meijer et al. (1994). Lelystad virus belongs to a new virus family, comprising lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus. Arch Virol Suppl 9:441-8.

Minke JM, Audonnet JC, Fischer L (2004). Equine viral vaccines: the past, present and future. Vet Res 35:425-43.

Mittelholzer C, Stadejek T, Johansson I et al. (2006). Extended phylogeny of equine Arteritis virus: division into new subgroups. J Vet Med B 53:55-8.

Moore BD, Balasuriya UBR, Hedges JF, MacLachlan NJ (2002). Growth characteristics of a highly virulent, a moderately virulent, and an avirulent strain of equine arteritis virus in primary equine endothelial cells are predictive of their virulence to horses. Virology 298:39-44.

Moore BD, Balasuriya UBR, Nurton JP et al. (2003a). Differentiation of strains of equine arteritis virus of differing virulence to horses by growth in equine endothelial cells. *Am J Vet Res* 64:779-84.

Moore BD, Balasuriya UBR, Watson JL, Bosio CM, MacKay RJ, MacLachlan NJ (2003b). Virulent and avirulent strains of equine arteritis virus induce different quantities of TNF- α and other proinflammatory cytokines in alveolar and blood-derived equine macrophages. *Virology* 314:662-70.

Moraillon R, Moraillon A (1978). Results of an epidemiological investigation on viral arteritis in France and some other European and African countries. *Ann Rech Vet* 9:43-54.

Moreland JL, Gramada A, Buzko OV, Zhang Q, Bourne PE (2005). The molecular biology toolkit (MBT): a molecular platform for developing molecular visualization applications. *BMC Bioinformatics* 6:21.

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR[®] green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24:954-62.

Mullis KB (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262:56-61, 64-5.

Mumford JA (1985). Preparing for equine arteritis. *Equine Vet J* 17:6-11.

Murphy TW, Timoney PJ, McCollum WH (1988). Analysis of genetic variation among strains of equine arteritis virus. In: Powell DG, ed. *Equine infectious diseases V. Proceedings of the 5th international conference on equine infectious diseases*. Lexington, 1987. Lexington: University Press of Kentucky, 3-12.

Murphy TW, McCollum WH, Timoney PJ et al. (1992). Genomic variability among globally distributed isolates of equine arteritis virus. *Vet Microbiol* 32:101-15.

Neu SM, Timoney PJ, McCollum WH (1988). Persistent infection of the reproductive tract in stallions persistently infected with equine arteritis virus. In: Powell DG, ed. *Equine infectious diseases V. Proceedings of the 5th international conference on equine infectious diseases*. Lexington, 1987. Lexington: University Press of Kentucky, 149-54.

Newman CM, Cohen JE, Kipnis C (1985). New-darwinian evolution implies punctuated equilibria. *Nature* 315:400-1.

Newton JR, Wood JLN, Castillo-Olivares FJ, Mumford JA (1999). Serological surveillance of equine viral arteritis in the United Kingdom since the outbreak in 1993. *Vet Rec* 145:511-6.

Nitsche A, Steuer N, Schmidt CA et al. (2000). Detection of human cytomegalovirus DNA by real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 38:2734-7.

Nitsche A (2007). Oligonucleotide design for in-house real-time PCR: applications in microbiology. In: Mackay IM, ed. Real time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization. Wymondham: Caister Academic Press, 41-69.

Nowak MA (1992). What is quasispecies? Trends Ecol Evol 7:118-21.

Nugent J, Sinclair R, de Vries AAF et al. (2000). Development and evaluation of ELISA procedures to detect antibodies against the major envelope protein (G_L) of equine arteritis virus. J Virol Methods 90:167-83.

Odredba o izvajanju preventivnih cepljenj in diagnostičnih ter drugih preiskav v letu 2002 (2002). Ur List RS 12 (6):527-30.

OIE (2004). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5th ed. Paris: OIE, World organisation for animal health, 725-736.

Ostlund EN, Peters JC, Stoker AM, McCollum WH, Timoney PJ (1997). Enhancement of cell culture growth of two arteriviruses by carboxymethyl cellulose overlay. In: Proceedings of the Annual meeting of the American association of veterinary laboratory diagnosticians. Louisville, 33.

Page RD (1996). TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput Appl Biosci 12:357-8.

Pasternak AO, van den Born E, Spaan WJ, Snijder EJ (2001). Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. EMBO J 20:7220-8.

Pasternak AO, van den Born E, Spaan WJM, Snijder EJ (2003). The stability of the duplex between sense and antisense transcription-regulating sequences is a crucial factor in arterivirus subgenomic mRNA synthesis. J Virol 77:1175-83.

Pasternak AO, Spaan WJM, Snijder EJ (2006). Nidovirus transcription: how to make sense...? J Gen Virol 87:1403-21.

Patton JF, Balasuriya UBR, Hedges JF, Schweidler TM, Hullinger PJ, MacLachlan NJ (1999). Phylogenetic characterization of a highly attenuated strain of equine arteritis virus from the semen of a persistently infected standardbred stallion. Arch Virol 144:817-27.

Paweska JT (1994). Equine viral arteritis in donkeys in South Africa. J S Afr Vet Assoc 65:40.

Paweska JT, Barnard BJH (1993). Serological evidence of equine arteritis virus in donkeys in South Africa. Onderstepoort J Vet Res 60:155-8.

Paweska JT, Volkmann DH, Barnard BJH, Chirnside ED (1995). Sexual and in-contact transmission of asinine strain of equine arteritis virus among donkeys. J Clin Microbiol 33:3296-9.

Paweska JT, Binns MM, Woods PSA, Chirnside ED (1997). A survey for antibodies to equine arteritis virus in donkeys, mules and zebra using virus neutralisation (VN) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Equine Vet J* 29:40-3.

Pedersen KW, van der Meer Y, Roos N, Snijder EJ (1999). Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. *J Virol* 73:2016-26.

Plagemann PGW (1996). Lactate dehydrogenase-elevating virus and related viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al., eds. *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1105-20.

Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* 8:3867-74.

Porterfield JS, Casas J, Chumakov MP et al. (1978). *Togaviridae*. *Intervirology* 9:129-48.

Posada D, Crandall KA (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-8.

Posthuma CC, Nedialkova DD, Zevenhoven-Dobbe JC, Blokhuis JH, Gorbalenya AE, Snijder EJ (2006). Site-directed mutagenesis of the nidovirus replicative endoribonuclease NendoU exerts pleiotropic effects on the arterivirus life cycle. *J Virol* 80:1653-61.

Pottie A (1888). The propagation of influenza from stallions to mares. *J Comp Pathol* 1:37-38.

Pravilnik o splošnih in posebnih ukrepih pri kužnem arteritisu kopitarjev (*Arteritis equi*) (2005). *Ur List RS* 15 (75):8001-3.

Pravilnik o spremembi Pravilnika o splošnih in posebnih ukrepih pri kužnem arteritisu kopitarjev (*Arteritis equi*) (2005). *Ur List RS* 15 (94):9843.

Pravilnik o rutinskih diagnostičnih preiskavah in načinu zdravljenja žrebcev v odobrenih osemenjevalnih središčih (2000). *Ur List RS* 10 (116):11890-3.

Pravilnik o pogojih, pod katerimi se lahko daje živalsko seme v promet (2000). *Ur List RS* 10 (71):8874-8.

Pravilnikom o pogojih in trajanju karantene za uvožene živali, valilna jajca, živalsko seme, jajčne celice in zarodke (1999). *Ur List RS* 9 (55):6962-3.

Pravilnik o veterinarskih pogojih za premike kopitarjev med državami članicami EU in uvozu kopitarjev iz tretjih držav (2004). *Ur List RS* 14 (21):2417-21.

Prickett ME, McCollum WH, Bryans JT (1973). The gross and microscopic pathology in horses experimentally infected with equine arteritis virus. In: Bryans JT, Gerber H, eds.

Equine infectious diseases III. Proceedings of the 3rd international conference on equine infectious diseases. Paris, 1972. Basle: S. Karger, 265-72.

Pringle CR (1996). Virus taxonomy 1996- a bulletin from the 10th International congress of virology in Jerusalem. Arch Virol 141:2251-6.

Radwan AI, Burger D (1973a). The complement-requiring neutralization of equine arteritis virus by late antisera. Virology 51:71-7.

Radwan AI, Burger D (1973b). The role of sensitizing antibody in the neutralization of equine arteritis virus by complement or anti IgG serum. Virology 53:366-71.

Radwan AI, Burger D, Davis WC (1973). The fate of sensitized equine arteritis virus. Virology 53:372-8.

Radwan AI, Crawford TB (1974). The mechanism of neutralization of sensitized aretritis virus by complement components. J Gen Virol 25:229-37.

Ramina A, Dalla Valle L, DeMasin S et al. (1999). Detection of equine arteritis virus in semen by reverse transcriptase polymerase chain reaction-ELISA. Comp Immun Microbiol Infect Dis 22:187-97.

Reed LJ, Muench H (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg 27:493-7.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997). Product differentiation of by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem 245:154-60.

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19:1572-4.

Roth J, Taatjes DJ, Lucocq JM, Weinstein J, Paulson JC (1985). Demonstration of an extensive trans-tubular network continuous with the Golgi apparatus stack that may function in glycosilation. Cell 43:287-95.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230:1350-4.

Saitou N, Nei M (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4:406-25.

Sawicki SG, Sawicki DL (1995). Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenomic-length negative strands. Adv Exp Biol Med 380:499-506.

Sawicki DL, Wang T, Sawicki SG (2001). The RNA structures engaged in replication and transcription of the A59 strain of mouse hepatitis virus. J Gen Virol 82:385-96.

Sekiguchi K, Sugita S, Fukunaga Y et al. (1995). Detection of equine arteritis virus (EAV) by polymerase chain reaction (PCR) and differentiation of EAV strains by restriction enzyme analysis of PCR products. *Arch Virol* 140:1483-91.

Senne DA, Pearson JE, Carbrey EA (1985). Equine viral arteritis: a standard procedure for the virus neutralization test and comparison of results of a proficiency test performed at five laboratories. In: *Proceedings of the 89th Annual meeting of the United States Animal Health Association*. Milwaukee, Wisconsin, 29-34.

Seybert A, van Dinten LC, Snijder EJ, Ziebuhr J (2000). Biochemical characterization of the equine arteritis virus helicase suggests a close functional relationship between arterivirus and coronavirus helicases. *J Virol* 74:9586-93.

Snijder EJ, den Boon JA, Bredenbeek PJ et al. (1990). The carboxyl-terminal part of the putative Berne virus polymerase is expressed by ribosomal frameshifting and contains sequence motifs which indicate that toro- and coronaviruses are evolutionary related. *Nucleic Acids Res* 18:4535-42.

Snijder EJ, Wassenaar ALM, Spaan WJM (1992). The 5' end of the equine arteritis virus replicase gene encodes a papinlike cysteine protease. *J Virol* 66:7040-8.

Snijder EJ, Horzinek MC (1993). Toroviruses: replication, evolution and comparison with other members of the coronavirus-like superfamily. *J Gen Virol* 74:2305-16.

Snijder EJ, Wassenaar ALM, Spaan WJM (1994). Proteolytic processing of the replicase ORF1a protein of equine arteritis virus. *J Virol* 68:5755-64.

Snijder EJ, Wassenaar ALM, Spaan WJM, Gorbalenya AE (1995). The arterivirus nsp2 protease: an unusual cysteine protease with primary structure similarities to both papain-like and chymotrypsin-like proteases. *J Biol Chem* 270:16671-6.

Snijder EJ, Wassenaar ALM, van Dinten LC, Spaan WJM, Gorbalenya AE (1996). The arterivirus nsp4 protease is the prototype of a novel group of chymotrypsin-like enzymes, the 3C-like serine proteases. *J Biol Chem* 271:4864-71.

Snijder EJ, Meulenberg JJM (1998). The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* 79:961-79.

Snijder EJ, Meulenberg JJM (2001). Arteriviruses. In: Knipe ED, Howley PM, eds. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1205-20.

Snijder EJ, van Tol H, Pedersen KW, Raamsman MJB, de Vries AAF (1999). Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *J Virol* 73:6335-45.

Snijder EJ, Dobbe JC, Spaan WJM (2003). Heterodimerization of the two major envelope proteins is essential for arterivirus infectivity. *J Virol* 77:97-104.

Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, Vandepol S (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215:1577-85.

Srinivasan K, Morris SC, Girard JE, Kline MC, Reeder DJ (1993). Enhanced detection of PCR products through use of TOTO and YOYO intercalating dyes with laser induced fluorescence-capillary electrophoresis. *Appl Theor Electrophor* 3:235-9.

Stadejek T, Bjorklund H, Bascunana CR et al. (1999). Genetic diversity of equine arteritis virus. *J Gen Virol* 80:691-9.

Starick E (1998). Rapid and sensitive detection of equine arteritis virus in semen and tissue samples by reverse transcription-polymerase chain reaction, dot blot hybridisation and nested polymerase chain reaction. *Acta Virol* 42:333-9.

Steinhauer DA, Holland JJ (1987). Rapid evolution of RNA viruses. *Ann Rev Microbiol* 41:328-35.

Steinhauer D, Domingo E, Holland JJ (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* 122:281-8.

St-Laurent G, Morin G, Archambault D (1994). Detection of equine arteritis virus following amplification of structural and non-structural viral genes by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 32:658-65.

St-Laurent G, Lepage N, Carman S, Archambault D (1997). Genetic and amino acid analysis of the GL protein of Canadian, American and European equine arteritis virus isolates. *Can J Vet Res* 61:72-6.

St-Louis MC, Archambault D (2007). The equine arteritis virus induces apoptosis via caspase-8 and mitochondria-dependent caspase-9 activation. *Virology* 367:147-55.

Stryer L, Haugland RP (1967). Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci USA* 58:719-26.

Szeredi L, Hornyák A, Dénes B, Rusvai M (2003). Equine viral Arteritis in a newborn foal: parallel detection of the virus by immunohistochemistry, polymerase chain reaction and virus isolation. *J Vet Med B* 50:270-4.

Szeredi L, Hornyák A, Pálfi V, Molnár T, Glávits R, Dénes B (2005). Study on the epidemiology of equine arteritis virus infection with different diagnostic techniques by investigating 96 cases of equine abortion in Hungary. *Vet Microbiol* 108:235-42.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-9.

Tang YW, Procop GW, Persing DH (1997). Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem* 43:2021-38.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997). The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24:4876-82.

Tijms MA, van Dinten LC, Gorbalenya AE, Snijder EJ (2001). A zinc finger-containing papain-like protease couples subgenomic mRNA synthesis to genome translation in a positive-stranded RNA virus. *Proc Natl Acad Sci* 98:1889-94.

Timoney PJ (1985). Clinical, virological and epidemiological features of the 1984 outbreak of equine viral arteritis in the Thoroughbred population in Kentucky, USA. In: *Proceedings of the Grayson Foundation International Conference of Thoroughbred Breeders Organizations*. Dromoland Castle, 24-33.

Timoney PJ, McCollum WH (1985). The epidemiology of equine arteritis virus. *Proc Am Assoc Equine Pract* 31:545-51.

Timoney PJ, McCollum WH, Roberts AW, Murphy TW (1986a). Demonstration of the carrier state in naturally acquired equine arteritis virus infection in the stallion. *Res Vet Sci* 41:279-80.

Timoney PJ, McCollum WH, Roberts AW (1986b). Detection of the carrier state in stallions persistently infected with equine arteritis virus. *Proc Am Assoc Equine Pract* 32:57-65.

Timoney PJ, McCollum WH, Murphy TW, Roberts AW, Willard AW, Carswell JG (1987a). The carrier state in equine arteritis virus infection in the stallion with specific emphasis on the venereal mode of transmission. *J Reprod Fertil* 35:95-102.

Timoney PJ, McCollum WH, Roberts AW, McDonald MJ (1987b). Status of equine arteritis virus in Kentucky. *J Am Vet Med Assoc* 191:36-9.

Timoney PJ, McCollum WH (1987). Equine viral arteritis. *Can Vet J* 28:693-5.

Timoney PJ, McCollum WH (1988). Equine viral arteritis: epidemiology and control. *J Equine Vet Sci* 8:54-9.

Timoney PJ, Umphenour NW, McCollum WH (1988). Safety evaluation of a commercial modified live equine arteritis virus vaccine for use in stallions. In: Powell DG, ed. *Equine infectious diseases V. Proceedings of the 5th international conference on equine infectious diseases*. Lexington, 1987. Lexington: University Press of Kentucky, 19-27.

Timoney PJ, McCollum WH (1990). Equine viral arteritis: current clinical and economic significance. *Proc Am Assoc Equine Pract* 36:403-9.

Timoney PJ, McCollum WH (1993). Equine viral arteritis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 9:295-309.

Timoney PJ, McCollum WH (1997). Equine viral arteritis: essential facts about. In: *Proceedings of the 43rd Annual Convention of the American Association of Equine*

Practitioners. Phoenix, Arizona, 199-201. www.ivis.org/proceedings/aaep/1997/cover.pdf (15.01.2010).

Timoney PJ, McCollum WH (2000). Equine viral arteritis: further characterization of the carrier state in the stallion. *J Reprod Fertil* 56:3-11.

Timoney PJ (2002). Equine viral arteritis. In: Lekeux P, ed. Equine respiratory diseases. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA (2. april 2002). www.ivis.org/special_books/Lekeux/timoney/chapter-frm.asp?LA-1

Timoney PJ, Bruscer CA, McCollum WH, Holyoak GR, Little TV (2004). Comparative sensitivity of LLC-MK₂, RK-13, vero and dermis cell lines for primary isolation and propagation of equine arteritis virus. In: Timoney PJ, ed. Proceedings of the International Workshop on the Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection. Lexington, Kentucky, 26-7.

Timoney PJ, Creekmore L, Meade B, Fly D, Rogers E, King B (2006). Multi-state occurrence of EVA. Report of the Committee on infectious diseases of horses: addressing equine viral arteritis in United States. In: Proceedings of the one-hundred tenth annual meeting of the united states animal health association. Minneapolis, Minnesota: Pat Campbell & Associates and Spectrum Press, 354-62.

Tobiasch E, Kehm R, Bahr U (2001). Large envelope glycoprotein and nucleocapsid protein of equine arteritis virus (EAV) induce an immune response in Balb/c mice by DNA vaccination; strategy for developing a DNA-vaccine against EAV-infection. *Virus Genes* 22:187-99.

Vaala WE, Hamir AN, Dubovi E, Timoney PJ, Ruiz B (1992). Fatal, congenitally acquired equine arteritis virus infection in a neonatal Thoroughbred. *Equine Vet J* 24:155-8.

Valasek MA, Repa JJ (2005). The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 29:151-9.

van Aken D, Zevenhoven-Dobbe J, Gorbalenya AE, Snijder EJ (2006). Proteolytic maturation of replicase polyprotein pp1a by the nsp4 main proteinase is essential for equine arteritis virus replication and includes internal cleavage of nsp7. *J Gen Virol* 87:3473-82.

van Berlo MF, Horzinek MC, van der Zeijst BAM (1980). Temperature-sensitive mutants of equine arteritis virus. *J Gen Virol* 49:97-104.

van Berlo MF, Horzinek MC, van der Zeijst BAM (1982). Equine arteritis virus-infected cells contain six polyadenylated virus-specific RNAs. *Virology* 118:345-52.

van Berlo MF, Rottier PJM, Horzinek MC, van der Zeijst BAM (1986a). Intracellular equine arteritis virus (EAV)-specific RNAs contain common sequences. *Virology* 152:492-6.

van Berlo MF, Rottier PJM, Spaan WJM, Horzinek MC (1986b). Equine arteritis virus (EAV) induced polypeptide synthesis. *J Gen Virol* 67:1543-9.

van der Meer Y, van Tol H, Krinse Locker J, Snijder EJ (1998). ORF1a-encoded replicase subunits are involved in the membrane association of the arterivirus replication complex. *J Virol* 72: 6689-98.

van der Zeijst BA, Horzinek MC (1975). The genome of equine arteritis virus. *Virology* 68:418-25.

van Dinten LC, Wassenaar ALM, Gorbalenya EA, Spaan WJM, Snijder EJ (1996). Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b protein: identification of cleavage products containing the putative viral polymerase and helicase domains. *J Virol* 70:6625-33.

van Dinten LC, den Boon JA, Wassenaar ALM, Spaan WJM, Snijder EJ (1997). An infectious arterivirus cDNA clone: identification of a replicase point mutation which abolishes discontinuous mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:991-6.

van Dinten LC, Rensen S, Gorbalenya EA, Snijder EJ (1999). Proteolytic processing of the open reading frame 1b-encoded part of arterivirus replicase is mediated by NSP4 serine protease and is essential for virus replication. *J Virol* 73:2027-37.

van Dinten LC, van Tol H, Gorbalenya EA, Snijder EJ (2000). The predicted metal-binding region of the arterivirus helicase protein is involved in subgenomic mRNA synthesis, genome replication, and virion biogenesis. *J Virol* 74:5213-23.

van Marle G, Dobbe JC, Gultyaev AP, Luytjes W, Spaan WJ, Snijder EJ (1999). Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by pairing by sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proc Natl Acad Sci* 96:12056-61.

van Valen L (1973). A new evolutionary law. *Evol Theory* 1:1-30.

Vernazza PL, Eron JJ, Fiscus SA (1996). Sensitive method for the detection of infectious HIV in semen of seropositive individuals. *J Virol Methods* 56:33-40.

Vigerust DJ, Shepherd VL (2007). Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends Microbiol* 15:211-8.

Wagner HM, Balasuriya UB, MacLachlan JN (2003). The serologic response of horses to equine arteritis virus as determined by competitive enzyme-linked immunosorbent assay (c-ELISAs) to structural and non-structural viral proteins. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 26:251-60.

Wassenaar ALM, Spaan WJ, Gorbalenya EA, Snijder EJ (1997). Alternative proteolytic processing of the arterivirus replicase ORF1a polypeptide: evidence that NSP2 acts as a cofactor for the NSP4 serine protease. *J Virol* 71:9313-22.

Watzinger F, Ebner K, Lion T (2006). Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol Aspects Med* 27:254-98.

Wege H, Siddell S, Ter Meulen V (1982). The biology and pathogenesis of coronaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 99:165-200.

Weiland E, Bolz S, Weiland F et al. (2000). Monoclonal antibodies directed against conserved epitopes on the nucleocapsid protein and the major envelope glycoprotein of equine arteritis virus. *J Clin Microbiol* 38:2065-75.

Weiss M, Ferrari L, Weibel-Attenberg P et al. (1995). Equine arteritis virus in Switzerland: a seroepidemiological survey. In: Nakajima H, Plowright W, eds. *Equine infectious diseases VII. Proceedings of the 7th international conference on equine infectious diseases*. Tokyo, 1994. Newmarket: R & W Publications: 45-51.

Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich Y et al. (1985). *Togaviridae*. *Intervirology* 24:125-39.

Westcott D, Lucas MH, Paton DJ (1995). Equine arteritis virus: antigenic analysis of strain variation. In: Schwyzer M, Ackermann MR, eds. *Proceedings of the 3rd congress of the European society of veterinary virology*. Lyon: Foundation Marcel Merieux, 479-83.

Westcott DG, King DP, Drew TW et al. (2003). Use of an internal standard in a closed one-tube RT-PCR for the detection of equine arteritis virus RNA with fluorescent probes. *Vet Res* 34:165-76.

Whalen JW, Hall VL, Srinivasappa J, Ross C, Eichmeyer M, Chu S (1998). An inactivated vaccine prevents persistent equine arteritis virus infection in stallions. In: Wernery U et al., eds. *Equine infectious diseases VIII. Proceedings of the 8th international conference on equine infectious diseases*. Dubai, 1998. Newmarket: R & W Publications, 595.

Whiley DM, Sloots TP (2005). Sequence variation can affect the performance of minor groove binder TaqMan probes in viral diagnostic assays. *J Clin Virol* 34:104-7.

Wieringa R, de Vries AAF, Raamsman MJB, Rottier PJM (2002). Characterization of two new structural glycoproteins, GP₃ and GP₄, of equine arteritis virus. *J Virol* 76:10829-40.

Wieringa R, de Vries AAF, Rottier PJM (2003). Formation of disulfide-linked complexes between the three minor envelope glycoproteins (GP_{2b}, GP₃ and GP₄) of equine arteritis virus. *J Virol* 77:6216-26.

Wieringa R, de Vries AAF, van der Muelen J, Godeke GJ, Onderwater JJM, van Tol H et al. (2004). Structural protein requirements in equine arteritis virus assembly. *J Virol* 78:13019-27.

Wilkins PA, Del Piero F, Lopez J, Cline M (1995). Immunohistochemical diagnosis of equine arteritis infection in a foal. *Equine Vet J* 27:398.

Wilson JC, Doll ER, McCollum WH, Cheatham J (1962). Propagation of equine arteritis virus previously adapted to cell cultures of equine kidney in monolayer cultures of hamster kidney. *Cornell Vet* 52:200-5.

Wittwer CT, Fillmore GC, Garling DJ (1990). Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Anal Biochem* 286:328-31.

Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RW, David DA, Gundry RA, Balis UJ (1997a). The LightCycler™: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 22:176-81.

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997b). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22:130-8.

Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16:97-159.

Wright S (1982). Character change, speciation, and the higher taxa. *Evolution* 36:427-43.

Xia X, Xie Z (2001). DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* 92:371-3.

Yamaguchi S, Kanno T, Akashi H, Kondo T (1997). Identification of two neutralization sites in G_L protein of equine arteritis virus by means of monoclonal antibodies. *J Equine Sci* 8:7-11.

Yao Y, Nellåker C, Karlsson H (2006). Evaluation of minor groove binding probe and TaqMan probe PCR assays. Influence of mismatches and template complexity on quantification. *Mol Cell Probes* 20:311-6.

Zakrzewska K, Pullman B (1986). Spermine-nucleic acid interactions: a theoretical study. *Biopolymers* 25:375-92.

Zeegers JJW, van der Zeijst BAM, Horzinek MC (1976). The structural proteins of equine arteritis virus. *Virology* 73:200-5.

Zeibuhr J, Snijder EJ, Gorbalenya AE (2000). Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the *Nidovirales*. *J Gen Virol* 81:853-79.

Zevenhoven-Dobbe JC, Greve S, van Tol H, Spaan WJM, Snijder EJ (2004). Rescue of disabled infectious single-cycle (DISC) Equine arteritis virus by using complementing cell lines that express minor structural glycoproteins. *J Gen Virol* 85:3709-14.

Zhang J, Miszczak F, Pronost S et al. (2007). Genetic variation and phylogenetic analysis of 22 French isolates of equine arteritis virus. *Arch Virol* 152:1977-94.

Zhang J, Go YY, MacLachlan NJ, Meade BJ, Timoney PJ, Balasuriya UBR (2008). Amino acid substitutions in the structural or non-structural proteins of vaccine strain of equine arteritis virus are associated with its attenuation. *Virology* 378: 355-62.

Zeibuhr J, Snijder EJ, Gorbalenya AE (2000). Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the *Nidovirales*. *J Gen Virol* 81:853-79.

9. PRILOGE

Priloga A: Izvidi viroloških preiskav vzorcev semena iz reje A, ki smo jih poslali v analizo v laboratorij Dr. Böse GmbH (Harsum, Nemčija).



Labor Dr. Böse GmbH • Carl-Zeiss-Str. 6 • D-31177 Harsum, Germany

University of Ljubljana
Institute for microbiology and parasitology
Gerbičeva 60
1000 Ljubljana
SLOVENIA

Kd-Nr. / customer ID: 24552
Tel.: 00386-1-4779100
Fax: 00386-1-2832243
Faxkopie an / fax copy to:
Sara Mankoc

150-06

Untersuchungsbericht - Endbefund (final record) Nr. 616777 Harsum, den 8.12.2006

Identifik. d. Tieres / animal:	2123/06-1	Geschlecht / sex:	Hengst / stallion
Besitzer / owner:	not given	geb. / born:	not given
Auftraggeber / remitter:	University of Ljubljana	Entnahme / sampling:	
	Institute for microbiology and parasitology	Eingang / received:	17.10.2006 11:30

Vorbericht:

Probe/sample	Material	Untersuchung / examination	Ergebnis / result
616777-1	Sperma	Virusantigenis EVA, Virus isolation, (artériente virale équine AVE)	POSITIV
616777-1	Sperma	Virusantigenis EVA, PCR, (artériente virale équine, AVE)	POSITIV

Ende der Ergebnismitteilung, end of results reported

Kommentar zum Bericht, comment:

Please take note that this diagnosis might cause a legal obligation to report this case to veterinary officials in your country.

Für die Richtigkeit:
veterinarian in charge

Faxmitteilungen werden nicht unterschrieben.
Fax messages will not be signed.

260-06

Untersuchungsbericht - Endbefund (final record) Nr. 616780 Harsum, den 8.12.2006

Identifik. d. Tieres / animal:	2123/06-8	Geschlecht / sex:	Hengst / stallion
Besitzer / owner:	not given	geb. / born:	not given
Auftraggeber / remitter:	University of Ljubljana	Entnahme / sampling:	
	Institute for microbiology and parasitology	Eingang / received:	17.10.2006 11:30

Vorbericht:

Probe/sample	Material	Untersuchung / examination	Ergebnis / result
616780-1	Sperma	Virusantigenis EVA, Virus isolation, (artériente virale équine AVE)	POSITIV
616780-1	Sperma	Virusantigenis EVA, PCR, (artériente virale équine, AVE)	POSITIV

282-06

Untersuchungsbericht - Endbefund (final record) Nr. 616779 Harsum, den 8.12.2006

Identifik. d. Tieres / animal:	2123/06-6	Geschlecht / sex:	Hengst / stallion
Besitzer / owner:	not given	geb. / born:	not given
Auftraggeber / remitter:	University of Ljubljana	Entnahme / sampling:	
	Institute for microbiology and parasitology	Eingang / received:	17.10.2006 11:30

Vorbericht:

Probe/sample	Material	Untersuchung / examination	Ergebnis / result
616779-1	Sperma	Virusantigenis EVA, Virus isolation, (artériente virale équine AVE)	POSITIV
616779-1	Sperma	Virusantigenis EVA, PCR, (artériente virale équine, AVE)	POSITIV

388-06

Untersuchungsbericht - Endbefund (final record) Nr. 616778 Harsum, den 8.12.2006

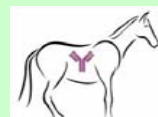
Identifik. d. Tieres / animal:	2123/06-3	Geschlecht / sex:	Hengst / stallion
Besitzer / owner:	not given	geb. / born:	not given
Auftraggeber / remitter:	University of Ljubljana	Entnahme / sampling:	
	Institute for microbiology and parasitology	Eingang / received:	17.10.2006 11:30

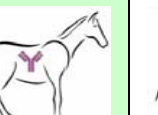
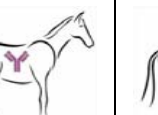
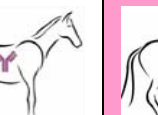
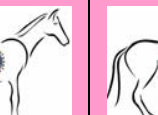
Vorbericht:

Probe/sample	Material	Untersuchung / examination	Ergebnis / result
616778-1	Sperma	Virusantigenis EVA, Virus isolation, (artériente virale équine AVE)	POSITIV
616778-1	Sperma	Virusantigenis EVA, PCR, (artériente virale équine, AVE)	POSITIV

Priloga B: Razporeditev žrebcev iz reje A po posameznih boksih v hlevu NHL.

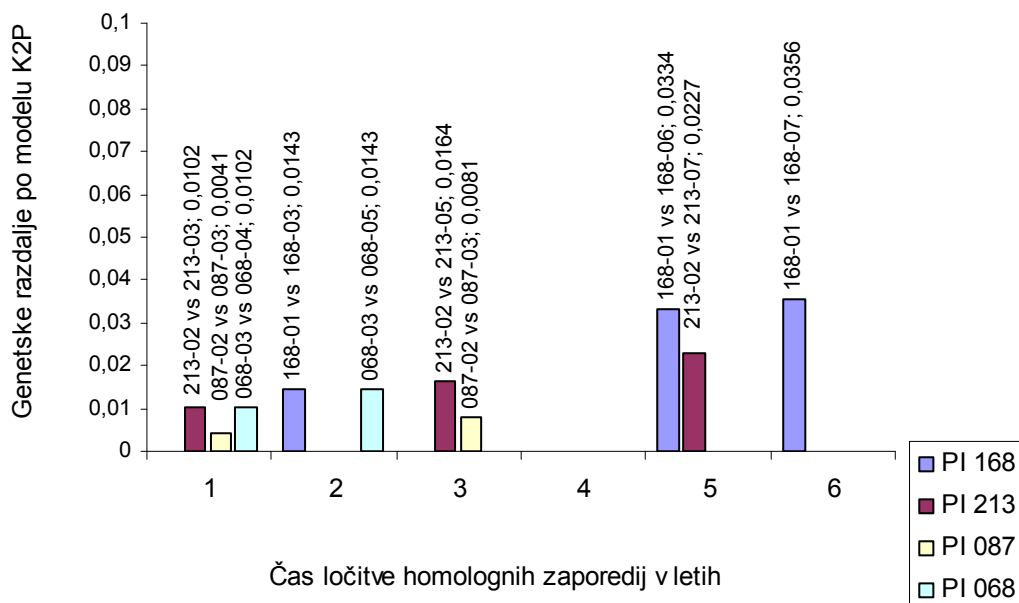
087	261	191	042	085	174	
						

068	183	204	310	363	188	303	233	388
								
884	127	179	034	144	222	357	190	327
								

131	076	072	063	146	119	358	840	122	L344
									

Slika B: Tloris hleva NHL.

Priloga C: Genetske razdalje med homolognimi virusi EAV, ki smo jih določili v zaporednih vzorcih semena žrebcev iz reje A.



Slika C: Stolpični grafikon prikazuje časovno spreminjanje genetskih razdalj, ki smo jih izračunali po Kimurovem dvoparametričnem modelu (K2P) nukleotidne zamenjave.

Priloga D: Testiranje ničelne hipoteze L_0 o molekularni uri s testom razmerja dveh verjetij (LRT (Δ) – »likelihood ratio test«), ki se porazdeljuje po hi-kvadrat porazdelitvi (χ^2_α).

Ničelna hipoteza L_0 : HKY85+G+I+molekularna ura

Log verjetja (-Ln likelihood) modela z molekularno uro, ki smo ga izračunali s programom PAUP* (verzija 4.0b10):

Likelihood scores of tree(s) in memory:
Likelihood settings:
Number of substitution types = 2 (HKY85 variant)
Transition/transversion ratio = 3.3 (kappa = 6.6043402)
Assumed nucleotide frequencies (set by user):
A=0.23720 C=0.21930 G=0.19620 T=0.34730
Among-site rate variation:
Assumed proportion of invariable sites = 0.3646
Distribution of rates at variable sites = gamma (discrete approximation)
Shape parameter (alpha) = 0.6857
Number of rate categories = 4
Representation of average rate for each category = mean
These settings correspond to the HKY85+G+I model
Number of distinct data patterns under this model = 174
Molecular clock enforced
Starting branch lengths obtained using UPGMA-style averaging
Parameterization for clock optimization = "Rambaut"
-ln L (unconstrained) = 1697.98931

Tree number 1:

-Ln likelihood = 3223.52281

Alternativna hipoteza L_1 : HKY85+G+I

Log verjetja modela brez molekularne ure, ki smo ga dobili s hierarhičnim testom hLRT, v programu Modeltest:

HIERARCHICAL LIKELIHOOD RATIO TESTS (hLRTs)
Model selected: HKY+I+G
-lnL = 3008.3970
K = 6
Base frequencies:
freqA = 0.2372
freqC = 0.2193
freqG = 0.1962
freqT = 0.3473
Substitution model:
Ti/tv ratio = 3.3000
Among-site rate variation
Proportion of invariable sites (I) = 0.3646
Variable sites (G)
Gamma distribution shape parameter = 0.6857

Testiranje hipoteze

$$\Delta = 2 * (\ln L_1 - \ln L_0)$$

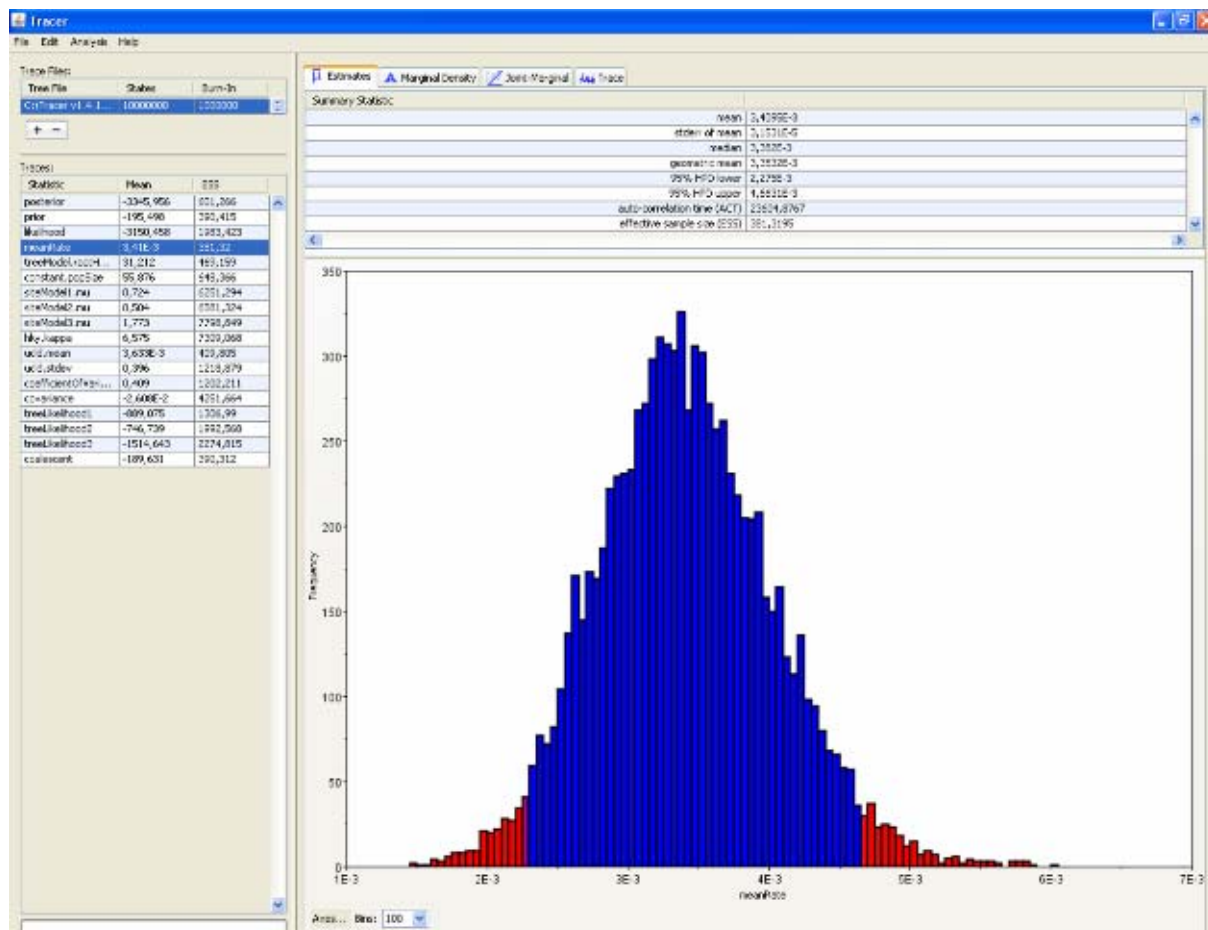
$$\Delta = 2 * (-3008.3970 + 3223.52281)$$

$$\Delta = 2 * 215.13$$

$$\Delta = 430.26$$

Testna statistika hi-kvadrat ima vrednost 430,26 (χ^2_α), stopnje prostosti so enake 37, tveganje je z manj kot 0 % ($p < 0,000001$). Rezultat smo spoznali za statistično pomemben, saj smo lahko ničelno hipotezo ovrgli z manj kot 5-odstotnim tveganjem ($p < 0,05$).

Priloga E: Hitrost evolucije, ki smo jo na podlagi evlucijskega modela HKY pri vseh 39 kraških zaporedij ORF5 ugotovili s programom Beast v1.4.8.



Slika E: Grafični prikaz rezultatov s programom Tracer v1.4.1.

Priloga F: Izvirni znanstveni članek, ki je bil objavljen v reviji Journal of Virological Methods, Vol. 146/1-2 (2007) 341-54.

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

S. Mankoč^{a,*}, P. Hostnik^a, J. Grom^a, I. Toplak^a, I. Klobučar^b, M. Kosec^b, D. Barlič-Maganja^a

^a Virology Unit, Institute for Microbiology and Parasitology, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva 60, SI-1115 Ljubljana, Slovenia

^b Clinic for Reproduction and Horses, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva 60, 1115 Ljubljana, Slovenia

Received 25 April 2007; received in revised form 23 July 2007; accepted 24 July 2007

Available online 12 September 2007

Abstract

In the present study, a new one-step real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) strategy with minor-groove-binder (MGB) technology for the detection of EAV from 40 semen samples of Slovenian carrier stallions was tested. A novel MGB probe (EAVMGBpr) and a reverse primer (EAV-R) based on the multiple sequence alignment of 49 different EAV strain sequences of the highly conserved ORF7 (nucleocapsid gene) were designed. The performance of the assay was compared with different molecular detection methods. Three different primer pairs targeting the ORF1b and ORF7 were used, respectively. The real-time RT-PCR assay was at least 2 log₁₀ more sensitive than the classical RT-PCR and at least 1 log₁₀ more sensitive than the primer set used in the semi-nested PCR. The specificities of the amplification reactions were confirmed with biotinylated probes in the PCR-enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA). Under the conditions described in our study, the sensitivity of the real-time RT-PCR was found to be superior to the PCR-ELISA assay. Thus, while the PCR-ELISA method was found to be both relatively demanding and time consuming, better sensitivity coupled with high specificity and speed of the assay makes the real-time RT-PCR a valuable tool for diagnosis of EAV infection.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Equine arteritis virus (EAV); Carrier stallion; Detection; Real-time RT-PCR; Minor-groove-binder probe (MGB)

1. Introduction

Equine arteritis virus (EAV) is a positive single-stranded RNA virus in the family *Arteriviridae*, order *Nidovirales* (Cavanagh, 1997). The EAV genome consists of a single positive-stranded RNA, containing nine open reading frames (ORFs) (Snijder et al., 1999).

EAV is spread by both the respiratory and venereal routes (Timoney and McCollum, 1993). The most important economic losses attributable to the infection with EAV include abortion

in the mare and the carrier state in the stallion. Not only the carrier stallion is the essential natural reservoir of EAV but genetic and antigenic variation is generated in the course of persistence, thus an increasingly diverse population of related viral variants known as a viral quasispecies is present in the semen of individual stallions (Balasuriya et al., 2004; Hedges et al., 1999). EAV has a world wide distribution and phylogenetic analyses of the ORF5 (Balasuriya et al., 1995; Hornyák et al., 2005; Mittelholzer et al., 2006; Patton et al., 1999; Stadejek et al., 1999; St-Laurent et al., 1997), ORF6 and ORF7 (Chirnside et al., 1994; Patton et al., 1999), ORF3 and ORF4 (Archambault et al., 1997) and ORF1b (Stadejek et al., 1999) have shown that significant genetic heterogeneity exists between geographically and temporally distinct strains. However, strains of EAV also vary markedly in their virulence (Glaser et al., 1996), from causing an asymptomatic infection to outbreaks of equine viral arteritis. Although strains of EAV circulating today are

* Corresponding author. Tel.: +386 1 4779 846; fax: +386 1 4779 352.

E-mail addresses: sara.mankoc@vf.uni-lj.si (S. Mankoč), peter.hostnik@vf.uni-lj.si (P. Hostnik), joze.grom@vf.uni-lj.si (J. Grom), ivan.toplak@vf.uni-lj.si (I. Toplak), igor.klobucar@vf.uni-lj.si (I. Klobučar), marjan.kosec@vf.uni-lj.si (M. Kosec), darja.barlic@vf.uni-lj.si (D. Barlič-Maganja).

considered to be of low virulence (Larsen et al., 2001; Szeredi et al., 2003), the virus remains a potential threat to the horse industry as well for those horse owners who often move their horses for breeding purposes, training, racing or exhibition. The increase in the international movement of the horses enhances the risk of further outbreaks of the disease.

Rapid and highly specific diagnostic systems for detection and characterization of EAV in semen samples are an essential requirement to ensure proper management of EAV-infected horses and to provide effective control of the disease.

Development of new molecular assays remains challenging due to evolution of the EAV quasispecies that occurs during persistent infection of the stallion. Furthermore, in the light of quasispecies variability, such variations may affect the detection of the emerging EAV variants.

A number of RT-PCR assays have been described for the detection of EAV. Most of the published primer sets target the ORF1b of the viral polymerase gene (Chirnside and Spaan, 1990; Gilbert et al., 1997; Stadejek et al., 1999; Starick, 1998; St-Laurent et al., 1994). However, other regions of the viral genome have been used as targets as well, including ORF7, which encodes the nucleocapsid protein (Chirnside and Spaan, 1990; St-Laurent et al., 1994; Westcott et al., 2003). Previous sequence analyses indicated that N protein encoded by ORF7 was highly conserved (Balasuriya et al., 1999, 2004; Chirnside et al., 1994; Huovilainen and Ek-Kommonen, 1998; Patton et al., 1999) as these proteins are integral to preserve the structure of the EAV virion (de Vries et al., 1992) and N may be under strict functional constraints (Chirnside et al., 1994). Therefore, an RT-PCR assay targeting the ORF7 may be more sensitive.

Nested PCR assays have also been described (Belák et al., 1994; Gilbert et al., 1997; Starick, 1998; Westcott et al., 2003) but they have an increased propensity for false positive results due to a high risk of carry-over contamination.

With the advent of real-time RT-PCR in diagnosis of EAV (Balasuriya et al., 2002; Westcott et al., 2003), the requirement for post-PCR processing was obviated. Real-time RT-PCR has the advantage of being highly specific, reproducible and capable to quantify the starting amount of nucleic acids during the exponential phase of PCR by “real-time” monitoring of PCR products as they are generated.

TaqMan MGB probes (Applied Biosystems, CA, USA) are a novel class of oligonucleotide probes with conjugated minor-groove-binder (MGB) groups. The conjugates form extremely stable duplexes (Kumar et al., 1998) with single-stranded DNA targets, allowing shorter probes to be used for hybridization-based assays. The shorter length gave MGB probes better sequence specificity and lower fluorescent background in comparison to no-MGB probes (Kutyavin et al., 2000).

Development and application of a novel molecular detection method needs a support of sequencing to identify highly conserved parts of the virus genome or to identify the EAV strains with no sequence data available on publicly accessible databases. The nucleotide sequences of EAV strains circulating in Slovenia have not been reported yet. Therefore, the viral RNA of EAVs circulating in Slovenia was characterized in order to assure high specificity of the detection by selecting

oligonucleotide probes that are perfect matches to their intended targets.

In this study different primer pairs and probes directed to the ORF1b and ORF7 sequences of EAV strains were selected and used for conventional and real-time RT-PCR. A novel quantitative one-step RT-PCR with MGB TaqMan probe for the detection of EAV in semen samples was developed and evaluated in comparison with conventional RT-PCR, semi-nested PCR and PCR-ELISA.

2. Materials and methods

2.1. Semen samples and virus isolation

The mare in oestrus was used as a mount source for collection of complete ejaculate in an artificial vagina. The sperm rich fraction was diluted 1:2 in minimum essential medium + Hanks' salts + L-glutamine (MEM, Invitrogen™, Gibco®, Scotland, UK) and transported to the laboratory on the same day. The samples had been stored at -70°C until analysis. The virus neutralization assay for the detection of EAV-specific antibodies in sera, confirmed the EAV positive serological status of these naturally infected stallions.

A total of 104 (1999–2005) semen samples from clinically healthy Slovenian stallions were collected in order to find out the persistent virus shedders. For further studies, a selection of 40 semen samples from 23 virus shedder stallions was used.

Attempted virus isolation was performed as previously described (Timoney and McCollum, 1993). Briefly, RK-13 cells were seeded at a concentration of 2.5×10^5 cells/ml per well of 6-well plates the day before infection. Cells were inoculated in duplicate wells with serial dilutions (10^{-1} to 10^{-3}) of seminal plasma and overlaid with 0.75% carboxymethyl-cellulose (CMC, Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) in medium containing 2% fetal bovine serum and antibiotics. The inoculated cultures were incubated at 37°C up to 1 week or until viral CPE was observed. In the absence of CPE, cultures were frozen at -70°C , thawed, and re-passaged for two blind passages, after which the samples were regarded as EAV negative. The identity of cultured virus was confirmed by immunoperoxidase assay using nucleocapsid protein-specific monoclonal antibodies (BIO278, Bio-X Diagnostics, Jemelle, Belgium).

2.2. Cells and virus stock

Rabbit kidney cells from the American Type Culture Collection (RK-13, ATCC CCL7, passage 17, 01.07.2005) and the reference Bucyrus strain of EAV (ATCC VR 796) were kindly supplied by Dr. David. G. Westcott (Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, UK).

Growth medium of RK-13 cells was Advanced D-MEM (Invitrogen™, Gibco®, Scotland, UK), supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS SUPER, Svanova® Biotech AB, Sweden) containing Garamycin (80 mg/2 ml, Krka, Slovenia) and 0.4% GlutaMAX™-I Supplement 200 mM (Invitrogen™, Gibco®, Scotland, UK). The virus stock was obtained by inoculating a monolayer of RK-13 cells in a 75-cm^2 tissue culture flask

with 200 μ l of virus diluted in 4.8 ml of MEM. After adsorption for 1 h at 37 °C the inoculum was removed and 30 ml of fresh maintenance medium was added (Advanced D-MEM with 2% FBS). The flask was incubated for 2 days at 37 °C and 5% CO₂. After the appearance of viral cytopathic effect (CPE), the cells were frozen at –80 °C and thawed and then centrifugated for 15 min at 3600 rpm and 4 °C. The supernatant was aliquoted and stored at –80 °C.

2.3. RNA extraction

Total RNA from semen samples was isolated with the TRIzol[®] Reagent (Invitrogen[™], Carlsbad, CA, USA) according to the instructions of the manufacturer. The isolated RNA was dissolved in 100 μ l of DEPC-treated water and finally stored at –80 °C until further use. Four microlitres of total RNA was used for each amplification reaction.

2.4. Classical RT-PCR

In our study, three different primer pairs for the detection of viral RNA were tested and compared.

The already published primers were used for PCR amplification of the conserved sequences of 3'-end of the ORF1b (polymerase gene). The first primer pair consisted of EAV7/EAV8 (Chirnside and Spaan, 1990), while the second primer pair consisted of EAV11/EAV12 (Stadejek et al., 1999).

The ORF7 (nucleocapsid gene) was amplified using the primer pair EAV7.53F/12664N (Balasuriya et al., 2002, 2004). The positions of the primers and sizes of amplified DNA for different assays are shown in Fig. 1.

The RT-PCR assay was performed in a single-step with the Access RT-PCR kit (Promega, Madison, USA). Briefly, the combined reverse transcription and amplification were carried out in a total volume of 50 μ l containing 10 μ l of 5 $\times$ AMV/Tfl reaction buffer, 1 mM MgSO₄, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 μ M of each primer, 5 U AMV reverse transcriptase, 5 U Tfl DNA polymerase and 29 μ l of DEPC-treated water. Reaction conditions were 1 cycle at 48 °C for 45 min and 94 °C for 2 min; followed by 40 cycles, each consisting of 94 °C for 30 min, 52 °C in the case of EAV7/EAV8, 48 °C in the case of EAV11/EAV12, and 56 °C in the case of EAV7.53F/12664N for 1 min and 68 °C for 2 min; and a final extension at 68 °C for 7 min.

According to the preliminary testing, two primer pairs were selected to perform the final RT-PCR assay, EAV11/EAV12 and EAV7.53F/12664N, amplifying a part of the ORF1b and a part of the ORF7 gene, respectively.

2.5. Semi-nested PCR

Samples negative after RT-PCR were reamplified using a combination of primers EAV11/EAV8 and EAV7.53F/EAV7.256R (Balasuriya et al., 2002) (Fig. 1), respectively. The second round of amplification was performed using 1 μ l of the first-round PCR assay mixture. The PCR mixture consisted of 5 μ l of 10 $\times$ PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen[™], Carlsbad, USA), 0.2 mM of each dNTP,

0.4 μ M of each primer, 2.5 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen[™], Carlsbad, USA), adjusted to a final volume of 50 μ l with DEPC-treated water. This reaction mixture was subjected to 1 cycle at 94 °C for 2 min; followed by 35 cycles, each consisting of 94 °C for 30 s, 52 °C for 30 s, 72 °C for 1 min; and a final extension at 72 °C for 7 min.

2.6. Analysis of PCR products

Fifteen microlitres of each PCR product was electrophoresed in a 1.8% agarose gel stained with ethidium bromide and visualised and photographed under UV light. Five microlitres of the amplified product was screened colorimetrically by the ELISA. When the specificity of positive results on agarose gel was not confirmed by hybridization with the corresponding biotinylated probe, the remaining 30 μ l of the amplified products were electrophoresed and purified using Wizard[®] SV Gel and PCR clean-up system (Promega Corporation, Madison, USA).

2.7. PCR-ELISA

The PCR products were analysed using HYBRIDOWELL[™] Universal kit (ARGENE, France) according to the protocol supplied with the kit. Briefly, a 5 μ l aliquot of the amplified product was added to 10 μ l of denaturation solution 1. After vortexing, 10 μ l of denaturation solution 2 was added. The sample was vortexed again and incubated for 10 min at room temperature. Following denaturation, 200 μ l of coating solution was added and 100 μ l of this mixture was placed in duplicate to the wells of ELISA strips. After the incubation for 2 h at 37 °C, the liquid was dumped out and the wells were tapped upside down on a paper towel. The hybridization solution (100 μ l) containing 50 ng/ml of specific biotinylated probe was added to each well: EAVpr was targeted to ORF1b (Ramina et al., 1999), while EAV7.92P was targeted to ORF7 (Balasuriya et al., 2002) (Fig. 1). The ELISA strips were incubated for 30 min at 37 °C to allow the biotinylated probe to hybridize to the target region of the amplified product. The wells were then washed four times with washing solution and hybrids were detected with streptavidin-peroxidase conjugate. After incubation for 15 min at room temperature, the wells were washed four times and 100 μ l of tetramethylbenzidine substrate was added. The ELISA strips were incubated in the dark at room temperature for colour development. Finally, the reaction was stopped by adding 100 μ l of stop solution to each well. Each PCR-ELISA was performed with positive (EAV strain Bucyrus) and negative (supplied in the PCR-ELISA kit) controls. The optical density (OD) of each specimen was measured in an ELISA reader (Sunrise, Tecane, France). The cut-off value (CO) was calculated from the mean of the two negative detection control values. Optical density reading was done at 450 nm: CO = OD mean (negative control R1) + 0.150. The assay was considered positive if the mean OD of the sample was more than CO + 10% and negative if the mean OD of the sample was less than CO – 10%. In the case of false-negative PCR-ELISA results, the purifying process mentioned above, was used to remove detergents from samples. Equivalent aliquots of PCR products (gel-purified

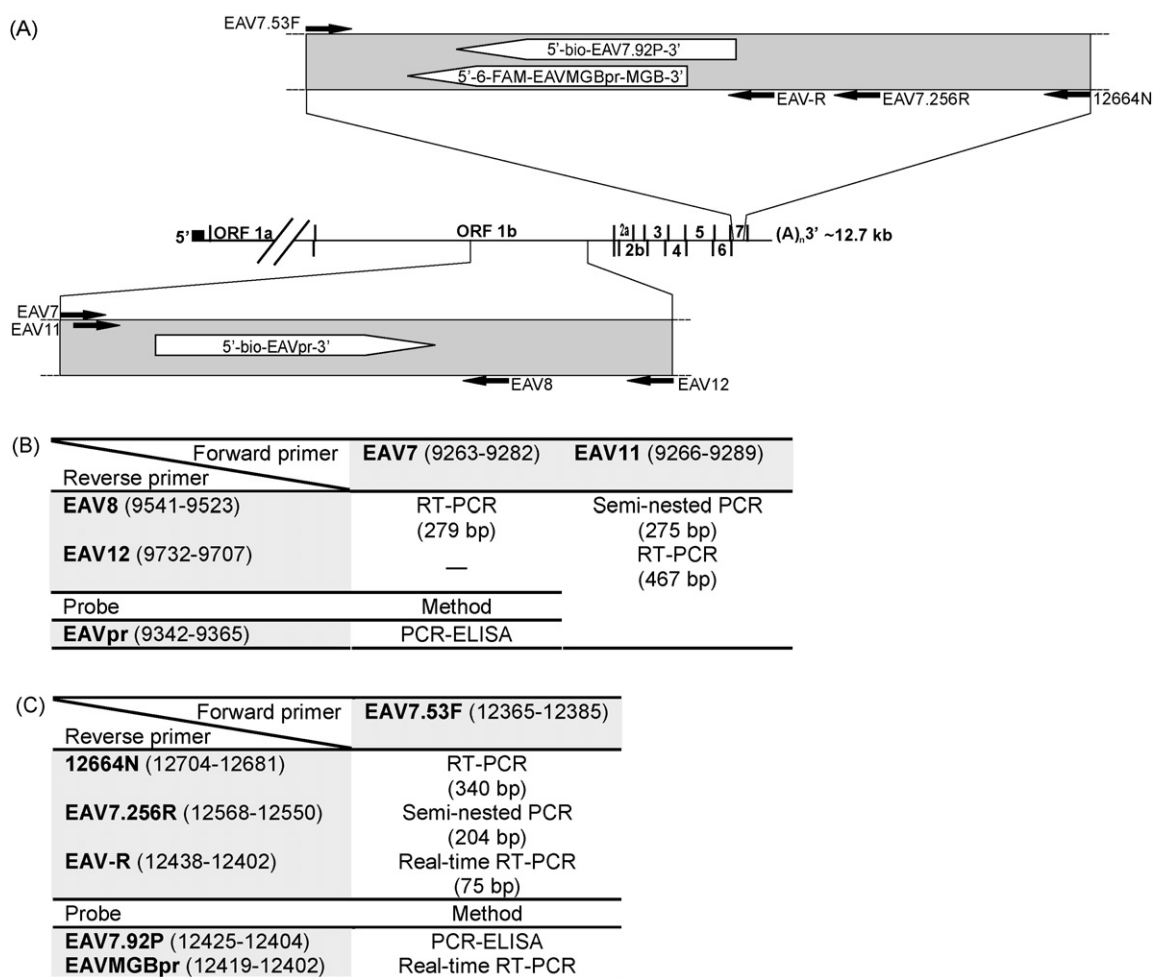


Fig. 1. Schematic depiction of the EAV genome in which the major ORFs1–7 (between vertical lines) are indicated. The polymerase (ORF1b) and nucleocapsid (ORF7) gene regions (filled boxes), primers (black arrows) and probes (open arrows) used in this study are shown (A). Combinations of primers used for the detection of either ORF1b (B) or ORF7 (C) gene, their genomic positions and amplicon sizes are provided. Numbers correspond to the nucleotide positions in the Bucyrus reference strain published by den Boon et al. (1991), GenBank accession number NC_002532. The relative sizes of ORFs are not drawn to scale.

and non-purified) were retested in parallel by the PCR-ELISA assay.

2.8. Cloning and sequencing analysis

In order to exclude false-negative results obtained by the PCR-ELISA, the identity of each PCR product, amplified with primer pairs EAV11/12 and EAV7.53F/12664N, respectively, was verified by sequencing. The purified PCR products were cloned with the TOPO TA Cloning[®] kit for sequencing (Invitrogen[™], Carlsbad, USA), and kanamycin-resistant clones were screened for plasmids containing the appropriate DNA insert. The individual clones were screened by restriction analysis with *EcoRI* restriction enzyme (Promega Corporation, Madison, USA). Plasmid DNA was purified for cycle sequencing with Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA purification system (Promega Corporation, Madison, USA). Four independent clones of recombinant plasmids were sequenced with Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). Nucleotide sequencing was performed in both directions using the corresponding M13 For-

ward (–20) and T3 primers, by an automatic ABI PRISM[®] 310 Genetic analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Multiple alignments were created with Clustal X 1.83 program (Thompson et al., 1997). Genetic distances were calculated from the alignment on the basis of the Kimura two-parameter model (Kimura, 1980). Phylogenetic trees based on partial ORF1b and partial ORF7 sequences were constructed by the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The phylograms were generated using the NEIGHBOR program of the PHYLIP package version 3.66 (Felsenstein, 1993). The robustness of each node was assessed by bootstrap resampling (Felsenstein, 1985) (1000 replicate data sets) with the SEQBOOT program of the PHYLIP package.

2.9. One-step real-time RT-PCR

A TaqMan MGB probe and a reverse primer were designed using the Primer Express[®] Software v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Fig. 4). The TaqMan MGB probe was labeled at the 5'-end with the 6-carboxyfluorescein (6-FAM)

reporter dye. The forward primer was taken from Balasuriya et al. (2002).

RNA was amplified using the SuperScriptTM III Platinum[®] one-step quantitative RT-PCR system (Invitrogen Life TechnologiesTM, Carlsbad, USA) on an ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Briefly, the 25 µl reaction mix contained 12.5 µl of reaction mix with ROX (2×), 0.5 µl of SuperScriptTM III RT/Platinum[®] Taq Mix, 2.5 µl (200 nM) fluorogenic probe EAVMGBpr, 2 µl (800 nM) of each primer, 1.5 µl nuclease-free water and 4 µl of extracted RNA. The RT step involved incubation at 50 °C for 15 min. The PCR conditions included an initial denaturation of 95 °C for 2 min followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 30 s.

Samples were assayed in duplicate and a cycle threshold (C_T) value was determined for each reaction using the log-linear phase of reaction. The results were analysed using the ABI Prism 7000 SDS Software. A sample was determined to be positive if the C_T value was ≤ 40 . Coefficient of variation ($CV = \text{standard deviation}/\text{mean} \times 100$) of C_T values was calculated between two sample replicates as well as among consecutive semen samples from the same animal.

A standard curve was generated from the amplification of serially diluted (10^{-1} to 10^{-7}) RNA samples from the Bucyrus reference strain. In each run, the log dilution series of Bucyrus RNA and negative amplification controls containing nuclease-free water were tested in duplicates along with the test samples.

3. Results

3.1. Virus isolation

Slovenian EAV isolates were obtained on first passage in RK-13 cells, with viral-induced cytopathic effect detectable by the third day post-inoculation. The addition of carboxymethyl-cellulose to the medium-enhanced viral recovery.

3.2. Evaluation of classical RT-PCR and semi-nested PCR for the detection of EAV RNA in semen samples

After setting up optimal assay conditions for RT-PCR, RNA isolated from a RK-13 cell culture infected with EAV Bucyrus strain was found positive in RT-PCR using three different primer pairs (EAV7/8, EAV11/12 and EAV7.53F/12664N).

To evaluate the effectiveness of appropriate primer pairs, classical RT-PCR was performed using extracted RNA from semen samples obtained from 23 serologically positive Slovenian stallions. The primer pair EAV7/8 targeting the part of ORF1b gene, successfully detected EAV RNA in 22 semen samples, while 6 (SLO6, SLO10, SLO11, SLO21, SLO27 and SLO30) of 28 semen samples were negative. For semen samples SLO1 and SLO13 a faint band was seen in the agarose gel. However, when primer pair EAV11/12 was tested with the RNA from these 8 semen samples, 6 of them (SLO1, SLO6, SLO13, SLO21, SLO27 and SLO30) were successfully amplified (Supplementary Table 1).

The overlapping position of both forward primers EAV7 and EAV11, and positive RT-PCR results obtained with the primer pair EAV11/12, but not with the primer pair EAV7/8, suggested a possible mismatch of the reverse primer EAV8 with the cDNA template of these Slovenian strains. The stability of the ORF1b polymerase gene region of Slovenian strains in the priming site of the reverse primer EAV8 was checked. Indeed, sequencing of this region revealed the presence of mismatches at 1–5/19 nt positions (SLO13 and SLO21) including one at the primer 3'-end observed in strain SLO21. The latter mismatch might have affected the ability for the polymerase to catalyze 3' elongations. There were no changes at EAV8 priming site of strain SLO1. No product was detected with the reverse primer EAV8 on strain SLO27, although its specific cDNA showed perfect homology to the sequence of Bucyrus reference strain, whose genome sequence was used for primer design. Both primer pairs could not reveal specific sequences from semen samples RNA SLO10 and SLO11 (Supplementary Table 1), and thus sequences for the reverse primer EAV8-binding region could not be obtained.

The primers EAV7.53F/12664N-specific for the ORF7 were then used to test semen samples for the presence of EAV by RT-PCR. These primers detected all but two (SLO10 and SLO11) of the 40 semen samples (Supplementary Table 2). The RT-PCR for the ORF7 correlated absolutely with the results obtained with the EAV11/12 primers targeting the ORF1b.

In order to increase the sensitivity of the diagnostic procedure, the first-round PCR products of semen samples SLO10 and SLO11 were tested by semi-nested PCR. The primers EAV11 and EAV8 which were initially selected for single-round amplification of the ORF1b were used in a semi-nested PCR analysis. Semen samples SLO10 and SLO11 reacted positively in the semi-nested PCR. The highest sensitivity, however, was obtained with the amplification of the ORF7 partial segment by semi-nested PCR.

3.3. PCR-ELISA

In order to confirm the identity of the amplification products, the PCR products from 40 semen samples were assayed using the specific internal capture probe with PCR-ELISA. A positive hybridization signal from each amplification product was expected. However, the use of EAVpr probe for the hybridization to the polymerase gene region amplified with primers EAV7/8 of nine semen samples resulted in OD values between 0.060 and 0.22. These samples were amplified also with primers EAV11/12 and retested again with the same EAVpr probe by PCR-ELISA. Indeed, the hybridization method successfully detected PCR products from all of nine Slovenian strains, with OD values ranging between 0.243 and 1.125. Additionally, positive results using the EAVpr probe were obtained with four samples (SLO6, SLO21, SLO27 and SLO30) detected previously just with primers EAV11/12. Neither RT-PCR products were obtained from the same four samples with primers EAV7/8, nor did they hybridize detectably to EAVpr probe used in the PCR-ELISA system.

To test the sensitivity of the PCR-ELISA method, the hybridization assay was performed on samples with no vis-

ible PCR products when analysed by gel electrophoresis. As expected, an attempt to detect the EAVpr probe-specific region in semen samples SLO10 and SLO11, from which we could not amplify any detectable amount of viral RNA with neither EAV7/8 nor EAV11/12 primer pair, failed completely (Supplementary Table 1).

To determine the probe-binding sequence divergence of Slovenian EAV strains, a part of the ORF1b containing the probe-annealing site, was sequenced. As shown in Supplementary Table 1, the majority of Slovenian strains were found to be identical in all but two positions with the Bucyrus reference strain.

Initially, it was thought that sequence variations in the EAVpr probe-specific target region were the only source of differences in detection efficiency of the PCR products with the PCR-ELISA method. Ten RT-PCR products obtained with primers EAV11/12 from semen samples SLO3, SLO19, SLO30, SLO33, SLO34, SLO35, SLO36, SLO39, SLO45 and SLO48 gave completely negative results with EAVpr. The OD values ranged from 0.056 to 0.243.

To ascertain the effect of detergents in the amplification buffer, the ability of EAVpr to detect non-purified and purified PCR products was compared. Retesting of the PCR products after gel purification finally gave positive results for all 10 semen samples with OD values of PCR-ELISA, ranging between 0.719 and 3.661, with sample SLO3 proved to be positive with OD value 0.229, as indicated in Supplementary Table 1.

The identity of PCR products amplified with primers EAV7.53F/12664N flanking the nucleocapsid gene region was further confirmed with a biotin labeled EAV7.92P probe in the PCR-ELISA assay. All 40 Slovenian semen samples were tested and 30 of them were unambiguously positive (Supplementary Table 2), while 10 samples gave negative results in PCR-ELISA. After the agarose gel purification process, the amplification products resulted in OD values of ≥ 1.285 for all 10 EAV samples. However, semen sample SLO10, negative by RT-PCR with primers EAV7.53F/12664N, was also negative in the PCR-ELISA, even though this semen sample yielded positive result by semi-nested PCR. Interestingly, the semen sample SLO11 was found positive by semi-nested PCR and the ELISA hybridization method with OD value of 0.513 (Supplementary Table 2).

All negative controls (kit negative R1, uninfected RK-13 cell culture, buffer amplification control) had ODs of less than 0.077.

Since both the EAVpr and the EAV7.92P hybridization probes displayed clear positive signals in the PCR-ELISA assay after the gel extraction and purification process, we concluded that the negative results obtained in the PCR-ELISA performed with amplification products directly after the RT-PCR were not due to the presence of mismatches in the probe target region but evidently due to the interfering role of detergents present in the RT-PCR buffer.

3.4. ORF1b phylogenetic analysis

Partial ORF1b Slovenian sequences included in comparative phylogenetic analysis were deposited in Gen-

Bank, under accession numbers: EF444897–EF444908 and EF566825–EF566827. Other EAV sequences were taken from Stadejek et al. (1999).

Phylogenetic analysis was performed on the 43 partial ORF1b sequences of the EAV strains, including 15 Slovenian strains. The ORF1b gene sequences of Slovenian strains showed 81.9–91.1% nucleotide identity with Bucyrus reference strain (data not shown). Two statistically significant groupings which corresponded to group I and group II.A were in accordance with previously reported phylogenetic estimations. The majority of Slovenian strains built a separate cluster well away from all the European strains. Slovenian strains were more closely related to each other than to the remaining isolates, nevertheless they shared the most recent ancestor with GB3 (United Kingdom, 1996) and D1 (Germany, 1994) isolates. In pair wise comparisons, the Slovenian strains were 83.3–86.8% homologous to GB3 and 84.2–86.8% to D1 isolates at the nucleotide level, respectively (data not shown). Two sequences from the semen of Slovenian stallion SL (SLO18c and SLO18t) in the year 2002 belonged to group I which contained the Bucyrus strain and other North American and some European strains. As expected, the anamnestic data have revealed that infected stallion was imported from USA. The sequences SLO19A and SLO21A were clearly distinct from other Slovenian ones and formed a separate branch supported by high bootstrap value (1000). These semen samples were collected from an imported Finnish trotter stallion SM. The phylogenetic tree indicates a significant ORF1b variability of the examined strains, supporting great divergence of Slovenian EAV strains (Fig. 2).

3.5. ORF7 phylogenetic analysis

Twenty-two Slovenian EAV sequences of 238 bp were determined for the partial ORF7 gene region and deposited in GenBank. Their accession numbers are EF444881–EF444896 and EF566819–EF566824. The database accession numbers of other EAV ORF7 sequences used for comparison are as follows: CW96 (AY349167), CW01 (AY349168), KY63 (U81014), NORW2 (X78501), PA76 (U81018), KY93 (U81017), CA95I2 (U81025), KY77 (U81015), KY84 (AF107279), E89 (AF107278), CAN86 (U81021), CA95G (U81023), CA95GS2 (U81027), NORW1 (X78500), VBS53 (U81013), ATCC (U81020), VIENNA (X78497), Bucyrus (NC002532), ARVAC (U81019), WROCLAW (X78498), PF67 (X78492), KS67 (X78493), POL185 (X78499), BIBUNA (X78496), R2 (AF118774), R1 (AF118773), BT-PA96 (AF118781), A1 (AF118769), P1 (AF118775), P2 (AF118776), A4 (AF118772), G1 (AF118777), G4 (AF118780), G2 (AF118778) and G3 (AF118779).

The phylogenetic tree showed that 10 Slovenian strains (SLO1, SLO15, SLO17, SLO22, SLO23, SLO24, SLO25, SLO26, SLO27 and SLO28) formed a monophyletic group with nucleotide sequence identity of 98.3–100% when compared to each other and showed 97.1–98.3% identity at the nucleotide level (data not shown) with the most closely related Vienna strain (Austria, 1964). The sequences SLO19A and

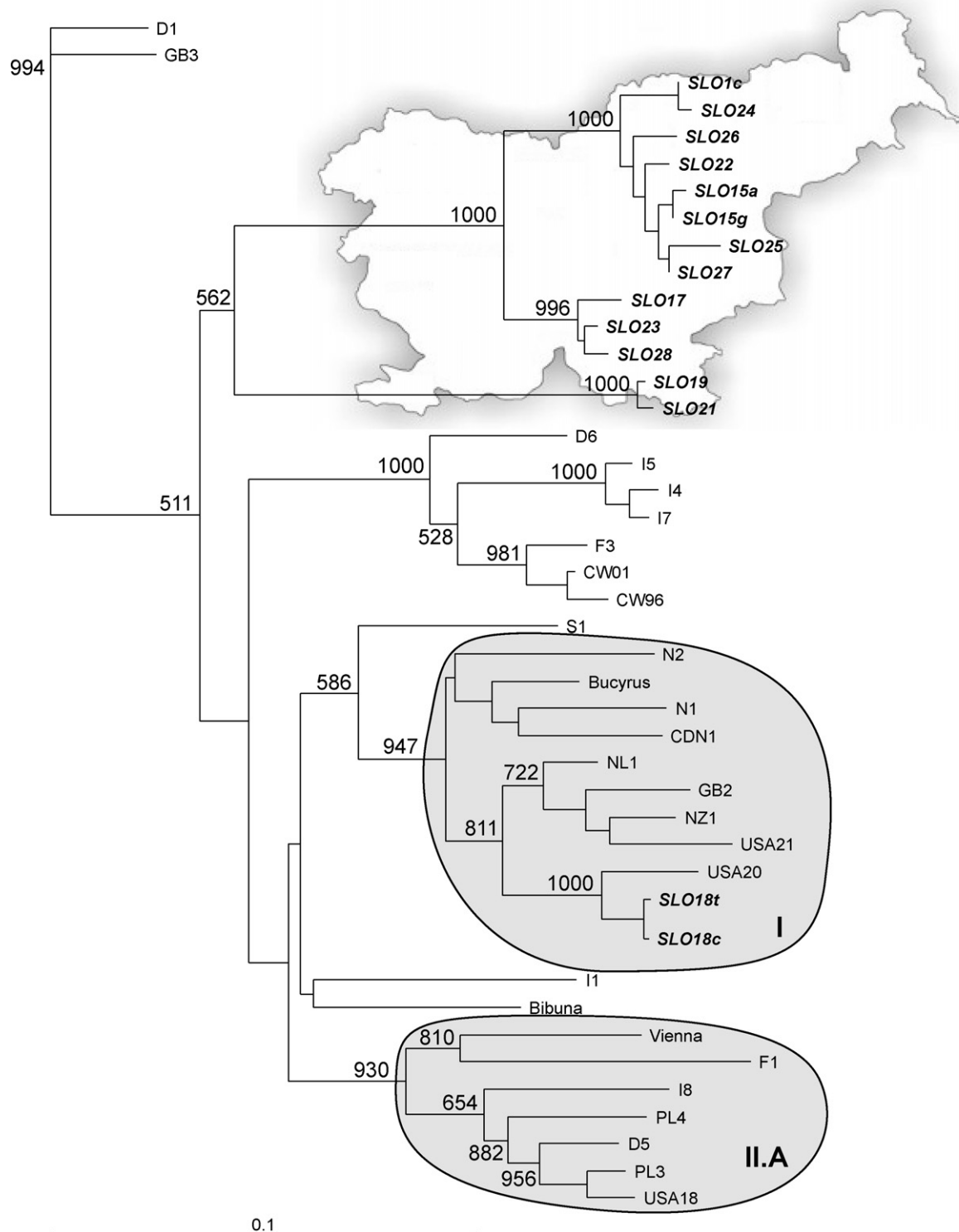


Fig. 2. A phylogenetic tree constructed by Neighbor-Joining method using the two-parameter model of Kimura. Partial ORF1b nucleic acid sequences of 348 bp (corresponding to nucleotide positions 9320–9667 of the Bucyrus reference strain, GenBank accession number NC.002532) were aligned with Clustal X 1.83 program. Bootstrap values above 50% are indicated on the inner branches. Slovenian sequences are shown in bold italic font and small letters after the semen sample designation represent particular clone.

SLO21A present in the semen of stallion SM were very similar to the sequences of clones A1 and A4 from stallion A which was imported from Europe and was responsible for the EVA outbreak in Pennsylvania in March 1996. Moreover,

sequences SLO18A and SLO18B were genetically more closely related to the North American EAV strains (Fig. 3). These findings are consistent with the results of ORF1b phylogenetic studies.

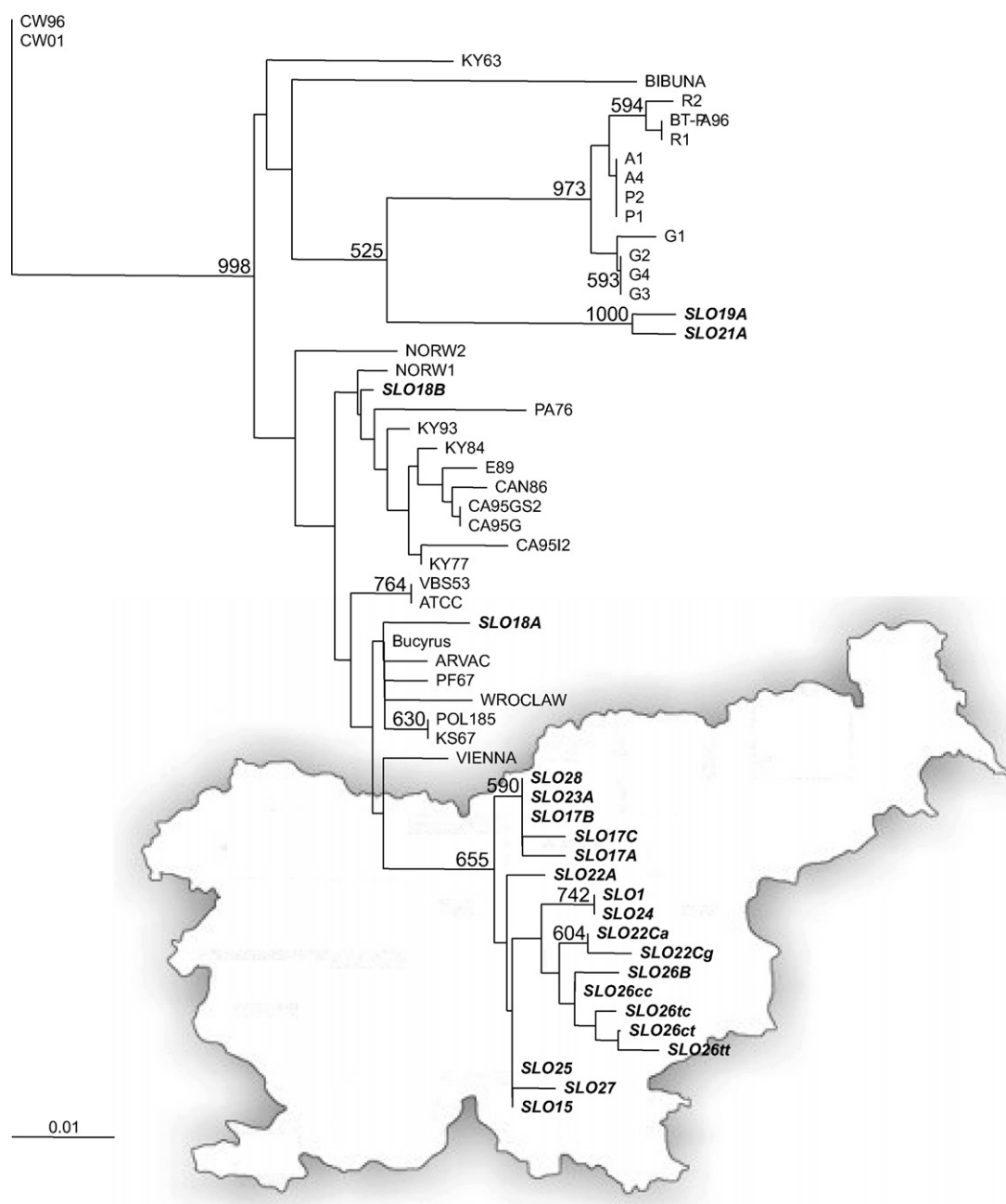


Fig. 3. A phylogenetic tree constructed by Neighbor-Joining method using the two-parameter model of Kimura. Partial ORF7 nucleic acid sequences of 238 bp (corresponding to nucleotide positions 12,397–12,634 of the Bucyrus reference strain, GenBank accession number NC.002532) were aligned with Clustal X 1.83 program. Slovenian sequences are shown in bold italic font and letters after the semen sample designation represent particular clone.

3.6. One-step real-time RT-PCR

According to our phylogenetic analysis, the ORF7 gene region of the EAV genome having higher level of nucleotide conservation among different EAV strains was chosen for setting up real-time RT-PCR assay.

For the amplicon detection in the PCR-ELISA assay biotinylated probe was used having identical sequence to the fluorescent TaqMan[®] probe published by Balasuriya et al. (2002). Nine of the 22 Slovenian sequences determined in this study mismatched at the nucleotide position 12,420 (C:T) of the probe-binding site. As the primer/probe design program Primer Express[®]

directed us to the same ORF7 genomic region, a new position within the aforementioned ORF7 region was attempted to find. MGB TaqMan probes are susceptible to mismatch and small conserved areas would enhance their hybridization efficiency. Consequently, following the analysis of 49 different EAV strain sequences, a highly conserved region with complete homology among all compared sequences was found. The MGB TaqMan probe (EAVMGBpr) with slightly different nucleotide position (from 12,402 to 12,419) and length of 18 bp, but still overlapping with the EAV7.92P probe (Figs. 1 and 4), was designed.

Initially, only 22 Slovenian sequences were aligned to design a reverse primer EAV-R which was degenerated at the nucleotide

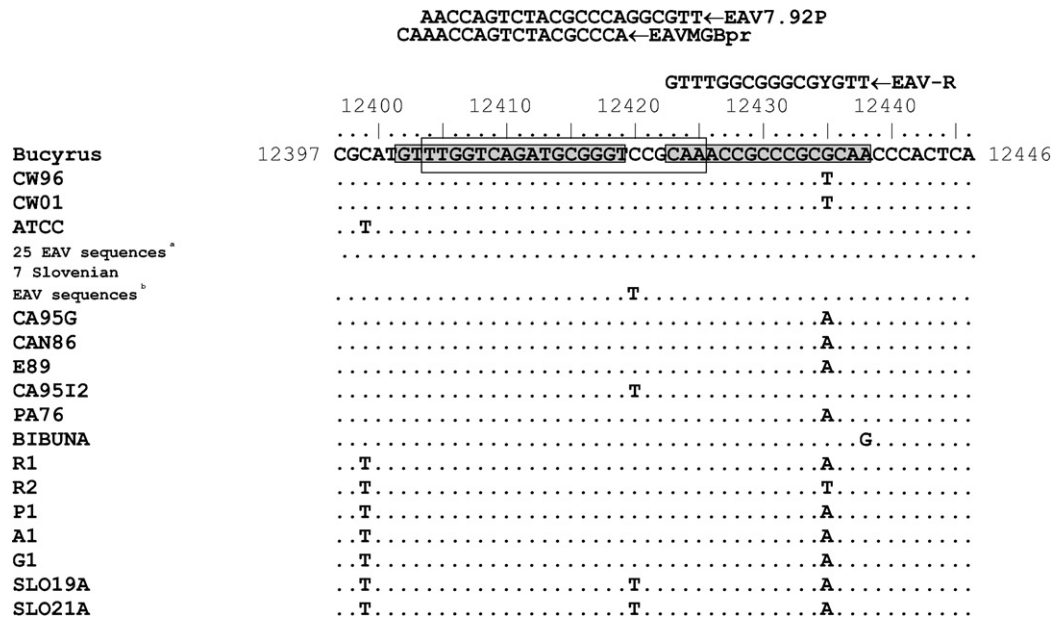


Fig. 4. Partial ORF7 nucleotide sequences of 27 American and European EAV strains and 22 Slovenian sequences were aligned. The dots indicate nucleotides identical to the Bucyrus reference strain. The filled boxes indicate the positions of the reverse primer EAV-R and probe EAVMGBpr used in the EAV-specific real-time RT-PCR, while the open box indicates the position of the probe EAV7.92P used in the PCR-ELISA assay. ^a Thirteen Slovenian sequences obtained from semen samples (SLO1, SLO15, SLO17, SLO18, SLO22, SLO23, SLO24, SLO25, SLO27 and SLO28) and 12 field isolates from North America and Europe (VIENNA, ARVAC, POL185, KS67, PF67, WROCLAW, KY84, KY77, KY93, NORW1, NORW2 and KY63). ^b Seven Slovenian sequences obtained from semen samples (SLO22 and SLO26).

position 12,435 (Y=C or T). Two sequences (SLO19A and SLO21A) had a G–A transition, while no mutations at that position were observed in the EAV-R priming site of the other 20 Slovenian sequences. Later, other 27 available sequences of EAV strains from America and Europe were aligned with Slovenian ones. A transversion G–T at the nucleotide position 12,435 was observed in three EAV strains (CW01, CW96 and R2). Further, the Bibuna strain had a transition A–G at the 5′-end of the EAV-R priming site (Fig. 4). Nucleotide sequence variability among different EAV strains in the EAV-R priming site imposes a need for further modifications of the reverse primer.

Forty semen samples previously analysed by classical RT-PCR and PCR-ELISA were tested also by real-time RT-PCR. **Supplementary Table 2** shows the results obtained with three comparative assays. The EAVMGBpr correctly identified all Slovenian EAV isolates, and most virus positive semen samples had C_T values less than 27. Two semen samples (SLO10 and SLO11) were negative by classical RT-PCR but positive by real-time PCR with C_T values in the range from 35.19 to 38.14. Both discrepant samples were confirmed as positive by semi-nested PCR indicating the presence of very low amounts of viral RNA in the examined samples. In addition, a complete agreement between results obtained with the PCR-ELISA using gel-purified RT-PCR products and real-time RT-PCR was achieved. Thus, the results of both molecular hybridization methods were fully concordant (**Supplementary Table 2**).

In addition, the method was highly reproducible, as demonstrated by the small standard deviation (0.03–1.03) and coefficient of variation (CV<3.32%) of duplicate determinations. Consecutive semen samples from the same horse gave a CV below 22%, indicating that virus shedders contain fairly

constant amounts of EAV (Timoney et al., 1986) (Table 1). The CV was calculated from mean C_T values for all 23-virus shedder stallions that were tested for the presence of EAV in their semen. A CV of 27.5% was obtained, indicating that variations exist in the quantity of virus secreted by different animals.

3.7. Overall sensitivity determination of classical RT-PCR, semi-nested PCR, PCR-ELISA and real-time RT-PCR for the detection of Bucyrus RNA targeting the ORF7 gene region

To compare the sensitivity of presented molecular methods, serial 10-fold dilutions of total RNA extracted from RK-13 cell culture derived Bucyrus stock, were performed in DEPC-treated water to 10^{-7} . The titer of the Bucyrus stock used in this study was 6.8×10^6 PFU/ml. The amplification products were detected as a clear band of 340 bp upon agarose gel electrophoresis up to 10^{-5} dilution corresponding to 68 PFU/ml of the virus sample. Comparative analysis revealed that semi-nested PCR represented a sensitivity of about 6.8 PFU/ml of the virus sample. Therefore, semi-nested PCR was about 10 times more sensitive than single-round RT-PCR (Fig. 5A). Fig. 5B shows that the dilution of 10^{-5} was also detected readily as positive in the PCR-ELISA assay. However, the DNA purification from the gel was imperative for gaining a positive result from the same dilution as obtained by RT-PCR. The colorimetric dilution endpoint for the detection of non-purified PCR products was at the dilution of 10^{-4} with an OD value of 0.405. As expected, the presence of detergents in the amplification buffer inhibited the hybridization of the EAV7.92P probe by about 83%.

Table 1
Average C_T values from real-time RT-PCR analysis of 27 semen samples collected from 10 Slovenian stallions

Stallion	Sampling year	Semen sample designation	Real-time RT-PCR (EAV7.53F/EAV-R) (C_T) values ^a		
			Mean	S.D.	C.V. (%)
087	2002	SLO1	25.68	0.27	1.05
	2003	SLO24	25.65	0.13	0.52
	2004	SLO34	20.98	0.33	1.55
	2005	SLO48	30.85	1.03	3.32
(C_T) values ^b			25.79	4.0	15.63
213	2002	SLO3	25.72	0.37	1.46
	2003	SLO23	17.53	0.29	1.65
	2004	SLO33	19.38	0.59	3.06
	2005	SLO45	25.86	0.16	0.60
(C_T) values ^b			22.12	4.3	19.45
990	2001	SLO6	18.71	0.15	0.79
	2002	SLO2	17.68	0.40	2.28
	2003	SLO22	18.68	0.16	0.87
	2004	SLO32	13.45	0.18	1.37
(C_T) values ^b			17.10	2.48	14.48
168	2001	SLO7	18.2	0.03	0.16
	2003	SLO28	21.65	0.06	0.26
(C_T) values ^b			19.91	2.4	12.11
987	2001	SLO5	19.3	0.11	0.59
	2004	SLO35	14.2	0.06	0.4
(C_T) values ^b			16.75	3.61	21.53
068	2003	SLO26	21.17	0.04	0.17
	2004	SLO36	15.53	0.19	1.23
(C_T) values ^b			18.35	3.99	21.73
167	2003	SLO27	20.75	0	0
	2004	SLO39	14.51	0.04	0.29
	2005	SLO44	21.47	0.15	0.69
(C_T) values ^b			18.91	3.83	20.24
031	2003	SLO29	16.32	0.38	2.34
	2004	SLO37	13.27	0.17	1.28
(C_T) values ^b			14.8	2.16	14.58
SL	2002	SLO18	24.55	0.17	0.7
	2003	SLO20	18.8	0.06	0.3
(C_T) values ^b			21.68	4.07	18.76
SM	2002	SLO19	27.09	0.11	0.42
	2003	SLO21	25.99	0.28	1.06
(C_T) values ^b			26.54	0.78	2.93

^a Data are from two replicates for each semen sample.

^b Data are from consecutive semen samples from the same stallion.

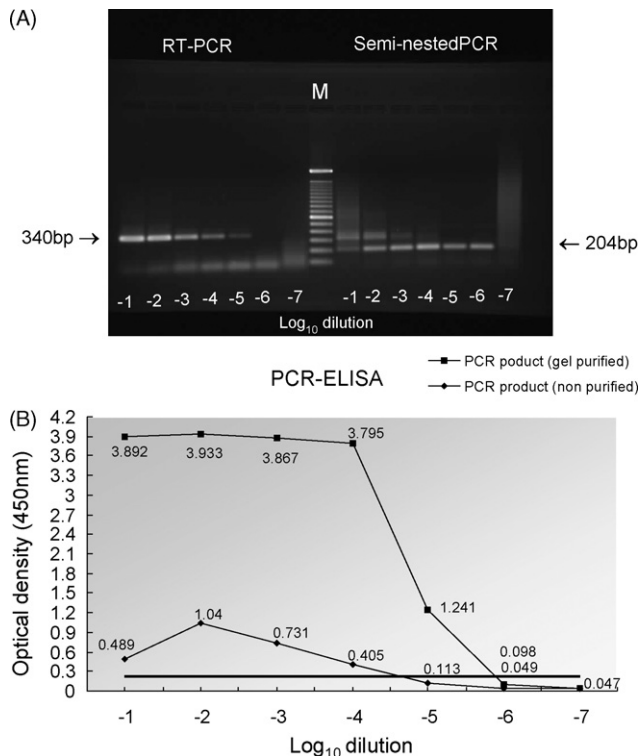


Fig. 5. Detection of the Bucyrus ORF7 gene region. The total RNA was extracted from a 250 μ l aliquot of the Bucyrus viral stock. Serial 10-fold dilutions from 10^{-1} to 10^{-7} of the extracted RNA were performed: (A) detection of the 340 bp RT-PCR products and 204 bp semi-nested PCR products on an ethidium bromide stained agarose gel, (M) 100 bp DNA ladder (Invitrogen, UK) and (B) detection of RT-PCR products by PCR-ELISA. Data are presented as an average of two replicates. The detection threshold of the 0.217 absorbance units (450 nm) for positive PCR-ELISA reactions is indicated by a solid horizontal line.

Real-time RT-PCR produced a linear quantitative detection range of 7 logs with the correlation coefficient $R^2 = 0.999$ and a slope value of -3.17 (data not shown). The lower limit of EAV detection was 0.68 PFU/ml of virus sample. Thus, the analytical sensitivity of real-time RT-PCR assay was about 100 times higher than that of the RT-PCR and PCR-ELISA methods. As compared to the semi-nested PCR, the real-time RT-PCR showed a 1 log₁₀ improvement of sensitivity. Our results of molecular methods employed for the detection of EAV RNA showed that the real-time RT-PCR was the most sensitive one.

4. Discussion

Our research was focused in the development of a reliable molecular diagnostic method to confirm the existence of the carrier state in Slovenian stallions infected with EAV. Carrier stallions shed virus continuously in their semen and are responsible for maintenance of EAV in horse populations throughout the world (Timoney et al., 1986). The international trade of carrier stallions and infective semen play an important role in the epidemiology of EAV. One of the official methods recommended by O.I.E. for testing semen samples for the presence of EAV is virus isolation in cell culture, which requires more than 3 weeks for obtaining final result. Introducing more rapid and sensitive

methods in a routine use for prompt detection of carrier stallions would have considerable advantages for identifying the potential sources of EVA outbreaks.

In the present study, a newly developed real-time RT-PCR was compared to the already established PCR methods for EAV RNA detection to see whether the results obtained with different methods are correlated.

The primers used in RT-PCR and semi-nested PCR assays targeting both the polymerase gene (3'-end of ORF1b) and the nucleocapsid gene (ORF7) were tested on 40 semen samples of Slovenian stallions that were previously found to be positive for neutralising antibodies to EAV.

At the beginning of our research, the primers EAV7/8 from the ORF1b region selected by Chirnside and Spaan (1990) were used, because Ramina et al. (1999) demonstrated their high sensitivity for detection of field EAV strains. Surprisingly, an attempt to amplify EAV RNA from six semen samples by utilizing the aforementioned primer pair, failed. In addition, the amplification of another two semen samples with primers EAV7/8 resulted in faint bands after gel electrophoresis (Supplementary Table 1). RT-PCR assays were redone by using primers EAV11/12 which have also been published (Stadejek et al., 1999). The results greatly improved as EAV RNA was detected in all but two of 40 semen samples tested. The primer pair EAV11/12 was however, unsuccessful in amplifying the viral RNA from semen samples SLO10 and SLO11 (Supplementary Table 1). Mismatches at the 3'-end of primers could be refractory to amplification. Sequencing of the EAV8 priming site of some Slovenian clones showed up to five mismatches (SLO21), which could explain its inefficiency in RT-PCR.

For two semen samples (SLO10 and SLO11) which were not detected by the primer pair EAV7.53F/12664N a semi-nested PCR assay was performed. Since the use of a second round of amplification was crucial for detecting EAV RNA in semen samples SLO10 and SLO11 (Supplementary Table 2), the negative RT-PCR results were concluded to be due to a very low level of EAV RNA. Although the highest detection rate of EAV-positive animals was achieved after a second-round of amplification, our results showed that the sensitivity and specificity of semi-nested PCR performed in this work depended upon the position of the primer pair within the EAV genome.

In our PCR-ELISA assay the EAVpr probe taken from Ramina et al. (1999) successfully detected all RT-PCR products obtained by EAV11/12 but failed to detect nine positive products amplified by EAV7/8 primers. The apparent discrepancy between both PCR-ELISA results could not be explained by the presence of mismatches at the probe-binding site as both primer pairs encompass the same EAVpr probe target region with only two mismatches found in some Slovenian strains which had no effect on detecting EAV11/12 PCR products under hybridization conditions employed. Furthermore, after the purification of the RT-PCR products obtained with EAV11/12 primers 10 more EAV positive samples were detected by the PCR-ELISA assay (Supplementary Table 1).

Although sequences of some Slovenian clones have one mismatch at the EAV7.92P probe-binding position (Fig. 4), there has

been a high degree of concordance between hybridization assays when non-purified or gel-purified PCR products were successfully detected under high stringency conditions. The results of our study indicate that detergents in the amplification buffer could affect a coating step where DNA is directly bounded on a microtiter plate and also the hybridization process by impairing the probe to bind the target nucleic acid, as some PCR products with regardless to the primers used for the amplification reacted with weak or non-colorimetric response. The additional purification step for removing detergents from the amplification buffer prior to colorimetric analysis was advantageous as the sensitivity of the PCR-ELISA assay greatly improved. Taking into consideration that hybridization reactions with biotinylated probes targeting the ORF1b and ORF7 genes of various Slovenian EAV strains were carried out under different stringency conditions it could be concluded that for reliable detection of PCR products with the HybridowellTM Universal kit, the DNA extraction and purification process should be attempted.

In order to set a base for the development of reliable real-time RT-PCR assay the viral RNA of EAV strains present in Slovenia since 1999 were characterized. To get an insight into the genetic variation of the EAV strains circulating in our geographic region, the partial ORF1b and ORF7 sequences of several EAV strains were compared at the nucleotide sequence level. It is already known that replicase gene sequences are likely to be more conserved than those encoding structural proteins (Stadejek et al., 1999). The results of ORF1b sequences comparison revealed that all Slovenian strains are closely related to each other. However, their nucleic acid sequences differ by 9–18% from their respective reference strain Bucyrus.

The ORF7, on the other hand, is the most conserved gene amongst different EAV strains (Balasuriya et al., 1999; Chirnside et al., 1994; Hedges et al., 1999), and the primer/probe sets derived from this region should fulfil the criteria which are necessary before implementing a sensitive molecular method as it is real-time RT-PCR for detection and quantification of EAV in semen samples. Therefore, the ORF7 gene proved to be an excellent diagnostic target for designing an in-house primer/probe set and setting up real-time RT-PCR assay. TaqMan assays based on the one-step RT-PCR amplification of the EAV ORF7 gene have been previously described (Balasuriya et al., 2002; Westcott et al., 2003). In the comparison of 49 nucleotide sequences including also Slovenian strains (Fig. 4) one mismatch was identified in the region of EAV7.92P probe used in the real-time RT-PCR described by Balasuriya et al. (2002). Bearing this consideration in mind, a shorter MGB probe (EAVMGBpr) was designed with a slightly different position on highly conserved region of the EAV ORF7. Regarding the reverse primer, it was designed from a well-preserved region with only one-point mutation at the nucleotide position 12,435 (Y = C or T) (Fig. 4). The newly developed real-time RT-PCR assay, effectively detected EAV RNA in all 40 semen samples including two discrepant samples (SLO10 and SLO11) which were negative by classical RT-PCR but positive by semi-nested PCR (Supplementary Table 2).

Compared to the sensitivity of the one-step RT-PCR assay a 2 log₁₀ increase in sensitivity was obtained in the real-time RT-PCR assay. Semi-nested PCR described here proved to be about

10 times more sensitive than single-round RT-PCR. It was able to detect up to the 10⁻⁶ dilution of the extracted RNA, whereas at the dilution of 10⁻⁷ the detection was not always feasible. The band was either faint or absent with the smear present on the agarose gel (Fig. 5A). The sensitivity of the real-time RT-PCR developed in this study was 10 times greater than that of the semi-nested PCR. Furthermore, to compare their relative sensitivities, the real-time RT-PCR and PCR-ELISA assays were performed using the probes with slightly different positions and length (Fig. 4). Since the dilution threshold limit found for PCR-ELISA of non-purified PCR products was 10 times lower than that found for gel electrophoresis analysis of the aforementioned PCR products, an additional step in post-amplification product purification has been of paramount importance for improving the sensitivity of the PCR-ELISA assay. A 1 log₁₀ increase in sensitivity was obtained after extraction and purification of the DNA from the gel. In the range of RNA dilutions from 10⁻⁶ to 10⁻⁴ the absorbance of the gel-purified PCR product increased proportionately with the amount of RNA. Meanwhile, in the case when a 10⁻⁴ dilution of the extracted RNA was used, a plateau was reached in the PCR-ELISA assay. After that point where nearly constant OD₄₅₀ reading of more than 3.8 was observed, a semi-quantitative evaluation of the viral load is not expected to be reliable any more (Fig. 5B). While the detection limit of gel-purified PCR products by PCR-ELISA assay was the same as for the classical RT-PCR (10⁻⁵), the newly developed real-time RT-PCR assay had a significantly higher detection limit (10⁻⁷) corresponding to 0.68 PFU/ml of the virus sample. In terms of EAV RNA detection in all 40 semen samples the real-time RT-PCR showed a high degree of concordance with the PCR-ELISA of gel-purified PCR products (Supplementary Table 2).

The PCR-ELISA method developed in our laboratory was found to be both relatively demanding and time consuming as the laborious post-PCR extraction and purification step was required for reliable detection of PCR products. Real-time RT-PCR offers significant improvements to the quantification of viral load because of its enormous dynamic range that can accommodate at least 8 log₁₀ copies of nucleic acid template (Ishiguro et al., 1995). Under the conditions described in our study, the sensitivity of real-time RT-PCR was found to be superior to the PCR-ELISA assay.

DNA probes with conjugated MGB groups form extremely stable duplexes with single-stranded DNA targets, allowing shorter probes to be used for hybridization-based assays (Kutyavin et al., 2000). This makes MGB probes quite attractive for use in RNA virus detection having relatively variable genomes characterized by very short highly conserved gene regions.

In summary, this study provides comparative data on the sensitivity of different molecular methods that are currently being used in our laboratory for reliable detection of EAV in semen samples.

Acknowledgments

The authors wish to thank Matjaž Petrovič for collecting the semen samples, Darinka Bizjak for taking care of the cells and

Ferenc László for advice, useful discussion and technical assistance. We are grateful to Dr. David G. Westcott (Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, UK) for the generous gift of reference virus and cells. This work has been supported by a research Grant from the Slovenian Ministry of Higher Education, Science and Technology.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.jviromet.2007.07.019](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.07.019).

References

- Archambault, D., Laganier, G., Carman, S., St-Laurent, G., 1997. Comparison of nucleic and amino acid sequences and phylogenetic analysis of open reading frames 3 and 4 of various equine arteritis virus isolates. *Vet. Res.* 28, 505–516.
- Balasuriya, U.B.R., Timoney, P.J., McCollum, W.H., MacLachlan, N.J., 1995. Phylogenetic analysis of open reading frame 5 of field isolates of equine arteritis virus and identification of conserved and nonconserved regions in the GL envelope glycoprotein. *Virology* 214, 690–697.
- Balasuriya, U.B.R., Hedges, J.F., Nadler, S.A., McCollum, W.H., Timoney, P.J., MacLachlan, N.J., 1999. Genetic stability of equine arteritis virus during horizontal and vertical transmission in an outbreak of equine viral arteritis. *J. Gen. Virol.* 80, 1949–1958.
- Balasuriya, U.B.R., Leutenegger, C.M., Topol, J.B., McCollum, W.H., Timoney, P.J., MacLachlan, N.J., 2002. Detection of equine viral arteritis virus by real-time TaqMan® reverse transcription-PCR assay. *J. Virol. Methods* 101, 21–28.
- Balasuriya, U.B.R., Hedges, J.F., Smalley, V.L., Navarette, A., McCollum, W.H., Timoney, P.J., Snijder, E.J., MacLachlan, N.J., 2004. Genetic characterization of equine arteritis virus during persistent infection of stallions. *J. Gen. Virol.* 85, 379–390.
- Belák, S., Ballagi-Pordany, A., Timoney, P.J., McCollum, W.H., Little, T.V., Hyllseth, B., Klingeborn, B., 1994–1994. Evaluation of nested PCR assay for the detection of equine arteritis virus. In: *Proceedings of the 7th International Conference on Equine Infectious Diseases*, Tokyo. R&W Publications Limited, Newmarket, United Kingdom, pp. 33–38.
- Cavanagh, D., 1997. *Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae*. *Arch. Virol.* 142, 629–633.
- Chirnside, E.D., Spaan, W.J.M., 1990. Reverse transcription and cDNA amplification by the polymerase chain reaction of equine arteritis virus (EAV). *J. Virol. Methods* 30, 133–140.
- Chirnside, E.D., Wearing, C.M., Binns, M.M., Mumford, J.A., 1994. Comparison of M and N gene sequences distinguishes variation amongst equine virus isolates. *J. Gen. Virol.* 75, 1491–1497.
- den Boon, J.A., Snijder, E.J., Chirnside, E.D., de Vries, A.A., Horzinek, M.C., Spaan, W.J., 1991. Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronavirus-like superfamily. *J. Virol.* 65, 2910–2920.
- de Vries, A.A.F., Chirnside, E.D., Horzinek, M.C., Rottier, P.J.M., 1992. Structural proteins of equine arteritis virus. *J. Virol.* 66, 6294–6303.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.66. Department of Genome Sciences and Department of Biology. University of Washington, Seattle, Washington.
- Gilbert, S.A., Timoney, P.J., McCollum, W.H., Dereg, D., 1997. Detection of equine arteritis virus in the semen of carrier stallions by using a sensitive nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2181–2183.
- Glaser, A.L., de Vries, A.A.F., Rottier, P.J., Horzinek, M.C., Colenbrander, B., 1996. Equine arteritis virus: a review of clinical features and management aspects. *Vet. Quart.* 18, 95–99.
- Hedges, J.F., Balasuriya, U.B.R., Timoney, P.J., McCollum, W.H., MacLachlan, N.J., 1999. Genetic divergence with emergence of phenotypic variants of equine arteritis virus during persistent infection of stallions. *J. Virol.* 73, 3672–3681.
- Hornýák, Á., Bakonyi, T., Tekes, G., Szeredi, L., Rusvai, M., 2005. A novel subgroup among genotypes of equine arteritis virus: genetic comparison of 40 strains. *J. Vet. Med. B* 52, 112–118.
- Huovilainen, A., Ek-Kommonen, C., 1998. Equine viral arteritis, current status in Finland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 440, 649–653.
- Ishiguro, T., Saitoh, J., Yawata, H., Yamagishi, H., Iwasaki, S., Mitoma, Y., 1995. Homogeneous quantitative assay of Hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalator. *Anal. Biochem.* 229, 207–213.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Kumar, S., Reed, M.W., Gamper, H.B., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Foti, M., West, J., Meyer, R.B., Schweitzer, B.I., 1998. Solution structure of a highly stable DNA duplex conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 26, 831–838.
- Kutyavin, I.V., Afonina, I.A., Mills, A., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Belousov, E.S., Singer, M.J., Walburger, D.K., Lokhov, S.G., Gall, A.A., Dempcy, R., Reed, M.W., Meyer, R.B., Hedgpeth, J., 2000. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* 28, 655–661.
- Larsen, L.E., Storgaard, T., Holm, E., 2001. Phylogenetic characterization of the GL sequences of equine arteritis virus isolated from semen of asymptomatic stallions and fatal cases of equine arteritis in Denmark. *Vet. Microbiol.* 80, 339–346.
- Mittelholzer, C., Stadejek, T., Johansson, I., Baule, C., Ciabatti, I., Hannant, D., Paton, D., Autorino, G.L., Nowotny, N., Belák, S., 2006. Extended phylogeny of equine arteritis virus: division into new subgroups. *J. Vet. Med. B* 53, 55–58.
- Patton, J.F., Balasuriya, U.B.R., Hedges, J.F., Schweidler, T.M., Hullinger, P.J., MacLachlan, N.J., 1999. Phylogenetic characterization of a highly attenuated strain of equine arteritis virus from the semen of a persistently infected Standardbred stallion. *Arch. Virol.* 144, 817–827.
- Ramina, A., Dalla Valle, L., De Mas, S., Tisato, E., Zuin, A., Renier, M., Cuteri, V., Valente, C., Cancellotti, F.M., 1999. Detection of equine arteritis virus in semen by reverse transcriptase polymerase chain reaction-ELISA. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 187–197.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 (4), 406–425.
- Snijder, E.J., van Tol, H., Pedersen, K.W., Raamsman, M.J.B., de Vries, A.A.F., 1999. Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *J. Virol.* 73, 6335–6345.
- Stadejek, T., Björklund, H., Ros Bascuñana, C., Ciabatti, I.M., Scicluna, M.T., Amadeo, D., McCollum, W.H., Autorino, G.L., Timoney, P.J., Paton, D.J., Klingeborn, B., Belák, S., 1999. Genetic diversity of equine arteritis virus. *J. Gen. Virol.* 80, 691–699.
- Starick, E., 1998. Rapid and sensitive detection of equine arteritis virus in semen and tissue samples by reverse transcription-polymerase chain reaction, dot blot hybridization and nested polymerase chain reaction. *Acta Virol.* 42, 333–339.
- St-Laurent, G., Morin, G., Archambault, D., 1994. Detection of equine arteritis virus following amplification of structural and non-structural viral genes by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32, 658–665.
- St-Laurent, G., Lepage, N., Carman, S., Archambault, D., 1997. Genetic and amino acid analysis of the GL protein of Canadian, American and European equine arteritis virus isolates. *Can. J. Vet. Res.* 61, 72–76.
- Szeredi, L., Hornýák, Á., Dénes, B., Rusvai, M., 2003. Equine viral arteritis in a newborn foal: parallel detection of the virus by immunohistochemistry, polymerase chain reaction and virus isolation. *J. Vet. Med. B* 50, 270–274.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876–4882.

- Timoney, P.J., McCollum, W.H., Roberts, A.W., Murphy, T.W., 1986. Demonstration of the carrier state in naturally acquired equine arteritis virus infection in the stallion. *Res. Vet. Sci.* 41, 279–280.
- Timoney, P.J., McCollum, W.H., 1993. Equine viral arteritis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 9, 295–309.
- Westcott, D.G., King, D.P., Drew, T.W., Nowotny, N., Kindermann, J., Hannant, D., Belák, S., Paton, D.J., 2003. Use of an internal standard in a closed one-tube RT-PCR for the detection of equine arteritis virus RNA with the fluorescent probes. *Vet. Res.* 34, 165–176.