

# MOLEKULARNA I SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA ZARAZNE LEUKEMIJE MAČAKA

---

Ferenčić, Lara

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:948271>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Lara Ferenčić

**MOLEKULARNA I SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA ZARAZNE LEUKEMIJE  
MAČAKA**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnik: prof. dr. sc. Vilim Starešina

Mentori: doc. dr. sc. Matko Perharić  
izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Zrinka Štritof
2. Prof. dr. sc. Vilim Starešina
3. Doc. dr. sc. Matko Perharić
4. Izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš (zamjena)

## *Zahvale*

*Želim zahvaliti svojim mentorima doc. dr. sc. Matku Perhariću i izv. prof. dr. sc. Josipi Habuš na vodstvu, predanosti i stručnim smjernicama, koje ste mi omogućili tijekom mog pisanja ovog rada. Hvala na strpljenju i ohrabrivanju te spremnosti da odgovorite na moja brojna pitanja. Vaša podrška bila je temelj za oblikovanje i završetak mog diplomskog.*

*Zahvale i dr.sc. Vesni Mojčec Perko za Vašu nesebičnu pomoć i stručnost koju ste mi pružili tijekom mog istraživanja. Vaše mentorstvo u laboratoriju bilo je ključno za uspjeh mog istraživanja, a podrška i vođenje kroz rad omogućili su mi vidjeti ljepotu ove grane veterinarske medicine.*

*Hvala mojim prijateljima, kolegama i ostalima s kojima mi se put studiranja spojio, a koji ste vrijeme studija učinili neizmjerljivo ljepšim i lakšim. Koji ste bili tu sa mnom kad je trebalo proslaviti uspjehe i stup podrške kad je bilo teško. Sa mnom dijelili vrijednosti i vjerovali u mene kad ja nisam.*

*Beskrajno hvala Nineku koji je prošao sve moje uspone i padove zajedno sa mnom. On zaslužuje svoju diplomu.*

*Hvala mojoj obitelji koja me naučila vrijednostima u životu i omogućila mi da nađem svoj put. Vaša podrška i strpljenje, kritike i navijanja tijekom mog studiranja bili su neopisivo neprocjenjivi za ovaj uspjeh.*

*Hvala meni što sam ustrajala, ustrajem i ustrajat ću (na putu prema sebi).*

*Ovaj rad posvećujem svojoj mami.*

## POPIS KRATICA

μL - mikrolitar

AZT (engl. *Azidothymidine*) - zidovudin

bp (engl. *Base pair*) – bazni par

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

dNTP (engl. *deoxynucleotide triphosphate*) - deoksinukleozid trifosfat

EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) – etilendiamintetraoctena kiselina

ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – imunoenzimski test

*env* – gen za sintetiziranje površinskih proteina ovojnice

ERV-DC (engl. *endogenous gammaretrovirus of the domestic cat (Felis silvestris catus)*)–  
endogeni gamaretrovirus domaće mačke

FAE (engl. *FeLV-associated enteritis*) - enteritis povezan sa virusom zarazne leukemije  
mačaka

FCV (engl. *feline calicivirus*) – mačji kalicivirus

FeLIX – protein ovojnice FeLV-a kodiran od endogenog FeLV-a

FeLV (engl. *feline leukemia virus*) – virus zarazne leukemije mačaka

FeLV-U3LTR – regija virusa

FeSV (engl. *feline sarcoma virus*) – virus mačjeg sarkoma

FIP (engl. *feline infectious peritonitis*) – zarazni peritonitis mačaka

FIV (engl. *feline immunodeficiency virus*) – virus mačje imunodeficijencije

FPLS (engl. *feline panleukopenia-like syndrome*) – panleukopeniji sličan sindrom u mačaka

FPV (engl. *feline parvovirus*) – mačji parvovirus

*gag* – gen za sintezu strukturnih proteina virusne čestice

gp70 – površinski glikoproteini ovojnice FeLV-a

IFA (engl. *Immunofluorescence assay*) – imunofluorescentni test

IgG - imunoglobulin razreda G

IgM - imunoglobulin razreda M

IMHA (engl. *immune mediated haemolytic anaemia*) – imunološki posredovana hemolitička anemija

mA - miliamper

p15E – transmembranski protein FeLV-a

p27 – kapsidni protein FeLV-a

PCR (engl. *polymerase chain reaction*) – lančana reakcija polimerazom

Pit1 – receptori stanice domaćima za ulazak FeLIX-a u stanicu

*pol* – gen prekursor enzima reverzne transkriptaze

RNK – ribonukleinska kiselina

RT – reverzna transkriptaza

RT-PCR (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*) – lančana reakcija polimerazom sa reverznom transkripcijom

TAE (engl. *Tris-acetate-EDTA*) – Tris-octena kiselina-EDTA

UV (engl. *ultraviolet*) - ultraljubičasto

## **POPIS PRILOGA**

### **Popis slika**

**Slika 1.** Struktura virusa zarazne leukemije mačaka

**Slika 2.** Mogući ishodi infekcije FeLV-om

**Slika 3.** IDEXX SNAP FIV/FeLV Combo Test. FeLV pozitivan, FeLV i FIV pozitivan, FIV pozitivan

**Slika 4.** Rezultat elektroforeze dobiven ugniježđenom PCR reakcijom

### **Popis tablica**

**Tablica 1.** Reagensi iz Takara Taq DNA polymerase, hot start komercijalnog kompleta

**Tablica 2.** Početnice korištene za vanjsku i unutarnju PCR reakciju, za utvrđivanje prisutnosti provirusne DNK FeLV-a

**Tablica 3.** Protokol vanjske PCR reakcije

**Tablica 4.** Protokol unutarnje PCR reakcije

**Tablica 5.** Usporedba rezultata ELISA testa i ugniježdene PCR

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	2
2.1. Etiologija .....	2
2.2. Epizootiologija.....	3
2.3. Patogeneza .....	5
2.4. Klinička slika.....	7
2.4.1. Neoplazije .....	8
2.4.2. Hematopoetski poremećaji.....	9
2.4.3. Imunoposredovane bolesti .....	10
2.4.4. Imunodeficijencija .....	10
2.4.5. Ostali sindromi.....	11
2.5. Dijagnostika.....	12
2.5.1. ELISA (imunoenzimski test, eng. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ) za dokaz p27 antigena.....	12
2.5.2. IFA (Imunofluorescentni test, engl. <i>Immunofluorescence assay</i> ).....	12
2.5.3. PCR (lančana reakcija polimerazom, engl. <i>polymerase chain reaction</i> ) za dokaz provirusne DNK.....	13
2.5.4. RT-PCR (lančana reakcija polimerazom sa reverznom transkripcijom, engl. <i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> ) za dokaz virusne RNK.....	14
2.6. Liječenje i prognoza .....	14
2.7. Prevencija .....	15
2.8. Javno zdravstvo .....	16
3. MATERIJALI I METODE .....	17
3.1. Materijali .....	17
3.2. Metode.....	17
3.2.1. ELISA (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ).....	17



3.2.2. Izdvajanje DNK .....	18
3.2.3. Ugniježdjena lančana reakcija polimerazom (engl. <i>nested PCR</i> ) .....	18
3.2.4. Elektroforeza u agaroznom gelu .....	21
3.2.4.1. Postupak pripreme TAE pufera.....	22
3.2.4.2. Postupak pripreme agaroznog gela .....	23
3.2.4.3. Nanošenje PCR proizvoda na gel, provođenje elektroforeze i očitavanje rezultata.....	23
4. REZULTATI.....	24
4.1. Pretraživanje ELISA testom .....	24
4.2. Rezultati ugniježdjene lančane reakcije polimerazom .....	24
4.3. Usporedba rezultata ELISA testa i ugniježdjene PCR.....	25
5. RASPRAVA.....	27
6. ZAKLJUČCI.....	31
7. LITERATURA.....	32
8. SAŽETAK.....	42
9. SUMMARY .....	43
10. ŽIVOTOPIS .....	44

## 1. UVOD

Virus zarazne leukemije mačaka (engl. *feline leukemia virus* - FeLV) je bolest koja uzrokuje poremetnju funkcije hematopoetskog i imunološkog sustava te nastanak neoplazija. Inficira domaće i nekoliko vrsta divljih mačaka. Uz virus mačje imunodeficijencije (engl. *feline immunodeficiency virus* - FIV) spada u najčešće zarazne bolesti mačaka, a infekcija tim bolestima je doživotna. Virus zarazne leukemije mačaka je RNK virus i pripada porodici *Retroviridae*, čiji predstavnici sadrže enzime reverznu transkriptazu (RT) i integrazu pomoću kojih se nastali provirus ugrađuje u genom domaćina. Nakon infekcije moguća su četiri ishoda. Kod abortivne infekcije nakon umnažanja virusa u limfnim čvorovima dolazi do potpunog uklanjanja virusa iz organizma. Progresivna infekcija obuhvaća infekciju limfnih čvorova, primarnu viremiju, infekciju koštane srži te perzistentnu, sekundarnu viremiju. Infekcija koja je nakon primarne viremije zaustavljena, ali virus nije uklonjen iz organizma naziva se regresivnom infekcijom. Fokalna infekcija je infekcija kod koje je umnažanje virusa ograničeno na samo jedno tkivo ili organ. Na početku bolesti često se javljaju opći klinički znakovi bolesti, a kasnije se javljaju razni sindromi, uglavnom kod progresivne infekcije, a uključuju neoplazije, hematopoetske poremećaje, imunološki posredovane bolesti, imunodeficijenciju, neurološke poremećaje, stomatitis, reproduktivne poremećaje, oportunističke infekcije i dr. Liječenje infekcije FeLV-om uključuje antivirusne lijekove i imunomodulatore, a popratni sindromi liječe se kao i kod mačaka slobodnih od FeLV-a.

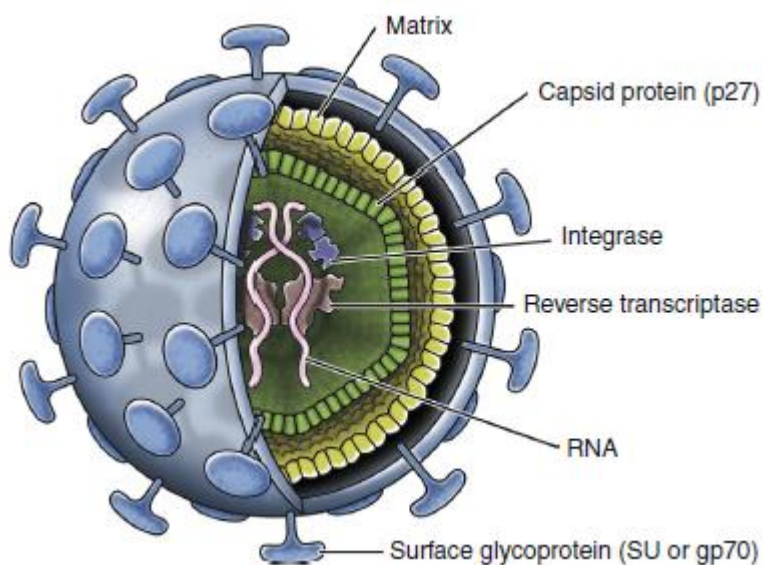
Metode koje se najčešće koriste za dijagnostiku FeLV-a su serološka metoda ELISA (imunoenzimni test) kojom se dokazuje prisustvo p27 antigena virusa i molekularna metoda PCR (lančana reakcija polimerazom) za dokazivanje provirusne DNK. Brzi, ELISA testovi prvi su izbor kod sumnje na ovu bolest, a pozitivan nalaz označava prisustvo p27 antigena u cirkulaciji. Ovaj test važno je ponavljati zbog potvrde pozitivnog rezultata i određivanja stadija bolesti. Molekularna metoda koristi se za potvrdu ELISA testa ili kao dokaz regresivne infekcije. Naime, PCR igra važnu ulogu u otkrivanju provirusa koji je integriran u genom domaćina, ali infekcija nije aktivna, odnosno nema umnažanja virusa.

Cilj ovog rada je usporedba podudarnosti dviju metoda dijagnostike, ELISA-e i ugniježđenog PCR-a, i njihova uloga u kasnijem menadžmentu životinja pozitivnih na infekciju zarazne leukemije mačaka.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Etiologija

Virus zarazne leukemije mačaka je RNK virus koji pripada porodici *Retroviridae*, podporodici *Orthoretrovirinae*, rodu *Gammaretrovirus*. Ikozaedrnog je oblika. Jezgra sadrži dva identična lanca RNK i enzime te je okružena kapsidom u koju je integriran protein p27. Ovaj protein važan je jer se koristi kao ciljani antigen u serološkim testovima. Oko kapside nalazi se matriks, a sve zajedno je obavijeno fosfolipidnom membranom – ovojnicom virusa. Ona sadrži gp70 glikoproteine i p15E transmembranske proteine (Slika 1.) (SYKES i HARTMANN, 2021.).



Slika 1. Struktura virusa zarazne leukemije mačaka. (SYKES i HARTMANN, 2021.)

Virus zarazne leukemije sadrži 3 strukturna gena koja su važna u infekciji žive stanice, njihovu prepoznavanju i vezanju za njih: *gag*, *pol* i *env*. *Gag* započinje sintezu strukturnih proteina virusne čestice, *pol* gen je prekursor enzima reverzne transkriptaze, a *env* sintetizira površinske proteine ovojnice (HARTMANN, 2011.a).

Virus se nakon ulaska u stanicu domaćina umnaža načinom specifičnim za sve retroviruse. RNK genom se pomoću enzima reverzne transkriptaze (RT) prepisuje u DNK.

Sintetizirana DNK se pomoću enzima integraze ugrađuje u genom domaćina. Ovaj integrirani DNK oblik virusa nazivamo provirus. Provirus ostaje u genomu domaćina doživotno te se umnaža zajedno sa umnažanjem samih stanica domaćina, a tijekom mitozu stanica stvaraju se subvirusne čestice FeLV-a (WILLET i HOSIE, 2012.).

Zbog lipidne ovojnice ovaj je virus vrlo osjetljiv na okolišne uvjete. Izvan domaćina na sobnoj temperaturi može preživjeti vrlo kratko, do 3 sata, u ostatcima sekreta i ekskreta kao što su slina, iscjedak iz nosa ili oka, urin ili feces. U vlažnim uvjetima infektivan može ostati i do 48 sati. Inaktiviraju ga uobičajeni dezinficijensi, sapuni i isušivanje (SYKES i HARTMANN, 2021.).

Do danas je otkriveno 6 podtipova virusa zarazne leukemije mačaka: FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C, FeLV-D, FeLV-E i FeLV-T, koji se razlikuju prema receptorima pomoću kojih ulaze u stanicu domaćina, a u određenoj mjeri, i kliničkom očitovanju bolesti. Trenutno se smatra da je isključivo FeLV-A infektivni oblik, odnosno virusni podtip koji se prenosi među životinjama. FeLV-B nastaje rekombinacijom FeLV-A provirusne DNK i endogene sekvence FeLV-a koji se nalazi u genomu domaćina (STEWART i sur., 1986.). FeLV-C nastaje kao posljedica mutacija ili insercija u *env* gen FeLV-A (BROJATSCH i sur., 1992.). FeLV-D je rezultat rekombinacije egzogenog FeLV-a i endogenog retrovirusa (ERV-DC) koji postoji u genomu mačaka, a različit je od endogenog FeLV-a. FeLV-E nedavno je otkriven podtip i još nije poznat način njegovog nastanka, a FeLV-T nastaje uslijed točkastih mutacija na FeLV-A *env* genu (CANO-ORTIZ i sur., 2022.). Pojedini podtipovi češće se povezuju s određenim kliničkim očitovanjima. Kod FeLV-B podtipa najčešće se javljaju limfomi i neuropatije, FeLV-C uzrokuje neregenerativnu anemiju, a FeLV-T povezuje se sa imunodeficijencijom (SYKES i HARTMANN, 2021.).

## **2.2. Epizootiologija**

Virus zarazne leukemije mačaka inficira domaće i nekoliko vrsta divljih mačaka (BENVENISTE i sur., 1975.). Epizootiološko istraživanje FeLV-a u razdoblju 2008.-2016. u kojem je sudjelovalo 68 država, ukazalo je na izraženu varjabilnost u pojavnosti; Sjeverna Europa imala je prevalenciju od 7%, a Južna Europa 12% (BUCH i sur., 2017.). Drugo pan-europsko istraživanje, za koje su se uzorci iz slin uzimali od rujna 2016. do ožujka 2017. godine, utvrdilo je ukupnu prevalenciju od 2,3%. Ovaj podatak nam govori da je prevalencija

bolesti vjerojatno smanjena primjenom smjernica za prevenciju i vakcinaciju, no autori teksta smatraju da bi se striktnim pridržavanjem preporuka mogli postići još bolji rezultati (STUDER i sur., 2019.). U istraživanju u Hrvatskoj, u urbanom području Zagreba, dokazana je visoka ukupna seroprevalencija od 14,5%. Značajna razlika utvrđena je kad su se uspoređivale prevalencije bolesti u mačaka lualica (6,06%) i mačaka u vlasništvu (18,22%), dok se prevalencija u muških i ženskih mačaka nije značajno razlikovala. Prosječna dob pozitivnih mačaka oba spola bila je 4,3 godine (PERHARIĆ i sur., 2018.).

Glavni izvor infekcije su progresivno inficirane mačke. Virus se nalazi u najvećim koncentracijama u slini, zatim nosnom sekretu, očnom iscjetku, urinu i fecesu. Moguće je i transplacentarni i prijenos putem mlijeka (HOFMANN-LEHMANN i HARTMANN, 2020.; LITTLE i sur., 2020.)

Do horizontalnog prijenosa najčešće dolazi tijekom izravnog, bliskog kontakta među životinjama međusobnim uređivanjem. Rjeđi način prijenosa izravnim kontaktom je preko ugriza tijekom međusobnih borbi. Neizravni prijenos je moguć, a najčešći je u kućanstvima s više mačaka gdje životinje dijele posude za hranu i vodu ili posude s pijeskom i virus se prenosi slinom, isjetkom iz nosa ili očiju te urinom i fecesom (HARDY i sur., 1976.). Vertikalni prijenos je moguć kod progresivno inficiranih mačaka, a najčešće posljedice su embrionalna smrt, mrtvorodenje i viremija u novorođenih mačića. Opisani su i slučajevi prijenosa infekcije na mačiće nakon konzumacije kolostruma i mlijeka regresivno inficiranih mačaka (PACITTI i sur., 1986.). Prijenos virusa moguć je i putem transfuzije krvi, što je vrlo značajno budući da se i u tim slučajevima infekcija može prenijeti i s regresivno inficirane mačke (NESINA i sur., 2015.).

Ulazna vrata su obično nosna sluznica ili sluznica usne šupljine, a primarno umnažanje virusa započinje u tonzilama (HOFMANN-LEHMANN i HARTMANN, 2020.).

Veća prevalencija infekcije zabilježena je u vanjskih mačaka, kućanstvima s više mačaka, općenito u mačaka koje imaju kontakt s drugim mačkama, mačkama sa potvrđenim FIV-om, te općenito unutar populacije bolesnih i imunokompromitiranih životinja, odraslih životinja, nekastriranih muških mačaka, odnosno svih onih koji ispoljavaju agresivno ponašanje (LEVY i sur., 1991.). Razvoj progresivne infekcije ovisna je o dobi; mlađe životinje imaju veći rizik od razvoja progresivnih infekcija. S druge strane, kumulativni učinak izlaganja virusu uzrokuje veću prevalenciju infekcije u odraslih mačaka (LITTLE i sur., 2020.). Preživljavanje progresivno inficiranih mačaka ovisiti će pak o tome koliko je rano infekcija dijagnosticirana i odgovarajućoj veterinarskoj skrbi (HARTMANN, 2011.a).

### 2.3. Patogeneza

Poznato je da virus mačje leukemije ima afinitet prema stanicama koje se brzo dijele, naglašeno je limforetikulotropan i epiteliotropan (ROJKO i sur., 1978.). U organizam primljivih životinja najčešće ulazi oronazalno, a primarno mjesto umnažanja su tonzile, odnosno područni limfni čvorovi. Dolazi do primarne viremije, a prema drugim tkivima putuje u inficiranim limfocitima i monocitima. Ukoliko dođe do infekcije koštane srži (u životinja sa slabijim imunološkim odgovorom), virus umnažanje nastavlja u prekursorima neutrofila i trombocita. Zreli neutrofil i trombociti koji sadrže FeLV otpuštaju se u krvotok te nastaje sekundarna viremija. Nakon viremije slijedi infekcija mukoznih i žljezdanih epitelnih stanica FeLV-om čime započinje izlučivanje virusa, u najvećoj koncentraciji preko slinske žlijezde (ROJKO i sur., 1979.).

Ishod infekcije FeLV-om ovisi o imunološkom sustavu mačke, virulenciji soja i infektivnoj dozi. Nakon infekcije moguća su četiri različita ishoda temeljem čega infekciju dijelimo na abortivnu, progresivnu, regresivnu i fokalnu (TORRES i sur., 2005.).

Abortivna infekcija je infekcija kod koje je primarno umnažanje virusa u limfnim čvorovima zaustavljeno reakcijom imunološkog sustava, virus se uklanja iz organizma i nikad ne dođe do viremije. Ovakav ishod imamo kod mačaka s dobrim imunološkim odgovorom i kod mačaka koje su došle u kontakt s malom koncentracijom virusa (npr. fecesom zaraženih životinja). Abortivna infekcija može se potvrditi jedino dokazivanjem prisutnosti specifičnih protutijela. Antigeni testovi i lančana reakcija polimerazom koja dokazuje virusnu RNK i/ili provirusnu DNK bit će negativni (Slika 2.) (GOMES-KELLER i sur., 2009.; MAJOR i sur., 2010.).

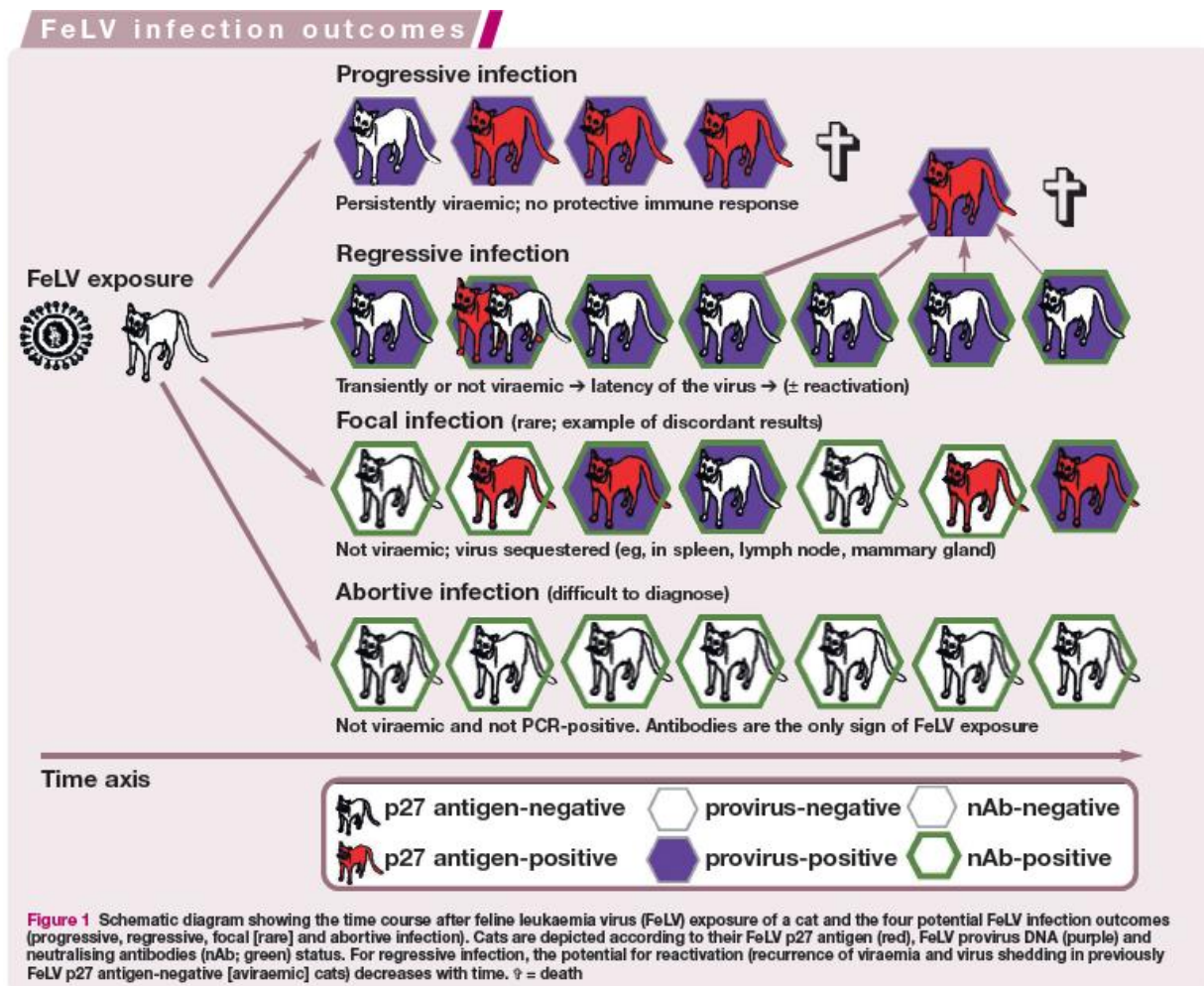
Regresivna infekcija javlja se kod mačaka čiji je imunološki sustav adekvatno reagirao na infekciju, ali nije uspio potpuno ukloniti virus iz organizma. Kod ovog oblika infekcije, nakon ulaska virusa dolazi do primarne viremije, a može, iako rijetko, doći i do infekcije koštane srži (PEPIN i sur., 2007.). U tom, ranom stadiju infekcije moguće je dijagnosticirati bolest testovima koji dokazuju prisustvo FeLV antigena, provirusnu DNK i virusnu RNK, a te mačke predstavljaju izvor infekcije za prijemljive životinje. Uslijed jakog imunološkog odgovora, najčešće unutar 1-12 tjedana, infekcija ipak bude zaustavljena pa u krvi više ne možemo naći cirkulirajući antigen (HOFMANN-LEHMANN i sur., 1995.). Međutim, zbog integracije provirusne DNK u genom domaćina, sam virus nije potpuno uklonjen iz organizma. Upravo zbog toga su, u tom slučaju, dijagnostički testovi koji dokazuju FeLV antigen i virusnu

RNA su negativni, a oni koji dokazuju provirusnu DNK pozitivni (Slika 2.). Zbog izražene imunološke reakcije titar virus-neutralizirajućih protutijela je visok pa se i ona mogu detektirati (HOFMANN-LEHMANN i sur., 2001.). U mačaka s regresivnom infekcijom virus zarazne leukemije se ne umnožava i one nisu izvor infekcije za druge prijemljive životinje. Iznimka je prijenos virusa transfuzijom krvi, kada se provirusna DNK može integrirati u genom primatelja i uzrokovati viremiju te bolesti povezane s FeLV-om (NESINA i sur., 2015.). Također, u pravilu kod regresivne infekcije ne dolazi do fatalnih bolesti uzrokovanih FeLV-om, no opisana je pojava limfoma i supresije koštane srži antigen-negativnih mačaka (STUTZER i sur., 2010.). Ukoliko dođe do imunosupresije regresivno inficirane mačke (graviditet, liječenje glukokortikoidima, opterećenost drugim patogenima), virus se može ponovo početi umnažati, a infekcija prelazi u progresivnu fazu (KADAR i sur., 2005.).

Od progresivne infekcije najčešće obole jedinke sa slabim imunološkim odgovorom. Kod njih nakon primarne viremije i infekcije koštane srži dolazi do perzistentne, sekundarne viremije. Progresivno inficirane mačke doživotno su izvor infekcije za druge prijemljive životinje, pa ih se zato preporuča držati odvojeno od ostalih, zdravih mačaka. Kod ovih mačaka dijagnostički testovi koji dokazuju prisustvo FeLV antigena, virusnu RNK i provirusnu DNK biti će pozitivni, a protutijela uglavnom nisu detektibilna (Slika 2.).

Fokalna ili atipična infekcija najrjeđi je oblik i nastaje kada imunološki sustav ograniči umnožavanje virusa na samo jedno tkivo ili organ, npr. slezena, koštana srž, limfni čvor, tanko crijevo, mokraćni sustav ili mliječna žlijezda (HAYES i sur., 1992.; HOFMANN-LEHMANN i HARTMANN, 2020.). U takvih mačaka testovi za FeLV antigen su često pozitivni, a stanice s integriranim provirusom ostaju unutar zaraženog tkiva pa su testovi za provirusnu DNK i virusnu RNK u krvi uglavnom negativni. Anti-FeLV protutijela su prisutna (Slika 2.). Rezultati često alteriraju i zbunjujući su, stoga se fokalna infekcija može zamijeniti za početni stadij infekcije FeLV-om. Epizootiološki ova infekcija nije značajna (HAYES i sur., 1989.; HOFMANN-LEHMANN i HARTMANN, 2020.).

Kako bismo sa sigurnošću mogli utvrditi o kojem se stadiju infekcije uistinu radi potrebno je kombinirati i ponavljati različite vrste dijagnostičkih testova (PEPIN i sur., 2007.).



Slika 2. Mogući ishodi infekcije FeLV-om. (HOFMANN-LEHMANN i HARTMANN, 2020.)

## 2.4. Klinička slika

Na početku infekcije u razdoblju primarne viremije kod nekih se mačaka javljaju opći znakovi bolesti kao što su vrućica, letargija, blijede sluznice, petehije, dehidracija i limfadenopatija, a neke nemaju nikakvih kliničkih promjena (SYKES i HARTMANN, 2014.). Daljnji razvoj kliničke slike ovisit će o samom ishodu infekcije. Kliničke znakove bolesti, kao i skraćen životni vijek, povezujemo uglavnom s razvojem progresivne infekcije. Iako bolest čak i u progresivno inficiranih životinja može duže vrijeme biti asimptomatska, progresivne infekcije dovode do razvoja kompleksne imunodeficijencije. Posljedično, ove su životinje sklonije razvoju raznih oportunističkih infekcija ili infekciji uzročnicima drugih zaraznih bolesti. Mogu se javiti bakterijske infekcije mokraćnog sustava, infekcije gornjeg dišnog sustava, zarazni peritonitis mačaka, kronični stomatitis, toksoplazmoza, dermatofizota,



kriptokokoza, infekcija hemotropnim mikoplazmama, itd. Prevalencija tih bolesti ne povećava se uz FeLV, ali su klinički znakovi teži i odgovor na liječenje je slabiji. (SYKES i HARTMANN, 2021.).

Osim navedene imunodeficijencije, progresivno inficirane mačke mogu razviti neoplazije, hematopoetske poremećaje, imunološki posredovane bolesti, neurološke poremećaje, stomatitis, gastrointestinalne bolesti, reproduktivne poremećaje (ROJKO i sur., 1988.; HARTMANN, 2012.). Iako je bolest dobila ime po pojavi neoplazija, one nisu najčešći nalaz kod inficiranih mačaka. Razne koinfekcije bile su najčešći nalaz u jednom istraživanju (15%), zatim anemija (11%), limfomi (6%), leukopenija i trombocitopenija (5%) te leukemija i mijeloproliferativne bolesti (4%) (COTTER, 1991.).

#### **2.4.1. Neoplazije**

Najčešće neoplazije koje se povezuju s FeLV infekcijom su limfomi i leukemija. Mačke zaražene FeLV-om imaju 62 puta veću šansu oboljeti od limfoma od zdravih mačaka (POLI i sur., 1994.). Onkogeni učinak virusa povezuje se sa sposobnošću FeLV-a da aktivira proto-onkogene, ometa ekspresiju tumor supresorskih gena (FUJINO i sur., 2008.) ili formira rekombinantni virus koji sam sadrži stanične onkogene (TSATSANIS i sur., 1994.). Najčešći tipovi limfoma koji se javljaju su T-limfocitni medijastinalni, multicentrični, spinalni, renalni i okularni limfomi. Klinički znakovi vezani su uz organ ili organski sustav koji je zahvaćen tumorom. Neoplastične promjene češće su u mladim mačaka, dok su starije sklonije razvoju drugih sindroma povezanih sa FeLV-a (LOUWERENS i sur., 2005.). Značajno je da je oko 80% mačaka s medijastinalnim limfomom pozitivno na FeLV antigen (KIRCK i sur., 2008.). Iako su tumori posljedica progresivne infekcije, neka istraživanja pokazuju da se limfomi mogu pojaviti i u regresivno inficiranih mačaka, posebno u kućanstvima mačaka s endemičnom FeLV infekcijom (JACKSON i sur., 1993.).

FeLV je najčešći uzrok svih mijeloičnih leukemija, eritroleukemija, megakariocitnih i limfoidnih leukemija u mačaka. Nadalje, leukemije uzrokovane FeLV-om su pretežito akutne (SYKES i HARTMANN, 2021.). Klinički znakovi povezani su s vrstom leukemije, a uključuju letargiju kod anemije, sepsu kod neutropenije, krvarenja kod trombocitopenije te hepatomegaliju i splenomegaliju kod maligne infiltracije ili ekstramedularne hematopoeze. Prognoza je kod leukemija uzrokovanih FeLV-om loša (HARTMANN, 2011.a).

Fibrosarkomi specifične su neoplazije vezane uz FeLV. FeLV-A rekombinira se sa staničnim onkogenima domaćina i nastaje mačji sarkom virus (FeSV). Zbog te specifičnosti, sve mačke s FeSV-om pozitivne su na FeLV antigen. Ovakvi fibrosarkomi su multifokalni i stvaraju ulcerirane kutane mase koje često metastaziraju u pluća te su stoga vezani uz loše ishode (DONNER i sur., 1982.). FeLV nije povezan sa solitarnim niti vakcinalnim fibrosarkomima (KIDNEY i sur., 2001.).

Drugi tumori opisani u FeLV inficiranih mačaka su olfaktorni neuroblastomi, benigne kožne hiperplazije i osteohondromatoze. Još uvijek nije razjašnjeno da li su i koji od njih posljedica FeLV infekcije ili se pak radi o slučajnom nalazu u mačaka s FeLV-om (HARTMANN, 2011.).

#### **2.4.2. Hematopoetski poremećaji**

Najčešći hematopoetski poremećaji uzrokovani FeLV-om uključuju anemiju, abnormalnosti trombocita, neutropeniju i limfopeniju. FeLV-uzrokovane anemije su u 90% slučajeva neregenerativne (SHELTON i LINENBERGER, 1995.). Uzrok može biti FeLV-C koji uzrokuje aplaziju crvenih krvnih stanica, koja se očituje kao eritrocitna makrocitoza i deplecija eritrodnih prekursora. Aplastična anemija, deficijencija svih staničnih linija, još je jedan oblik koji se može javiti posljedično infekciji FeLV-om. Drugi uzroci mogu biti mijeloptiza sekundarno leukemiji, mijeloidna ili eritroidna displazija, mijelofibroza, inflamatorne bolesti, imunološki posredovana hemolitička anemija (IMHA) koja je relativno česta kod koinfekcija hematotropnim mikoplazmama, te hemoragije kao posljedica trombocitopenije ili poremećene funkcije trombocita (SYKES i HARTMANN, 2021.).

Uzroci trombocitopenije su supresija koštane srži i leukemične infiltracije. Može doći i do imunoposredovane trombocitopenije, koja se često pojavljuje uz imunološki posredovanu hemolitičku anemiju (IMHA). Također, funkcija trombocita može biti promijenjena u FeLV inficiranih trombocita (HARTMANN, 2012.).

Neutropenija nastaje samostalno ili zajedno s drugim citopenijama. FeLV-om inficirani neutrofili imaju smanjenu kemotaktičnu i fagocitnu sposobnost. Neutropenija nastaje kod mijeloidne hipoplazije, mijelofibroze, mijelodisplazije, mijeloptize ili ako dođe do zaustavljanja maturacije u nekom od stadija tijekom diferencijacije. Od značaja je i panleukopeniji sličan sindrom (engl. *feline panleukopenia-like syndrome* - FPLS), znan kao i

enteritis povezan s FeLV-om (engl. *FeLV-associated enteritis* - FAE) ili mijeloblastopenija, koji nalikuje na bolest uzrokovanu mačjim parvovirusom (engl. *feline parvovirus* - FPV). Očituje se izrazitom leukopenijom s normalnim brojem eritrocita i trombocita, enteritisom uz destrukciju epitela kripti crijeva, a simptomi su povraćanje, akutni ili kronični proljev, inapetencija i dehidracija (HARTMANN, 2012.).

Limfopenija nastaje zbog gubitka CD4+ pomoćničkih T-limfocita što za posljedicu ima narušen omjer CD4/CD8 limfocita. (QUACKENBUSH i sur., 1990.). Humoralni imunski odgovor je odgođen i proizvodnja B staničnog stimulatornog faktora je smanjena (DIEHL i HOOVER, 1992.).

### **2.4.3. Imunoposredovane bolesti**

Inficirane mačke mogu razviti različite imunoposredovane bolesti. U inficiranih jedinki može doći do hipergamaglobulinemije, uglavnom uslijed stvaranja veće količine IgG i IgM protutijela. U tim slučajevima nastaju antigen-protutijelo kompleksi koji pogoduju nastanku imunološki posredovanih reakcija i posljedično razvoju hemolitičke anemije (IMHA), glomerulonefritisa, uveitisa, poliartritisa i vaskulitisa (GLICK i sur., 1978.). Ove bolesti mogu potaknuti ne samo cijele virusne čestice, nego i sami slobodni gp70, p27 ili p15E proteini. Primarne imunoposredovane bolesti nisu uobičajene kod mačaka pa je kod njihovog nalaza uvijek indicirano životinje testirati na FeLV (DAY i sur., 1980.).

### **2.4.4. Imunodeficijencija**

Imunodeficijencija je jedna od najvažnijih posljedica FeLV infekcije. Ona pogoduje nastanku sekundarnih infekcija i može uzrokovati smanjenu funkciju mehanizama za nadziranje tumorskog rasta. Bitno je napomenuti da ne moraju sve oportunističke infekcije biti posljedica imunosupresije uzrokovane FeLV-om, no čak i u tom slučaju bolesti koje se javljaju uz FeLV će vjerojatno uzrokovati težu kliničku sliku i slabiji odgovor na liječenje, npr. kriptokokoza, salmoneloza, mikoplazmoza i toksoplazmoza (HARTMANN, 2012.). Način nastanka imunosupresije nije u potpunosti razjašnjen, ali identificirani su proteini, Pit1 i FeLIX, koje sadrže imunosupresivne varijante virusa, kao što je FeLV-T, a imaju afinitet prema T-

limfocitima (LAURING i sur., 2002.). Poviše objašnjene neutropenija i limfopenija učestale su kod imunodefijencije, a dolazi i do atrofije timusa i deplecije parakortikalne zone limfnih čvorova. Kod limfopenije smanjena je imunološka reakcija mačke na cjepivo te je preporuka cijepiti ih češće nego zdrave mačke (HARTMANN, 2012.).

#### **2.4.5. Ostali sindromi**

Ostali sindromi uključuju neuropatije, stomatitis, reproduktivne poremećaje i „fading kitten“ sindrom. Neuropatije su najčešće uzrokovane limfomima ili limfocitnim infiltracijama u mozgu ili kralježničnoj moždini, a u slučajevima bez tumora smatra se da se radi o neurotoksičnosti virusa. Glikoproteini ovojnice povećavaju koncentraciju slobodnog kalcija unutar stanice, što uzrokuje smrt neurona. Najviše neurotoksičnim pokazali su se glikoproteini podtipa FeLV-C (MITSCHELL i sur., 1997.). Javlja se anizokorija, midrijaza, centralna sljepoća, Hornerov sindrom, hiperestezija, pareza i paraliza te urinarna inkontinencija, koja je inače rijedak klinički znak u mačaka (CARMICHAEL i sur., 2002.).

Stomatitis se u retrovirusnih infekcija javlja kao kronični ulceroproliferativni gingivostomatitis. Iako je češći kod FIV-a, uobičajen je i kod FeLV infekcije. Ponekad stomatitis nije uzrokovan FeLV-om, nego nekim drugim virusom koji se javi u isto vrijeme, najčešće mačjim kalicivirusom (FCV) (TENORIO i sur., 1991.; LEVY, 2000).

Vertikalni prijenos može dovesti do fetalne resorpcije, pobačaja, neonatalne smrti ili „fading kitten“ sindroma. Virus se najčešće prenese transplacentalno, ali mačići su izloženi i kasnije u razdoblju laktacije (HARDY i sur., 1976.). Većina mačića koji su rođeni živi obole od progresivnog oblika bolesti i razviju „fading kitten“ sindrom koji se očituje hipotermijom, dehidracijom, otežanim sisanjem, atrofijom timusa i uginućem tokom prva dva tjedna života (LUTZ i sur., 2009.).

## 2.5. Dijagnostika

### 2.5.1. ELISA (imunoenzimski test, eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) za dokaz p27 antigena

Najzastupljeniji dijagnostički test koji se koristi u kliničkoj praksi je ELISA SNAP test, koji detektira slobodan p27 protein ovojnice virusa. Klinički uzorak može biti puna krv, plazma ili serum. U praksi se prisutnost p27 antigena, tj. antigenemija može poistovjetiti s viremijom pa pozitivan rezultat označava progresivnu bolest (LEVY i sur., 2008.). No, svaki pozitivan test mora se potvrditi, pogotovo u mačaka bez kliničkih znakova. Za potvrdni test možemo koristiti ELISA-u, PCR koji dokazuje provirusnu DNK, RT-PCR za dokaz virusne RNK ili imunofluorescenciju. U slučaju da je i rezultat ponovljenog testa pozitivan zaključujemo da je mačka viremična, kliconoša je te ju treba odvojiti od drugih prijemljivih mačaka. Uputno je da se testiranje ELISA-om ponavlja za 6 tjedana pa ako je opet pozitivan, još jednom se ponavlja za 6 tjedana. Time se želi ustanoviti ima li mačka progresivnu infekciju ili je došlo do regresije bolesti i antigen više nije detektabilan.

S druge strane, negativan rezultat ELISA testa može značiti da mačka nije bila u doticaju s virusom, da smo je testirali u regresivnom stadiju bolesti ili da je test bio proveden prerano. Slobodni p27 antigen može se detektirati najranije 3-6 tjedana nakon infekcije. Ako se ne može sa sigurnošću isključiti izloženost virusu, a test je bio negativan, može se ponoviti za 6 tjedana. Maternalna i vakcinarska protutijela ne interferiraju s testom. U svakom slučaju, mačke koje bi se trebale testirati su: one za koje se sumnja da su bile u kontaktu sa zaraženom mačkom, bolesne mačke, prije cijepljenja protiv FeLV-a, mačke s nepoznatom povijesti zaraznih bolesti i mačke prije uvođenja u novu okolinu (HOFMANN-LEHMANN i HARTMANN, 2020.; SYKES i HARTMANN, 2021.).

### 2.5.2. IFA (Imunofluorescentni test, engl. *Immunofluorescence assay*)

IFA (imunofluorescentni test) određuje prisustvo virusa u krvnim stanicama u perifernoj krvi ili u koštanoj srži. Uzorak čini razmaz krvi ili aspirat koštane srži. Metoda je manje osjetljiva pa se i rjeđe koristi zbog češćih lažno negativnih i lažno pozitivnih rezultata. IFA-om se može detektirati virus tek nakon infekcije koštane srži, 6 do 9 tjedana nakon infekcije

(HOFMANN-LEHMANN i HARTMANN, 2020.), stoga pozitivan test označava progresivnu infekciju. Dakle, test je negativan kod regresivne infekcije, ali i u vrijeme rane viremije, dok koštana srž još nije zahvaćena, kada je ELISA već pozitivna. Test može biti lažno negativan na uzorku krvi u kojem nema dovoljno krvnih stanica, npr. kod neutropenije. Lažno pozitivan nalaz se javlja kod interpretacije nespecifične fluorescencije kao pozitivan rezultat (SYKES i HARTMANN, 2021.).

### **2.5.3. PCR (lančana reakcija polimerazom, engl. *polymerase chain reaction*) za dokaz provirusne DNK**

Ova molekularna metoda se koristi za dokazivanje provirusne DNK FeLV-a. Koristi se kao potvrda nakon pozitivnog p27 antigen testa, za detekciju regresivne infekcije, za testiranje u vrlo ranim fazama infekcije, kao potvrda odsutnosti nositelja provirusa u kućanstvu s više mačaka te za testiranje donora krvi. Uzorci su najčešće krv, leukocitno-trombocitni međusloj („*buffy coat*“) i koštana srž. Provirusna DNK najranije se može dijagnosticirati 1-2 tjedna nakon infekcije. Pozitivan PCR uz prethodno pozitivnu ELISA-u u pravilu označava progresivnu infekciju, a pozitivan PCR uz negativnu ELISA-u govori o regresivnoj infekciji. PCR ovdje ima bitnu ulogu zbog otkrivanja kliconoša koji mogu širiti infekciju nakon reaktivacije zbog stresa ili imunosupresije te inficiranih mačaka među donorima krvi koji mogu prenijeti FeLV transfuzijom. Također, u većini slučajeva veću koncentracija provirusa imati će progresivno inficirane mačke (HOFMANN-LEHMANN i sur., 2001.). Razlog tome je što se provirusna DNK u regresivno inficiranih mačaka nalazi samo u limfocitima, dok se u progresivnih infekcija nalazi u svim leukocitnim staničnim linijama (PEPIN i sur., 2007.). Negativan rezultat znači da životinja najvjerojatnije nije zaražena, ili ima fokalnu ili abortivnu infekciju; u rijetkim slučajevima provirusna DNK ne može se detektirati jer se životinja nalazi u vrlo ranom stadiju infekcije. Lažno pozitivan nalaz može biti posljedica kontaminacije u laboratoriju, dok se lažno negativan može javiti zbog mutacija, koje su česte u retrovirusa, i posljedično nastanka novih varijacija virusa. Upotreba koštane srži ili nekog drugog tkiva umjesto krvi trebala bi povećati osjetljivost testa (HOFMANN-LEHMANN i HARTMANN, 2020.; SYKES i HARTMANN, 2021.).

#### **2.5.4. RT-PCR (lančana reakcija polimerazom sa reverznom transkripcijom, *engl. reverse transcriptase polymerase chain reaction*) za dokaz virusne RNK**

RT-PCR se koristi za otkrivanje virusne RNK, najčešće u uzorku sline ili pune krvi. Mačke pozitivne na p27 antigen su gotovo uvijek pozitivne na virusnu RNK u slini pa se ovaj test može koristiti kao potvrda antigenemije nakon pozitivnog ili sumnjivog rezultata ELISA testa (GOMES-KELLER i sur., 2006.). Zbog velike osjetljivosti i visoke koncentracije virusa u slini RNK se u slini može detektirati već tjedan dana nakon infekcije (TANDON i sur., 2005.). RT-PCR se rijetko koristi za individualno testiranje. Koristi se najčešće skupni uzorak sline iz populacije mačaka koje su u čestom kontaktu, npr. životinje iz istog kućanstva, uzgoja ili skloništa. Uzorke je lako uzeti, test zaobilazi poteškoće uzimanja krvi i ekonomičniji je. Kod pozitivnog skupnog uzorka, sljedeći korak je pojedinačno testiranje svake mačke, bilo RT-PCR-om ili ELISA-om (HOFMANN-LEHMANN i HARTMANN, 2020.).

#### **2.6. Liječenje i prognoza**

Liječenje FeLV-a obuhvaća liječenje same infekcije i popratnih sindroma koji se javljaju. Oportunističke infekcije (npr. hemoplazmoza, stomatitis, infekcije gornjih dišnih prohoda i dr.) i limfomi liječe se kao i kod mačaka koje nisu zaražene FeLV-om, ali odgovor na liječenje može trajati duže nego uobičajeno, a njihove doze ponekad trebaju biti više. Bez obzira na to, uspješnost liječenja ne mora biti smanjena. Mačke s anemijom obično imaju neregenerativnu anemiju pa su potrebne učestale transfuzije krvi. Glukokortikoidi i drugi imunosupresivni lijekovi su kontraindicirani kod mačaka s FeLV-om, osim kod imunološki posredovanih bolesti kao što je IMHA, kada je to neizbježno (SYKES i HARTMANN, 2021.).

Razni antivirusni lijekovi i imunomodulatori često se, sa različitim uspjehom, koriste za liječenje FeLV infekcije. Humani rekombinantni interferon alfa i mačji rekombinantni interferon omega su prema nekim istraživanjima uspjeli poboljšati kliničko stanje i produžiti život vijek inficiranih mačaka. (DE MARI i sur., 2004.). Pojedine studije ističu da Zidovudin (AZT) smanjuje koncentraciju virusa, ublažava neurološke simptome i stomatitis (HARTMANN, 2015.), ali potreban je oprez s određivanjem doze, koja ako je previsoka može uzrokovati neregenerativnu anemiju (HARTMANN, 2005.). Još nije poznato je li kliničko

poboljšanje posljedica učinka ovih lijekova ili liječenja sekundarnih infekcija (LITTLE i sur., 2020.).

Mačke inficirane FeLV-om trebale bi redovito odlaziti na preventivne veterinarske preglede. To uključuje opći klinički pregled s posebnom pažnjom na usnu šupljinu i limfne čvorove te kompletnu krvnu sliku, biokemijske parametre i analizu urina. Sirovi mesni i mliječni proizvodi trebaju se izbjegavati u prehrani kako bi se izbjegle bakterijske infekcije i parazitarne invazije (LITTLE i sur., 2020.). Redovita profilaksa za vanjske i unutarnje parazite potrebna je kod FeLV inficiranih mačaka, kao i vakcinacija. Cijepljenje se ne smije izbjegavati jer su ove mačke pod rizikom od nastanka teže kliničke slike, posebice kod infekcije gornjeg dišnog sustava i panleukopenije (REUBEL i sur., 1992.; LUTZ i sur., 1995.). Preporučena je kastracija mačaka kako bi se smanjio stres tijekom estrusa i razdoblja parenja, a rjeđi je i odlazak mačaka od kuće te agresivna interakcija s drugim mačkama (LITTLE, 2020.).

Dijagnoza FeLV-a nikad ne bi trebala biti indikacija za eutanaziju s obzirom na to da dobar menadžment može omogućiti kvalitetan i dug život oboljelih mačaka. Vrijeme preživljavanja ovisi o stadiju infekcije, imunološkom sustavu domaćina i podtipu virusa. (SYKES i HARTMANN, 2021.). Mačke s progresivnom infekcijom prosječno za 5 godina od dijagnoze razviju bolesti povezane s FeLV-om (ADDIE i sur., 2000.). Dio tih bolesti kao što su limfomi, megaloplastična eritroidna displazija i IMHA moguće je liječiti i/ili držati pod kontrolom duže vremensko razdoblje. Prognoza je najgora za mačke s leukemijom, koje uglavnom ne preživljavaju duže od nekoliko tjedana (SYKES i HARTMANN, 2021.).

## **2.7. Prevencija**

Sprječavanje širenja FeLV-a provodi se edukacijom vlasnika, programima cijepljenja i pravilnim menadžmentom mačaka u raznim okolinama. Na tržištu postoje tri vrste cjepiva protiv FeLV-a: inaktivirano cjepivo cijelog virusa s adjuvansom, rekombinantno subjedinično cjepivo i vektorsko rekombinantno subjedinično cjepivo. Ova cjepiva sprječavaju nastanak progresivne infekcije i s FeLV-om povezanih bolesti, ali ne štite uvijek od prijenosa virusa na prijemljivu jedinku (GROSENBAUGH i sur., 2004.; GROSENBAUGH i sur., 2017.). Preporuča se cijepiti mačiće i odrasle mačke s rizikom od zaraze. Prva doza daje se najranije u 8. tjednu života, druga doza nakon 3-4 tjedna, a „booster“ doza za godinu dana. Revakcinacija se preporuča svake 1-3 godine, ovisno o izloženosti virusu. Mjesto cijepljenja je lijeva stražnja



noga distalno od koljenog zgloba, a vakcina se aplicira potkožno (SCHERK i sur., 2013.). Važno je testiranje prije planiranog cijepljenja jer cijepljenje inficiranih mačaka može dovesti do štetnih posljedica te sarkoma na mjestu injiciranja (HELFER-HUNGERBUEHLER i sur., 2015., SYKES i HARTMANN, 2021.).

Inficirane mačke trebalo bi držati u zatvorenom kako ne bi širile infekciju i da njih same zaštitimo od drugih zaraznih bolesti. Moralo bi ih se odvojiti od ostalih mačaka u kućanstvu, a ako to nije moguće, zadovoljiti svakodnevne potrebe svake mačke te ih kastrirati kako bi se izbjegao stres i smanjilo agresivno ponašanje. Prijemljive mačke u kućanstvu trebale bi biti cijepljene. Inficirane mačke ne mogu se koristiti za uzgoj jer virus mogu prenijeti na jedinke s kojima se pare ili na mladunčad. Ovo treba imati na umu pri uvođenju novih rasplodnih mačaka u uzgoj. Njih prije uvođenja treba dvokratno testirati, s razmakom od najmanje 6 tjedana, i staviti u izolaciju do drugog negativnog testa. U skloništima uvjeti i sredstva ponekad ne omogućuju testiranje svake životinje, stoga se testiraju samo mačke s većim rizikom od infekcije (npr. bolesne mačke) i mačke koje odlaze na udomljavanje. Ako je moguće testirati sve mačke u skloništu, preporuka je i cijepiti one slobodne od bolesti, budući da su pod većim rizikom od dolaska u kontakt s virusom. Kod udomljavanja inficiranih mačaka, trebale bi se uzimati samo u kućanstvo s drugim inficiranim mačkama ili u kućanstvo gdje će živjeti same. U veterinarskim klinikama mačke ne bi smjele biti u direktnom kontaktu jedne s drugima, a FeLV pozitivne mačke se ne bi trebalo stavljati u stacionarne jedinice u kojima su drugi infektivni pacijenti kako ne bi bile izložene uzročnicima drugih zaraznih bolesti. Zajednički instrumenti i pribor moraju se čistiti uobičajenim dezinficijensima nakon korištenja te osoblje mora redovito prati ruke. Donori se moraju testirati prije vađenja krvi i to obavezno PCR-om koji dokazuje prisustvo provirusne DNK (LITTLE i sur., 2020.; SYKES i HARTMANN, 2021.).

## **2.8. Javno zdravstvo**

Kad je dokazano da se FeLV može umnažati i u ljudskim staničnim linijama (JARRETT i sur., 1969.), otvorilo se pitanje mogućnosti prijenosa ove infekcije na ljude. Ipak, do danas nije dokazano da virus mačje leukemije može uzrokovati infekciju u ljudi (HARTMANN, 2011.a).

### **3. MATERIJALI I METODE**

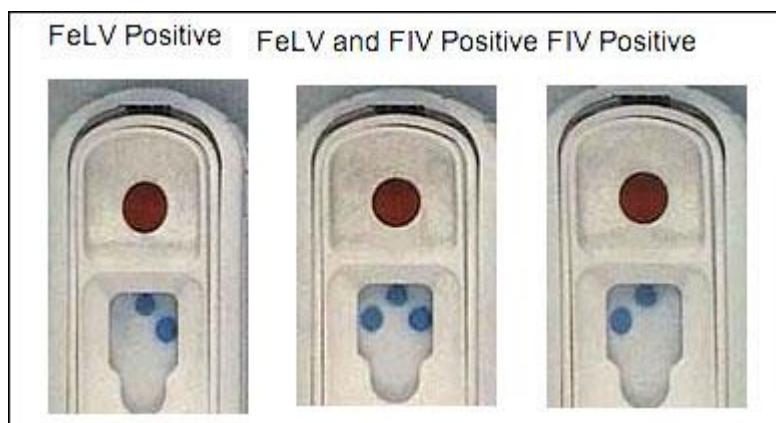
#### **3.1. Materijali**

Kao materijal, odnosno uzorak, koristila se puna krv mačaka, pacijenata klinike Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti kod kojih je postavljena sumnja na infekciju virusom zarazne leukemije mačaka. Puna krv je sterilno izvađena iz cefalične vene (*v. cephalica antebrachii*), u volumenu od 2 ml. Nakon uzorkovanja pohranjena je u epruvete s antikoagulansom te se kao takva koristila za provođenje ELISA brzog dijagnostičkog testa. Ostatak uzorka pohranjen je u zamrzivač na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Nakon prikupljanja svih uzoraka, iz istih se izdvojila DNK koja se potom koristila u molekularnoj dijagnostici. Za potrebe izrade ovog diplomskog rada prikupljeno je i pretraženo ukupno 42 uzorka.

#### **3.2. Metode**

##### **3.2.1. ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)**

Uzorci pune krvi prvo su pretraženi serološkom pretragom ELISA (IDEXX SNAP FIV/FeLV Combo Test) prema uputama proizvođača. Ovom se pretragom dokazivala prisutnost, odnosno odsutnost slobodnog FeLV p27 antigena, kapsidnog proteina virusa, koji je detektabilan 3-6 tjedana nakon infekcije (Slika 3). Na temelju rezultata ovog testiranja uzorci za diplomski rad podijeljeni su na „p27-pozitivne“ i „p27-negativne“ uzorke.



Slika 3. IDEXX SNAP FIV/FeLV Combo Test. FeLV pozitivan, FeLV i FIV pozitivan, FIV pozitivan. (<https://www.cantonanimalclinic.com/services/fiv-feline-immunodeficiency-virus/>)

### 3.2.2. Izdvajanje DNK

DNK potrebna za provođenje PCR reakcije izdvojena je iz uzoraka pune krvi pomoću kita za izdvajanje DNK NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) prema uputama proizvođača.

### 3.2.3. Ugniježdjena lančana reakcija polimerazom (engl. *nested PCR*)

Pribor i oprema za ugniježdenu lančanu reakciju polimerazom:

- Epruvete (mikroepruvete Eppendorf, volumena 1,2  $\mu$ L i 0,2  $\mu$ L)
- Mehaničke Eppendorf pipete raspona volumena 0,5-10  $\mu$ L, 10-100  $\mu$ L, 100- 1000  $\mu$ L
- Odgovarajući plastični nastavci za pipetu s filtrom
- PCR uređaj (Biorad, TC100)
- Vodootporan marker

Ugnježđenom lančanom reakcijom polimeraze dokazivala se prisutnost ili odsutnost provirusne DNK uzročnika FeLV-a kod „p27-pozitivnih“ i „p27-negativnih“ uzoraka. Ugnježđena PCR reakcija provodi se dvostrukim PCR-om za svaki uzorak, odnosno svaki uzorak se podvrgava vanjskoj pa zatim unutarnjoj reakciji umnažanja specifične regije. Set početnica iz prve reakcije (vanjska reakcija) veže se uzvodno od seta početnica druge reakcije (unutarnja reakcija). Vanjskom reakcijom umnoženi ciljni segment DNK služi kao kalup za unutarnju PCR reakciju. U unutarnjoj PCR reakciji umnažala se provirusna DNK, točnije FeLV-U3LTR *gag* regija, veličine 601 bp. U vanjskoj reakciji je kao uzorak korištena izdvojena DNK iz krvi mačaka, a u unutarnjoj reakciji korišten je PCR proizvod iz vanjske reakcije.

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom, koristio se komercijalni komplet Takara Taq DNA polymerase, Hot start, proizvođača Takara Bio s pripadajućim reagensima (Tablica 1). Za svaku od reakcija korištene su po dva para početnica (Tablica 2). Ukupni volumen smjese bio je 25 µL, uključujući reagense, početnice poznatih sljedova nukleotida (BANDE i sur., 2014.) i uzorak DNK ili PCR proizvod vanjske reakcije.

**Tablica 1.** Reagensi iz Takara Taq DNA polymerase, hot start komercijalnog kompleta

Reagens	Volumen za jedan uzorak
	µL
10x PCR Buffer	2,5
MgCl <sub>2</sub>	1
dNTP	0,5
H <sub>2</sub> O	19,25
Taqara Taq HC	0,25
DNK/ PCR proizvod vanjske reakcije	1

**Tablica 2.** Početnice korištene za vanjsku i unutarnju PCR reakciju, za utvrđivanje prisutnosti provirusne DNK FeLV-a (BANDE i sur., 2014.)

Naziv početnice	Slijed oligonukleotida (5'-3')	Volumen za jedan uzorak μL	PCR reakcija
U3-F(1)	ACAGCAGAAGTTTCAAGGCC	1,125	vanjska
G-R(1)	GACCAGTGATCAAGGGTGAG	1,125	vanjska
U3-F(2)	GCTCCCCAGTTGACCAGAGT	1,125	unutarnja
G-R(2)	GCTTCGGTACCAAACCGAAA	1,125	unutarnja

Osim pretraživanih uzoraka, korištene su i pozitivna i negativna kontrola u svrhu provjere ispravnosti odvijanja PCR reakcije. Za pozitivnu kontrolu korišten je uzorak za koji je u prethodnim PCR reakcijama i sekvenciranjem PCR proizvoda dokazano da je pozitivan, tj. sadrži provirusnu DNK uzročnika FeLV, a kao uzorak za negativnu kontrolu u smjesu je dodana pročišćena i od DNK/RNK-aza slobodna voda.

Reakcijske smjese stavljenje su u PCR uređaj (Biorad, T100). Prva, vanjska reakcija, provodi se po sljedećim temperaturnim uvjetima protokola iz Tablice 3, a nakon nje unutarnja, čiji su uvjeti naveden u Tablici 4.

**Tablica 3.** Protokol vanjske PCR reakcije

Temperatura	Vrijeme	
94°C	3 minute	
94°C	45 sekundi	} 35 x
56°C	45 sekundi	
72°C	1 minuta	
72°C	4 minute	
4°C	∞	

**Tablica 4.** Protokol unutarnje PCR reakcije

Temperatura	Vrijeme
94°C	1 minuta
94°C	45 sekundi
56°C	30 sekundi
72°C	45 sekundi
	} 35 x
72°C	4 minute
4°C	∞

Svaka PCR reakcija sastoji se od tri koraka: razdvajanje lanaca dvolančane DNK, spajanje početnica na komplementarne sljedove baza i produljivanje lanca DNK slobodnim deoksinukleotid trifosfatima (dNTP). Prvi korak odvija se na 94°C, dvolančana DNK se razdvaja kao posljedica povišenja temperature. Spajanje početnica odvija se na 56°C. Produljivanje lanca DNK omogućuje enzim Taq polimeraza, koja na 72°C spaja dNTP-ove na komplementarne baze na DNK kalupu. Ciklusi izmjene temperatura ponavljaju se 35 puta.

### 3.2.4. Elektroforeza u agaroznom gelu

Rezultati ugniježdene lančane reakcije polimerazom vizualizirani su elektroforezom u agaroznom gelu.

Oprema i pribor za elektroforezu:

- Analitička vaga
- Mikrovalna pećnica
- Epruvete (mikroepruvete Eppendorf, volumena 0,2 µL)
- Mehaničke Eppendorf pipete raspona volumena 0,5-10 µl
- Odgovarajući plastični nastavci s filtrom za pipetu

- Kalup za gel
- Češljic za jažice u gelu
- Parafilm
- Izvor električne struje, uređaj za izvođenje elektroforeze (Biorad, PowerPac™ Basic)
- Uređaj za fotografiranje gela (Gel doc, Biorad)
- Uređaj za ispis fotografija gela (Mitsubishi P93D)

Kemikalije korištene u elektroforezi:

- TAE pufer 1x koncentriran
- Agaroza (Sigma)
- Boja za DNK u gelu (Diamond™ Nucleic Acid Dye, Promega)
- DNK biljeg u boji (BenchTop 100bp DNA Ladder, Promega)
- Boja za PCR proizvod (Blue/Orange Loading DYE, 6X, Promega)

#### 3.2.4.1. Postupak pripreme TAE pufera

Reagensi za pripremu:

- 93,5 g EDTA (EDTA Disodium salt, Sigma Aldrich)
- 242 g Tris (TRIZMA base: 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, Sigma Aldrich)
- 57 ml ledene octene kiseline CH<sub>3</sub>COOH (Kemika)

TAE pufer se izradi tako da je koncentriran 50 puta. Prvo se pripremila 0,5 M (0,5 molarna) otopina EDTA: 93,5 g EDTA rastopilo se u 400 ml redestilirane vode te se podesio pH dodavanjem kristala NaOH, a zatim se otopina dopunila redestiliranom vodom do ukupnog volumena od 500 ml. U 750 ml redestilirane vode otopilo se 242 g Trisa, dodalo se 57 ml ledene octene kiseline i 100 ml prethodno pripremljene 0,5 M EDTA otopine. Otopina se dopunila redestiliranom vodom do 1000 ml.

Za provedbu elektroforeze upotrebljava se 1x koncentriran TAE pufer pa se tako 10 ml 50 x koncentriranog TAE pufera dodalo u 490 ml destilirane vode.

### **3.2.4.2. Postupak pripreme agaroznog gela**

Prvi korak je pripremanje 1% otopine agaroze: 1 g agaroze otopi se u 100 ml TAE pufera u Erlenmeyerovoj tikvici. Otopina se zagrijavala u mikrovalnoj pećnici 2 i pol minute. Nakon 15 minuta u prohladenu otopinu se dodalo 5  $\mu$ L boje za DNK i promiješalo se dok se otopina nije homogenizirala, a zatim se ostavila 15-20 minuta na sobnoj temperaturi da se agarozna polimerizira. Pripremio se kalup za gel, na čiji se jedan rub stavio češljic za jažice. Otopina agaroze ulijala se u kalup i ostavila pola sata u mraku do polimerizacije gela.

Iz gela se izvadio češljic, otvorio kalup i gel se prebacio u kadicu uređaja za izvođenje elektroforeze, napunjenu 1x TAE puferom, koji treba u potpunosti prekrivati cijelu površinu gela.

### **3.2.4.3. Nanošenje PCR proizvoda na gel, provođenje elektroforeze i očitavanje rezultata**

U jažice gela su se redom nanosili DNK biljeg 100 bp, proizvodi vanjske PCR reakcije, pozitivna i negativna kontrola te reakcije, ponovno DNK biljeg 100 bp, proizvodi unutarnje PCR reakcije te njihova pozitivna i negativna kontrola. Prije nanošenja na gel, PCR proizvodi su se prvo nanijeli na parafilm u volumenu od 4  $\mu$ L i miješali s 3  $\mu$ L boje za bojanje DNK/PCR proizvoda. Na gel se nanosilo po 4  $\mu$ L DNK biljega te po 4  $\mu$ L mješavine PCR proizvoda i boje za bojanje DNK/PCR proizvoda.

Uređaj za provođenje elektroforeze (Biorad, PowerPac™ Basic) namjestio se na napon od 100 V i jačinu struje od 80 mA tijekom jednog sata. Nakon završetka elektroforeze, gel se izvadio iz otopine, ocijedio na papirnatom ručniku i stavio u uređaj za fotografiranje gela (Gel doc, Biorad). Pod UV svjetlom, pozitivna reakcija vidljiva je kao signal na gelu. Fotografija se automatski prenijela na računalo, gdje se arhivirala, a ispisala se pomoću printera (Mitsubishi P93D).



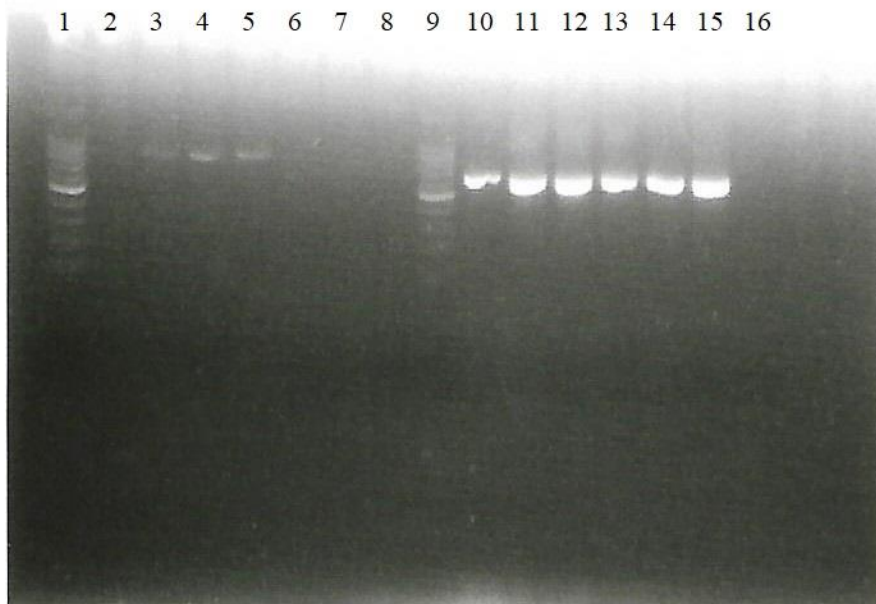
## **4. REZULTATI**

### **4.1. Pretraživanje ELISA testom**

Ukupno 42 uzorka pune krvi pretraženo je pomoću IDEXX SNAP FIV/FeLV Combo testa koji se temelji na imunoenzimnom testu. Njih 35,7% (15/42) bilo je pozitivno na prisustvo slobodnog p27 antigena, dok je preostalih 64,3% (27/42) uzoraka bilo negativno na prisustvo p27 antigena. Na temelju rezultata ovog testiranja uzorci su podijeljeni na „p27-pozitivne“ i „p27-negativne“ uzorke.

### **4.2. Rezultati ugniježdene lančane reakcije polimerazom**

Svi uzorci pretraženi ELISA-om nakon izdvajanja DNK, podvrgnuti su ugniježđenoj PCR reakciji. Ovom metodom umnažan je dio FeLV-U3LTR *gag* regije, veličine 601 bp, koji omogućuje detektiranje provirusne DNK. Ugniježdjena PCR reakcija uključuje vanjsku i unutarnju PCR reakciju umnažanja specifične regije. Nakon vanjske reakcije, PCR proizvod se koristio kao uzorak u unutarnjoj reakciji kako bi se povećala osjetljivost PCR reakcije, tj. pojačalo se umnažanje tražene DNK, što je rezultiralo vidljivim signalom na gelu. Nakon PCR-a provela se elektroforeza, metoda koja služi za vizualizaciju rezultata (Slika 4.).



Slika 4. Rezultat elektroforeze dobiven ugniježđenom PCR reakcijom. 1 – DNK biljeg; 2-6 – PCR proizvod vanjske reakcije; 7 – pozitivna kontrola; 8 – negativna kontrola; 9 – DNK biljeg; 10-14 – PCR proizvod unutarnje reakcije; 15 – pozitivna kontrola; 16 – negativna kontrola.

Od 42 ispitana uzorka, u njih 40,5% (17/42) potvrđena je prisutnost provirusne DNK, dok u 59,5% (25/42) uzoraka provirusna DNK nije dokazana.

#### **4.3. Usporedba rezultata ELISA testa i ugniježdene PCR**

S ciljem usporedbe serološke i molekularne metode dijagnostike virusa zarazne leukemije mačaka, sva 42 uzorka analizirana su i imunoenzimnim testom i ugniježđenom lančanom reakcijom polimerazom.

Svih 15 serološki pozitivnih uzoraka pune krvi mačaka, odnosno uzoraka pozitivnih na slobodni p27 antigen, dalo je pozitivan rezultat ugniježđenom lančanom reakcijom polimerazom, tj. bili su pozitivni i na provirusnu DNK. Od 27 serološki negativnih uzoraka pune krvi, njih 25 je ugniježđenom lančanom reakcijom polimerazom bilo negativno na

prisustvo provirusne DNK zarazne leukemije mačaka, a dva uzorka polučila su pozitivan rezultat. Dobivena kombinacija rezultata upućuje na to da su te dvije mačke bile u regresivnoj fazi infekcije, koja je u ovom istraživanju utvrđena u 4,8% (2/42) ukupno testiranih životinja, odnosno u 7,4% životinja sa negativnim antigenim (ELISA) testom.

Ovim istraživanjem podudarnost pozitivne serološke pretrage s molekularnom iznosi 100%, a podudarnost negativne serološke i molekularne pretrage je 92,6%. U 4,8% uzoraka rezultati ovih dviju pretraga se ne poklapaju (Tablica 5.).

**Tablica 5.** Usporedba rezultata ELISA testa i ugniježdene PCR

	<i>ELISA</i>	<i>PCR</i>	
		<b>Pozitivan</b>	<b>Negativan</b>
<i>Pozitivan</i>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>-</b>
<i>Negativan</i>	<b>27</b>	<b>2</b>	<b>25</b>
<i>UKUPNO</i>	<b>42</b>	<b>17</b>	<b>25</b>

## 5. RASPRAVA

Virus zarazne leukemije mačaka otkriven je u skupini mačaka koje su bolovale od limfosarkoma (JARRETT i sur., 1964.). Iako je virus dobio naziv prema tumoru kojeg uzrokuje, ubrzo se otkrilo da on može biti uzrokom i raznih drugih patoloških stanja (HARDY i sur., 1977.). Danas znamo da se radi o globalno proširenoj bolesti koja predstavlja jedan od vodećih infektivnih uzroka uginuća u populaciji domaćih mačaka. Uzročnik pripada u porodicu *Retroviridae*. Kao i drugi pripadnici ove porodice, FeLV posjeduje enzime reverznu transkriptazu i integrazu koji omogućuju transkripciju virusne RNK u DNK, integraciju provirusne DNK u genom domaćina i posljedično perzistentu infekciju (WILLET i HOSIE, 2012.). Četiri su definirana ishoda infekcije virusom zarazne leukemije; abortivni, regresivni, progresivni i fokalni ili atipični, a do kojeg će ishoda nakon infekcije doći ovisi o soju virusa, infektivnoj dozi i imunološkom odgovoru domaćina (SYKES I HARTMANN, 2014.). Često se te ishode infekcije opisuje i kao „faze“ osobito kad se govori o regresivnim i progresivnim infekcijama i to zbog toga što u određenim okolnostima infekcija iz regresivne može preći u progresivnu, ali i obrnuto. Najveći problem su mačke u progresivnoj fazi infekcije jer predstavljaju perzistentni izvor infekcije i jer su one te koje razvijaju teške kliničke slike (neoplazije, hematopoetski poremećaji, imunodeficijencija, imunološki posredovane bolesti itd.) povezane sa lošim ishodom. Ipak, problem mogu predstavljati i regresivno inficirane jedinke koje nakon reaktivacije virusa mogu postati kliconoše bez početno vidljivih i jasnih kliničkih znakova. Prijenos ovog virusa bliskim kontaktom stvara brojne probleme kod nekontroliranog uvođenja novih mačaka u postojeću populaciju pa je rana i točna dijagnoza od iznimne važnosti za donošenje pravilnih i pravovremenih mjera kontrole. Postojanje različitih ishoda (faza) infekcije koji mogu varirati tijekom vremena, i različitih dijagnostičkih metoda koje određuju različite virusne i imunološke parametre otežava dijagnostiku ove bolesti (HOFMANN-LEHMANN i HARTMANN, 2020.).

Smatra se da bi se trebao znati retrovirusni status svake mačke. U tu svrhu razvijen je dijagnostički algoritam koji se temelji na procjeni rizika od infekcije i kliničkoj prezentaciji uzimajući u obzir različite karakteristike dijagnostičkih testova, vremenski period testiranja te pozitivnu i negativnu prediktivnu vrijednost testova (LUTZ i sur., 2009.). Nedostatak ovakvih algoritama je što zahtijevaju višestruko ponavljanje različitih dijagnostičkih testova na koje vlasnici vrlo često ne pristaju zbog visokih financijskih troškova i/ili opetovanih uzorkovanja

krvi koje povezuju sa patnjom svojih kućnih ljubimaca i poznavanje prevalencije u testirane populacije mačaka.

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti rezultate dobivene imunoenzimnim (brzim, antigenim) testom koji se svakodnevno koristi u kliničkom radu i rezultate ugniježdene lančane reakcije polimerazom. Pretraženo je ukupno 42 uzorka krvi mačaka, pacijenata klinike Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti kod kojih se na temelju anamnestičkih podataka i/ili kliničkog pregleda postavila sumnja na infekciju virusom zarazne leukemija mačaka. Imunoenzimni test široko je dostupan i relativno jeftin, a rezultati se dobivaju unutar nekoliko minuta pa je kod sumnje na infekciju virusom zarazne leukemije mačaka on uglavnom prvi izbor. Jedan od nedostataka ovog testa je niska pozitivna prediktivna vrijednost u niskorizičnih populacija mačaka (populacija s niskom prevalencijom) Zbog toga se, spomenutim dijagnostičkim algoritmom, nalaže da se svaki pozitivan rezultat treba potvrditi, ukoliko je moguće, uporabom molekularne metode. U našem istraživanju imunoenzimnim testom utvrdili smo prisustvo slobodnog p27 antigena u 35,7% (15/42) uzoraka. Svi serološki (p27) pozitivni uzorci bili su pozitivni i uporabom ugniježdene lančane reakcije polimerazom. Potpuna podudarnost pozitivnih rezultata brzih antigenih (IDEXX SNAP FIV/FeLV Combo Test) i potvrdnih testova opisana je i tijekom dva različita istraživanja provedenih u SAD-u (LEVY i sur., 2017.; KRECIC i sur., 2018.). Rezultati navedenih istraživanja ipak su se razlikovali u utvrđenoj osjetljivosti IDEXX SNAP FIV/FeLV Combo testa koja je u jednom istraživanju iznosila 100%, a u drugom 91,5%. Ta razlika se zapravo može objasniti uporabom drugačijih potvrdnih testova. U istraživanju LEVY i sur. (2017.) kao potvrdni test koristile su se dvije vrste kvantitativnih ELISA testova koje su utvrđivale prisutnost p27 antigena, dok je druga skupina autora (KRECIC i sur., 2018) kao potvrdni test koristila PCR koji dokazuje provirusnu DNK. Nepodudarnost rezultata mogla bi se stoga objasniti i različitim oblicima virusa koje određenim testovima dokazujemo. Pozitivni rezultati oba (ELISA i PCR) testa, potvrđuju prisustvo aktivne, najvjerojatnije progresivne infekcije, iako bi se moglo raditi i o početnom stadiju infekcije, odnosno primarnoj viremiji. S druge strane, kod regresivnih infekcija PCR će biti pozitivan jer detektira provirusnu DNK ugrađenu u genom domaćina, ali će antigeni testovi biti negativni jer infekcija nije aktivna pa u u krvi nema cirkulirajućeg p27 antigena. U našem istraživanju, molekularnom metodom provirusna DNK utvrđena je u 40,5% (17/42) uzoraka, od čega su dva PCR pozitivna uzorka bila ELISA negativna. Ovakav nalaz, kao što je već napomenuto ranije, uobičajen je kod regresivnih infekcija. Ukoliko gledamo ukupan broj pretraženih uzoraka, u našem istraživanju regresivnih infekcija bilo je 4,8% (2/42). Slične rezultate dobili su i GOMES-KELLER i sur. (2006.) tijekom istraživanja na Sveučilištu u

Zürichu koji su regresivnu infekciju utvrdili u 5,4% pretraženih uzorka. Navedenim istraživanjem utvrđen je pad prevalencije regresivnih infekcija u odnosu na prethodno razdoblje kad je utvrđena prevalencija regresivno inficiranih mačaka, bila čak 10% (HOFMANN-LEHMANN i sur., 2001.). Regresivno inficirane jedinke ne očituju kliničke znakove bolesti, ali reaktivacija virusa može se dogoditi u bilo kojem trenutku, odnosno kad u organizmu zbog nekih nepovoljnih uvjeta (npr. gravidnost, liječenje imunosupresivnim lijekovima, druge bolesti) dođe do imunosupresije (KADAR i sur., 2005.). Takve jedinke postaju kliconoše prije nastanka kliničkih znakova te je važno prepoznati ih i odvojiti od ostalih prijemljivih životinja. Također, treba imati na umu da i regresivno inficirane mačke mogu u bilo kojem trenutku prenijeti virus vertikalno ili ukoliko ih se koristi kao donore krvi (PACITTI i sur., 1986.; NESINA i sur., 2015.).

Ugniježđena lančana reakcija polimerazom provodi se u specijaliziranim laboratorijima, skuplja je i rezultati se duže čekaju, no rezultati ovog i drugih istraživanja potvrđuju važnost njene upotrebe. Može se koristiti kao potvrda dijagnoze nakon pozitivnog, ali i nakon negativnog ELISA testa, ako postoji sumnja na infekciju (HOFMANN-LEHMANN i HARTMANN, 2020.). Nikad se u dijagnostici FeLV-a ne bi trebala koristiti samostalno, jer ona detektira samo provirusnu DNK (SYKES i HARTMANN, 2021.). Ponavljanje antigenih i molekularnih testova i njihova komplementarna upotreba važna je kako bi se utvrdio oblik infekcije (PEPIN i sur., 2007.), uzimajući pritom u obzir da će rezultati testova varirati između pozitivnog i negativnog dok se ne uspostavi ravnoteža između virusa i domaćina (HOFMANN-LEHMANN i HARTMANN, 2020.). Budući da se bolesti povezane s FeLV-om javljaju prosječno pet godina nakon otkrića progresivne infekcije, pravovremena i točna dijagnoza važna je kako bismo s odgovarajućim oblicima liječenja počeli u ranoj fazi bolesti (ADDIE i sur., 2000.).

Čak i kod komplementarne uporabe seroloških i konvencionalnih molekularnih metoda rezultati mogu biti lažno negativni jer su koncentracije antigena i provirusne DNK često niske. HOFMANN-LEHMANN i sur. (2001.) te kasnije BEALL i sur. (2019.) upozoravaju na važnost kvantifikacije p27 antigena i provirusne DNK u dijagnostici, ali i na njihovu povezanost s ishodom i prognozom infekcije. Također, istražuju se načini učinkovitog prepoznavanja kliconoša u ranoj fazi infekcije ili nakon reaktivacije infekcije. Utvrđivanje odlične poveznice između prisustva p27 antigena u krvi i virusne RNK u slini (GOMES-KELLER i sur., 2006.) ukazuje na brojne prednosti uporabe RT-PCR metode. Potencijal ovog testa nalazi se u njegovoj ranoj detekciji RNK u slini, lakoći uzorkovanja i visokoj specifičnosti, što bi uvelike pomoglo

u detekciji kliconoša koji su dosad prolazili ispod radara. Obzirom na raznolikost mogućih ishoda FeLV-a i potrebu ponavljanja testiranja s određenim vremenskim razmacima kako bi se utvrdio stadij i ishod infekcije, istraživanja kvantifikacije p27 antigena i provirusne DNK mogle bi uvelike pridonijeti i boljem razumijevanju patogeneze i predviđanju ishoda ove bolesti.

## 6. ZAKLJUČCI

1. U praksi se dijagnoza FeLV- a obično temelji samo na detekciji slobodnog FeLV p27 antigena (brzi, antigeni testovi). Iako je pouzdanost pozitivnih rezultata dobivenih njihovom uporabom u ovom istraživanju bila neupitna treba imati na umu da će oni biti pozitivni uglavnom kod životinja s progresivnom infekcijom.
2. Ponavljanje antigenih i molekularnih testova i njihova komplementarna upotreba neophodna je za pouzdanu i točnu dijagnostiku svih oblika infekcije virusom zarazne leukemije mačaka.
3. Korištenje lančane reakcije polimerazom koja dokazuje provirusnu DNK neophodno je za dokazivanje regresivne faze infekcije virusom zarazne leukemije mačaka.



## 7. LITERATURA

ADDIE, D. D., J. M. DENNIS, S. TOTH, S. REID, O. JARRETT, J. J. CALLANAN (2000): Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus. *Vet. Rec.* 146., 419. – 424., <https://doi.org/10.1136/vr.146.15.419>

BANDE, F., S. S. ARSHAD, L. HASSAN, Z. ZAKARIA (2014): Molecular Detection, Phylogenetic Analysis, and Identification of Transcription Motifs in Feline Leukemia Virus from Naturally Infected Cats in Malaysia. *Vet. Med. Internation.*, 2014., 760. – 961., DOI: 10.1155/2014/760961

BEALL, M. J., J. BUCH, R. J. CAHILL, G. CLARK, J. HANSCOM, M. ESTRADA, C. M. LEUTENEGGER, R. CHANDRASHEKAR (2019): Evaluation of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for feline leukemia virus p27 antigen and comparison to proviral DNA loads by real-time polymerase chain reaction. *Comp. Immunol., Microbiol. and Infect. Dis.* 67., <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101348>

BENVENISTE, R.E., C. J. SHERR, G. J. TODARO (1975): Evolution of type C viral genes: Origin of feline leukemia virus. *Science* 190., 886. – 888., DOI: 10.1126/science.52892

BROJATSCH, J., B. S. KRISTAL, G. A. VIGLIANTI, R. KHIROYA, E. A. HOOVER, J. I. MULLINS (1992): Feline leukemia virus subgroup C phenotype evolves through distinct alterations near the N terminus of the envelope surface glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89., 8457. – 8461., DOI: 10.1073/pnas.89.18.8457

BUCH J., M. BEALL, T. O'CONNOR (2017): Worldwide clinic-based serologic survey of FIV antibody and FeLV antigen in cats. *ACVIM Forum Research Abstract Program, National Harbor, MD*, 8. – 10.

CANO-ORTIZ, L., C. TOCHETTO, P. M. ROEHE, A. C. FRANCO, D. MALETICH JUNQUEIRA (2022): Could Phylogenetic Analysis Be Used for Feline Leukemia Virus (FeLV) Classification? *Viruses* 14., 249., <https://doi.org/10.3390/v14020249>

CARMICHAEL, K.P., D. BIENZLE, J. J. MCDONNELL (2002): Feline leukemia virus-associated myelopathy in cats. *Vet. Pathol.* 39., 536. – 545., DOI: 10.1354/vp.39-5-536, PMID: 12243463

COTTER, S. M. (1991): Management of healthy feline leukemia virus-positive cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199., 1470. – 1473., PMID: 1666105

DAY, N.K., C. O'REILLY-FELICE, W. D. HARDY JR., R. A. GOOD, S. S. WITKIN (1980): Circulating immune complexes associated with naturally occurring lymphosarcoma in pet cats. *J. Immunol.* 125., 2363. – 2366., DOI: 10.4049/jimmunol.125.6.2363

DE MARI, K., L. MAYNARD, A. SANQUER, B. LEBREUX, H. EUN (2004): Therapeutic Effects of Recombinant Feline Interferon-co on Feline Leukemia Virus (FeLV)-Infected and FeLV/Feline Immunodeficiency Virus (FIV)-Coinfected Symptomatic Cats. *J. Vet. Intern. Med.* 18., 477. – 482., <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2004.tb02570.x>

DIEHL, L. J., E. A. HOOVER (1992): Early and progressive helper t-cell dysfunction in feline leukemia virus-induced immunodeficiency. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 5., 1188. – 1194., PMID: 1333529

DONNER, L., L. A. FEDELE, C. F. GARON, S. J. ANDERSON, C. J. SHERR (1982): McDonough feline sarcoma virus: characterization of the molecularly cloned provirus and its feline oncogene (*v-fms*). *J. Virol.* 41., 489. - 500., DOI: 10.1128/jvi.41.2.489-500.1982

FUJINO, Y., K. OHNO, H. TSUJIMOTO (2008): Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: Insertional mutagenesis. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 123., 138. – 143., <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.01.019>

GLICK, A. D., R. G. HORN, M. HOLSCHER (1978): Characterization of feline glomerulonephritis associated with viral-induced hematopoietic neoplasms. *Am. J. Pathol.* 92., 321. - 332., PMID: 677265

GOMES-KELLER, M. A., E. GONCZI, R. TANDON, F. RIONDATO, R. HOFMANN-LEHMANN, M. L. MELI, H. LUTZ (2006): Detection of feline leukemia virus RNA in saliva

from naturally infected cats and correlation of PCR results with those of current diagnostic methods. *J. Clinical Microbiol.* 44., 916. – 922., DOI: 10.1128/jcm.44.3.916-922.2006

GOMES-KELLER, M. A., E. GONCZI, B. GRENACHER, R. TANDON, R. HOFMAN-LEHMANN, H. LUTZ (2009): Fecal shedding of infectious feline leukemia virus and its nucleic acids: a transmission potential. *Vet. Microbiol.* 134., 208. – 217., <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.08.011>

GROSENBAUGH, D. A., T. LEARD, M. C. PARDO, L. MOTES-KREIMEYER, M. ROYSTON (2004): Comparison of the safety and efficacy of a recombinant feline leukemia virus (FeLV) vaccine delivered transdermally and an inactivated FeLV vaccine delivered subcutaneously. *Vet. Ther.* 5., 258. – 262.

GROSENBAUGH, D. A., V. FRANCES-DUVERT, S. ABEDI, B. FEILMEIER, H. RU, H. POULET (2017): Efficacy of a nonadjuvanted recombinant FeLV vaccine and two inactivated FeLV vaccines when subject to consistent virulent FeLV challenge conditions. *Biologicals* 49., 76. – 80., <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.10.004>

HARDY, W.D., JR., A. J. MCCLELLAND, E. G. MACEWEN, P. W. HESS, A. A. HAYES, E. E. ZUCKERMAN (1977): The epidemiology of the feline leukemia virus (FeLV). *Cancer* 39., 1850. – 1855.,

HARDY, W.D., JR., P. W. HESS, E. G. MACEWEN, A. J. MCCLELLAND, E. E. ZUCKERMAN, M. ESSEX, S. M. COTTER, O. JARRETT, (1976): Biology of Feline Leukemia Virus in the Natural Environment. *Cancer Res.* 36., 582. – 588.

HARTMANN K. (2011): Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 143., 190. – 201., <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.003>

HARTMANN, K. (2005): FeLV treatment strategies and prognosis. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 27., 14. – 26.

HARTMANN, K. (2011a): *Infectious Diseases of the Dog and Cat* 4., 108. – 136.

HARTMANN, K. (2012): Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review. *Viruses* 4., 2684. – 2710., DOI: 10.3390/v4112684

HARTMANN, K. (2015): Efficacy of antiviral chemotherapy for retrovirus-infected cats: What does the current literature tell us? *J. Feline Med. Surg.* 17., 925. – 939., DOI: 10.1177/1098612x15610676, PMID: 26486979

HAYES, K. A., J. L. ROJKO, L. E. MATHES (1992): Incidence of localized feline leukemia virus infection in cats. *Am. J. Vet. Res.* 53., 604. – 607., PMID: 1316726

HAYES, K. A., J. L. ROJKO, M. J. TARR, P. J. Polas, R. G. Olsen, L. E. Mathes (1989): Atypical localised viral expression in a cat with feline leukaemia. *Vet. Rec.* 124., 344. – 346., DOI: 10.1136/vr.124.13.344, PMID: 2541530

HELFER-HUNGERBUEHLER, A. K., A. M. SPIRI, B. RIOND, P. Grest, F. S. Boretti, R. Hofmann-Lehmann (2015): No benefit of therapeutic vaccination in clinically healthy cats persistently infected with feline leukemia virus. *Vaccine* 33., 1578. – 1585., <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.02.009>

HOFMANN-LEHMANN R., J. B. HUDER, S. GRUBER, F. BORETTI, B. SIGRIST, H. LUTZ (2001): Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *J. Gen. Virol.* 82., 1589. – 1596., <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-7-1589>

HOFMANN-LEHMANN, R., E. HOLZNAGEL, A. AUBERT, P. OSSENT, M. REINACHER, H. LUTZ (1995): Recombinant FeLV vaccine: long-term protection and effect on course and outcome of FIV infection. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 46., 127. – 137., [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)07012-V](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)07012-V)

HOFMANN-LEHMANN, R., J. B. HUDER, S. GRUBER, F. BORETTI, B. SIGRIST, H. LUTZ (2001): Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *J. Gen. Virol.* 82., 1589. – 1596., <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-7-1589>

HOFMANN-LEHMANN, R., K. HARTMANN (2020): Feline leukaemia virus infection: A practical approach to diagnosis. *J. Feline Med. Surg.* 22., 831. – 846., DOI: 10.1177/1098612x20941785, PMID: 32845225

HOOVER, E. A., J. I. MULLINS (1991): Feline leukemia virus infection and diseases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199., 1287. - 1297., <https://doi.org/10.2460/javma.1991.199.10.1287>

JACKSON, M. L., D. M. HAINES, S. M. MERIC, V. MISRA (1993): Feline leukemia virus detection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue from cats with lymphosarcoma. *Can. J. Vet. Res.* 57., 269. – 276., PMID: 8269365

JARRETT, O., H. M. LAIRD, D. HAY (1969): Growth of Feline Leukaemia Virus in Human Cells. *Nature* 224., 1208. – 1209., DOI: 10.1038/2241208a0

JARRETT, W.F., E. M. CRAWFORD, W. B. MARTIN, F. DAVIE (1964): A Viruslike Particle Associated with Leukemia (Lymphosarcoma). *Nature* 202., 567. – 569., DOI: 10.1038/202567a0, PMID: 14195054

KADAR, E., J. E. SYKES, P. H. KASS, L. BERNSTEEN, C. R. GREGORY, A. E. KYLES (2005): Evaluation of the prevalence of infections in cats after renal transplantation: 169 cases (1987- 2003). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227., 948. – 953., DOI: 10.2460/javma.2005.227.948

KIDNEY, B. A., J. A. ELLIS, D. M. HAINES, M. L. JACKSON (2001): Comparison of endogenous feline leukemia virus RNA content in feline vaccine and nonvaccine site-associated sarcomas. *Am. J. Vet. Res.* 62., 1990. – 1994., DOI: 10.2460/ajvr.2001.62.1990

KRECIC, M. R., S. VELINENI, P. MEEUS, H. FAN, M. LOENSER (2018): Diagnostic performances of two rapid tests for detection of feline leukemia virus antigen in sera of experimentally feline leukemia virus-infected cats. *J. Feline Med. Surg. Open Reports* 4., DOI: 10.1177/2055116917748117, PMID: 29318027

KRICK, E. L., L. LITTLE, R. PATEL, F. S. SHOFRER, K. SORENMO, C. A. CLIFFORD, J. L. BAEZ (2008): Description of clinical and pathological findings, treatment and outcome of

feline large granular lymphocyte lymphoma (1996-2004). *Vet. and Comp. Oncol.* 6., 102. – 110., <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2007.00146.x>

LAURING, A.S., H. H. CHENG, M. V. EIDEN, J. OVERBAUGH (2002): Genetic and Biochemical Analyses of Receptor and Cofactor Determinants for T-Cell-Tropic Feline Leukemia Virus Infection. *J. Virol.* 76., 8069. - 8078., DOI: 10.1128/jvi.76.16.8069-8078.2002

LEVY, J. K., P. C. CRAWFORD, S. J. TUCKER (2017): Performance of 4 Point-of-Care Screening Tests for Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus. *J. Vet. Intern. Med.* 31., 521. – 526., <https://doi.org/10.1111/jvim.14648>

LEVY, J., C. CRAWFORD, K. HARTMANN, R. HOFMANN-LEHMANN, S. LITTLE, E. SUNDAHL, V. THAYER (2008): 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *J. Feline Med. Surg.* 10., 300. - 316., DOI: 10.1016/j.jfms.2008.03.002, PMID: 18455463

LEVY, J.K. (2000): Cvt update: Feline immunodeficiency virus. U: Kirk's current veterinary therapy xiii small animal practice (J. D. Bonagura, W. B. Saunders, Ur.) 13., WB Saunders, Philadelphia, 284. - 288.

LITTLE S., J. LEVY, K. HARTMANN, R. HOFMANN-LEHMANN, M. HOSIE, G. OLAH, K. ST. DENIS (2020): AAFP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. *J. Feline Med. Surg.* 22., 5. – 30., DOI: 10.1177/1098612x19895940, PMID: 31916872

LOUWERENS, M., C. A. LONDON, N. C. PEDERSEN, L. A. LYONS (2005): Feline Lymphoma in the Post-Feline Leukemia Virus Era. *J. Vet. Intern. Med.* 19., 329. – 335., <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2005.tb02703.x>

LUTZ H., D. ADDIE, S. BELÁK, C. BOUCRAUT-BARALON, H. EGBERINK, T. FRYMUS, T. GRUFFYDD-JONES, K. HARTMANN, M. J. HOSIE, A. LLORET, F. MARSILIO, M. G. PENNISI, A. D. RADFORD, E. THIRY, U. TRUYEN, M. C. HORZINEK (2009): Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 11., 565. - 574., <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.005>

LUTZ, H., I. CASTELLI, F. EHRENSPERGER, A. POSPISCHIL, M. ROSSKOPF, G. SIEGL, M. GROB, S. MARTINOD (1995): Panleukopenia-like syndrome of felv caused by co-infection with felv and feline panleukopenia virus. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 46., 21. – 33., [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)07003-P](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)07003-P)

MAJOR, A., V. CATTORI, E. BOENZLI, B. RIOND, P. OSSENT, M. L. MELI, R. HOFMANN-LEHMANN, H. LUTZ (2010): Exposure of cats to low doses of FeLV: seroconversion as the sole parameter of infection. *Vet. Res.* 41., 17., DOI: 10.1051/vetres/2009065, PMID: 19861115

MITCHELL, T. W., J. L. ROJKO, J. R. HARTKE, A. R. MIHAJLOV, G. A. KASAMEYER, P. W. GASPER, L. R. WHALEN (1997): FeLV Envelope Protein (gp70) Variable Region 5 Causes Alterations in Calcium Homeostasis and Toxicity of Neurons. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 14., 307. – 320.

NESINA, S., K. A. HELFER-HUNGERBUEHLER, B. RIOND, F. S. BORETTI, B. WILLI, M. L. MELI, P. GREEST, R. HOFMANN-LEHMANN (2015): Retroviral DNA—the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naïve recipient cats. *Retrovirology* 12., 105., DOI: 10.1186/s12977-015-0231-z

PACITTI, A.M., O. JARRETT, D. HAY (1986): Transmission of feline leukaemia virus in the milk of a non-viraemic cat. *Vet. Rec.* 118., 381. – 384., DOI: 10.1136/vr.118.14.381, PMID: 3012849

PEPIN, A. C., R. TANDON, V. CATTORI, E. NIEDERER, B. RIOND, B. WILLI H. LUTZ, R. HOFMANN-LEHMANN (2007): Cellular segregation of feline leukemia provirus and viral RNA in leukocyte subsets of long-term experimentally infected cats. *Virus Res.* 127., 9. – 16., <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.03.008>

PERHARIĆ, M., V. STAREŠINA, N. TURK, LJ. BARBIĆ, Z. ŠTRITOF, S. HAĐINA, J. HABUŠ, V. STEVANOVIĆ, K. MARTINKOVIĆ, V. MOJČEC PERKO, Z. MILAS (2018): The epidemiology features of retroviral infections in domestic cats from the Zagreb urban area. *Vet. arhiv* 88., 345. – 354., DOI: 10.24099/vet.arhiv.170406b

POLI, A., F. ABRAMO, F. BALDINOTTI, M. PISTELLO, L. DA PRATO, M. BENDINELLI (1994): Malignant lymphoma associated with experimentally induced feline immunodeficiency virus infection. *J. Comp. Pathol.* 110., 319. – 328., [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(08\)80309-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(08)80309-X)

QUACKENBUSH, S.L., P. R. DONAHUE, G. A. DEAN, M. H. MYLES, C. D. ACKLEY, M. D. COOPER, J. I. MULLINS, E. A. HOOVER (1990): Lymphocyte subset alterations and viral determinants of immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS. *J. Virol.* 64., 5465. – 5474., DOI: 10.1128/jvi.64.11.5465-5474.1990

REUBEL G. H. , J. W. GEORGE, J. E. BARLOUGH, J. HIGGINS, C. K. GRANT, N. C. PEDERSEN (1992): Interaction of acute feline herpesvirus-1 and chronic feline immunodeficiency virus infections in experimentally infected specific pathogen free cats. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 35., 95. – 119., [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(92\)90124-9](https://doi.org/10.1016/0165-2427(92)90124-9)

ROJKO J. L., M. ESSEX, Z. TRAININ (1988): Feline leukemia/sarcoma viruses and immunodeficiency. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 32., 57. – 96., ISBN: 0065-3519, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-039232-2.50007-4>

ROJKO, J. L., E. A. HOOVER, L. E. MATHES, R. G. OLSEN, J. P. SCHALLER (1979): Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection. *J. Natl. Cancer Inst.* 63., 759. – 768., DOI: 10.1093/jnci/63.3.759

ROJKO, J. L., E. A. HOOVER, L. E. MATHES, W. R. HAUSE, J. P. SCHALLER, R. G. OLSEN (1978): Detection of feline leukemia virus in tissues of cats by a paraffin embedding immunofluorescence procedure. *J. Natl. Cancer Inst.* 61., 1315. – 1321., DOI: 10.1093/jnci/61.5.1315

SCHERK, M. A., R. B. FORD, R. M. GASKELL, K. Hartmann, K. F. Hurley, M. R. Lappin, J. K. Levy, S. E. Little, S. K. Nordone, A. H. Sparkes (2013): 2013 AAFP Feline Vaccination Advisory Panel report. *J. Feline Med. Surg.* 15., 785. – 808., DOI: 10.1177/1098612x13500429, PMID: 23966005



SHELTON, G. H., M. L. LINENBERGER (1995): Hematologic abnormalities associated with retroviral infections in the cat. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)* 10., 220. – 233., PMID: 8820596

STEWART, M.A., M. WARNOCK, A. WHEELER, N. WILKIE, J. I. MULLINS, D. E. ONIONS, J. C. NEIL (1986): Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. *J. Virol.* 58., 825. – 834., DOI: 10.1128/jvi.58.3.825-834.1986

STUDER, N., H. LUTZ, C. SAEGERMAN, E. GÖNCZI, M. L. MELI, G. BOO, K. HARTMANN, M. J. HOSIE, K. MOESTL, S. TASKER, S. BELÁK, A. LLORET, C. BOUCRAUT-BARALON, H. F. EGBERINK, M.-G. PENNISI, U. TRUYEN, T. FRYMUS, E. THIRY, F. MARSILIO, D. ADDIE, M. HOCHLEITHNER, F. TKALEC, Z. VIZI, A. BRUNETTI, B. GEORGIEV, L. F. LUDWIG-BEGALL, F. TSCHUOR, C. T. MOONEY, C. ELIASSON, J. ORRO, H. JOHANSEN, K. JUUTI, I. KRAMPL, K. KOVALENKO, J. ŠENGAUT, C. SOBRAL, P. BORSKA, S. KOVAŘÍKOVÁ, R. HOFMANN-LEHMANN (2019): Pan-European study on the prevalence of the feline leukaemia virus infection – reported by the European Advisory Board on Cat Diseases (ABCD Europe). *Viruses* 11., 993. DOI: 10.3390/v11110993

STUTZER, B., F. MULLER, M. MAJZOUB, H. Lutz, C. E. Greene, W. Hermanns, K. Hartmann (2010): Role of latent feline leukemia virus infection in non regenerative cytopenias of cats. *J. Vet. Intern. Med.* 24., 192. – 197., <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0417.x>

SYKES, J. E., K. HARTMANN (2014): *Feline Leukemia Virus. U: Canine and Feline Infectious Diseases* (Sykes, J. E., Ur.) Elsevier Health Sciences, St. Louis, Missouri, USA, 224. – 235., ISBN: 0323241948

SYKES, J.E., K. HARTMANN (2021): *Feline Leukemia Virus Infection. U: Greene's infectious diseases of the dog and cat* (J. E. Sykes, Ur.) 5., Saunders, Amsterdam, Netherlands, 382. – 413., ISBN: 978-0-323-50934-3

TANDON, R., V. CATTORI, M. A. GOMES-KELLER, M. L. MELI, M. C. GOLDBERGER, H. LUTZ, R. HOFMANN-LEHMANN (2005): Quantitation of feline leukaemia virus viral and

proviral loads by TaqMan real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 130., 124. – 132., <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.06.017>

TENORIO, A.P., C. E. FRANTI, B. R. MADEWELL, N. C. PEDERSEN (1991): Chronic oral infections of cats and their relationship to persistent oral carriage of feline calici-, immunodeficiency, or leukemia viruses. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 29., 1. - 14., [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(91\)90048-H](https://doi.org/10.1016/0165-2427(91)90048-H)

TORRES, A. N., C. K. MATHIASON, E. A. HOOVER (2005): Re-examination of feline leukemia virus:host relationships using real-time PCR. *Virology* 332., 272. – 283., <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.10.050>

TSATSANIS, C., R. FULTON, K. NISHIGAKI, H. TSUJIMOTO, L. LEVY, A. TERRY, D. SPANDIDOS, D. ONIONS, J. C. NEIL (1994): Genetic determinants of feline leukemia virus-induced lymphoid tumors: Patterns of proviral insertion and gene rearrangement. *J. Virol.* 68., 8296. – 8303., DOI: 10.1128/jvi.68.12.8296-8303.1994

WILLETT, B.J., M. J. HOSIE (2012): Feline leukaemia virus: half a century since its discovery. *Vet. J.* 195., 16. – 23., <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.07.004>

## 8. SAŽETAK

Lara Ferenčić

### Molekularna i serološka dijagnostika zarazne leukemije mačaka

Virus zarazne leukemije mačaka globalno je proširen u populaciji domaćih mačaka. Zajedno s virusom mačje imunodeficijencije jedan je od vodećih infektivnih uzroka uginuća. Kao i ostali pripadnici porodice *Retroviridae*, uz pomoć enzima reverzna transkriptaza i integraza dio virusne ribonukleinske kiseline (RNK) prepisuje u provirusnu deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) koja se ugrađuje u genom domaćina, što pak dovodi do perzistentne infekcije u zaražene jedinke. Ipak, čak i nakon perzistentne infekcije ovim virusom mogući su različiti ishodi. S obzirom da ne postoji učinkovito etiološko liječenje, a mjere opće i imunoprofilakse najvažniji su načini spriječavanja pojave i širenja ove zarazne bolesti, rano prepoznavanje i određivanje stadija infekcije od iznimne je važnosti. Pravilan odabir dijagnostičkih metoda važan je jer uporabom komercijalnih dijagnostičkih testova nije moguće detektirati infekciju u njenoj regresivnoj fazi, ali i zbog toga što zaražena jedinka ne predstavlja izvor zaraze u svim stadijima bolesti. Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi podudarnost i potrebu provođenja seroloških i molekularnih metoda dijagnostike zarazne leukemije mačaka. U tu svrhu pretraženo je ukupno 42 uzorka pune krvi mačaka uporabom serološke i molekularne metode dijagnostike. Serološkom metodom dijagnostike odnosno komercijalnim imunoenzimskim testom infekcija je potvrđena u 15 uzoraka, dok je u preostalim 27 uzoraka rezultat bio negativan. Molekularnom metodom dijagnostike u svih 15 serološki pozitivnih uzoraka potvrđena je prisutnost provirusa, stoga je podudarnost pozitivne serološke pretrage i molekularne metode dijagnostike 100%. S druge strane, među 27 serološki negativnih uzoraka pune krvi, molekularnom metodom je infekcija virusom mačje leukemije dokazana je u dva uzorka ukazujući na prisutnost regresivne infekcije. Podudarnost negativnog serološkog nalaza s molekularnom metodom iznosi 92,6%. Ovaj rezultat potvrđuje nužnost uporabe obje dijagnostičke metode s ciljem postavljanja što pouzdanije i točnije dijagnostike, ali i utvrđivanja stadija infekcije što je pak iznimno važno za uspostavljanje učinkovite kontrole infekcije virusom zarazne leukemije mačaka.

**Ključne riječi:** virus zarazne leukemije mačaka (FeLV), dijagnostika, serološka pretraga, PCR

## 9. SUMMARY

Lara Ferenčić

### Molecular and serological diagnosis of Feline leukemia virus

Feline leukemia virus infection is spread globally in the domestic cat population. Together with feline immunodeficiency virus, it is one of the leading infectious causes of death. Like other members of the *Retroviridae* family, with the help of enzymes reverse transcriptase and integrase, part of the viral ribonucleic acid (RNA) is transcribed into proviral deoxyribonucleic acid (DNA) and is incorporated into the host's genome, which in turn leads to persistent infection in infected individuals. However, even after persistent infection with this virus, different outcomes are possible. Given that there is no effective etiological treatment, and general measures and immunoprophylaxis are the most important ways to prevent the occurrence and spread of this infectious disease, early recognition and determination of the stage of infection is extremely important. The correct choice of diagnostic methods is important because commercial diagnostic tests are not able to detect the infection in its regressive phase, but also because the infected individual is not the source of infection in all stages of the disease. The aim of this study was to evaluate the concordance between serological and molecular methods and assess the need for complementary use of both tests in FeLV diagnosis. For this purpose, a total of 42 feline blood samples were analyzed using serological and molecular diagnostic methods. The infection was confirmed in 15 samples using a serological diagnostic method, i.e. a commercial immunoenzyme test, while the findings were negative in the remaining 27 samples. The molecular diagnostic method confirmed the presence of the provirus in all 15 serologically positive samples, therefore the concordance between the positive serological test and the molecular diagnostic method was 100%. Among 27 serologically negative samples, FeLV infection was detected in two additional samples by proviral PCR. In this case, the agreement between a negative serological finding and the molecular method was 92.6 %. Our results confirm the necessity of using both diagnostic methods to establish a reliable and accurate diagnosis. Complementary application is also important to determine the stage of the infection, which is extremely important for effective control of FeLV infection.

**Key words:** Feline leukemia virus (FeLV), diagnostic, serological test, PCR

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 11.02.1997. u Zaboku. Osnovnu školu pohađala sam u Konjščini, a 2011. sam upisala Srednju školu Zlatar, smjer Opća gimnazija. Srednju školu završila sam 2015. te iste godine upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Na posljednjoj godini studija volontirala sam na Zavodu za rendgenologiju, ultrazvučnu dijagnostiku i fizikalnu terapiju, što mi je pomoglo u stjecanju znanja iz slikovne dijagnostike. Kroz studij povremeno volontiram i u Veterinarskoj praksi Domitran u Zlataru. 2022. sudjelovala sam na šesnaestom Simpoziju veterinarara male prakse Srbije u Beogradu.

U sklopu Erasmus+ stručne prakse 2022. godine provela sam dva mjeseca u ambulanti za male životinje Kleintiermedizin am Lützowufer u Berlinu. Tamo sam stekla osnovna znanja i vještine veterinarara kliničara.

Obaveznu stručnu praksu obavila sam preko Erasmus+ programa 2023. godine u klinici za kućne ljubimce Vetklinikum GmbH & Co. KG u Beču, u trajanju od dva i pol mjeseca. Rad u klinici pružio mi je veliko iskustvo u raznim područjima od interne veterinarske medicine do kirurgije i intenzivne skrbi.