

Seroprevalencija infektivne anemije kopitara u Republici Hrvatskoj

Belaj, Tina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:178:443097>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Tina Belaj

**SEROPREVALENCIJA
INFEKCIOSNE ANEMIJE KOPITARA
U REPUBLICI HRVATSKOJ**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

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

Predstojnik: prof. dr. sc. Zoran Milas

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Zoran Milas
2. Dr. sc. Matko Perharić
3. Izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina
4. Doc. dr. sc. Josipa Habuš

Ovom prilikom željela bih se zahvaliti mentoru izv.prof.dr.sc. Vilimu Starešini na stručnom vodstvu, savjetima, izdvojenom vremenu i trudu tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Također, hvala prijateljima koji su mi pružali potporu tijekom cijelog studiranja.

Najviše se zahvaljujem svojoj obitelji koja je bila uz mene u najljepšim i najtežim trenucima.

Hvala vam na neograničenom razumijevanju, strpljenu i podršci svih ovih godina.

POPIS KRATICA

AGID (eng. *agar gel immunodiffusion*) - agar-gel imunodifuzijski test

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

ELISA (eng. *enzyme linked immunosorbent assay*) - imunoenzimni test

gp45 - transmembranski glikoprotein ovojnice virusa

gp90 - površinski glikoprotein ovojnice virusa

IAK - infektivna anemija kopitara

mRNA (eng. *messenger RNA*) - glasnička ribonukleinska kiselina

PCR (eng. *polymerase chain reaction*) - lančana reakcija polimerazom

p11 - nukleokapsidni protein virusa

p15 - virusni matriksni protein

p26 - kapsidni protein virusa

RH - Republika Hrvatska

RNK - ribonukleinska kiselina

RT - reverzna transkriptaza

TGFβ (eng. *transforming growth factor beta*) - transformirajući čimbenik rasta beta

TNFα (eng. *tumor necrosis factor alpha*) - čimbenik tumorske nekroze alfa

POPIS PRILOGA

Slika 1. Rasprostranjenost infektivne anemije kopitara u svijetu od srpnja do prosinca 2019. godine.

Slika 2. Model virusne čestice virusa IAK.

Slika 3. Karakterističan klinički profil povezan s infekcijom virusom IAK s prikazom različitih stadija bolesti.

Slika 4. Periportalna akumulacija limfocita i makrofaga u konja inficiranog virusom IAK.

Slika 5. Distribucija serološki pozitivnih kopitara na IAK u RH u razdoblju od 2010. do 2018. godine.

Tablica 1. Prikaz broja pretraženih, broja pozitivnih i postotka pozitivnih kopitara na IAK u pojedinim županijama prema godini pretraživanja (2010., 2011., 2012.).

Tablica 2. Prikaz broja pretraženih, broja pozitivnih i postotka pozitivnih kopitara na IAK u pojedinim županijama prema godini pretraživanja (2013., 2014., 2015.).

Tablica 3. Prikaz broja pretraženih, broja pozitivnih i postotka pozitivnih kopitara na IAK u pojedinim županijama prema godini pretraživanja (2016., 2017., 2018.).

Tablica 4. Prikaz broja serološki pretraženih kopitara na IAK po županijama prema Naredbi od 2010. do 2018. godine i broja serološki pozitivnih kopitara.

Grafikon 1. Seroprevalencija infekcije virusom IAK prema godini pretraživanja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	2
2.1. POVIJEST	2
2.2. ZEMLJOPISNA PROŠIRENOST	2
2.3. ETIOLOGIJA	3
2.4. EPIZOOTIOLOGIJA	5
2.5. PATOGENEZA	7
2.6. KLINIČKA SLIKA	9
2.7. PATOLOŠKE PROMJENE	11
2.8. DIJAGNOSTIKA	12
2.8.1. DIFERENCIJALNA DIJAGNOSTIKA	14
2.9. PROFILAKSA.....	15
3. MATERIJALI I METODE	17
4. REZULTATI.....	18
5. RASPRAVA.....	24
6. ZAKLJUČCI.....	26
7. LITERATURA.....	27
8. SAŽETAK.....	36
9. SUMMARY	37
10. ŽIVOTOPIS	38

1. UVOD

Infekciозна anemija kopitara (IAK) je transmisivna septikemijska zarazna bolest za koju su prijemljivi svi pripadnici porodice Equidae uključujući konje, magarce, mazge i mule. IAK je uzrokovana perzistentnom infekcijom virusom iz porodice *Retroviridae* rod *Lentivirus* (ISSEL i sur., 1982; CHEEVERS i MCGUIRE, 1985; COOK i ISSEL, 2004.).

Širenje zaraze je, u prirodnim uvjetima, najčešće hematofagnim insektima. U prvom redu to su pripadnici porodice *Tabanidae* (obadi) te rjeđe vrsta *Stomoxys calcitrans* (štalska muha) (COOK i sur., 2013.). U Republici Hrvatskoj (RH) bolest je opisana prvi put 1934. godine (BOSNIĆ, 1936). Danas je poznato da IAK u RH ima enzootski karakter, ali povremeno dolazi do epizootija, kao što je bila velika epizootija 2002. godine u kojoj je unutar nekoliko tjedana desetine kopitara uginulo sa znacima perakutne bolesti (STAREŠINA, 2004).

Bolest karakteriziraju rekurentne epizode akutne bolesti nakon kojih većina konja postaje inaparentnim nositeljima virusa (MEALEY, 2014.). Navedeni inaparentni nositelji su rezistentni na sekundarnu infekciju različitim sojevima virusa IAK što ukazuje na prisutnost jakog imunološkog odgovora i predstavlja prirodan model imunološke kontrole lentivirusne infekcije i bolesti (MONTELARO i sur., 1993; CRAIGO i MONTELARO, 2011; CRAIGO i MONTELARO, 2013.).

Kontrola bolesti se temelji na identifikaciji i prisilnom klanju ili usmrćivanju inficiranih životinja te karanteni novonabavljenih životinja (BRANGAN i sur., 2008.). Iako je prevalencija IAK niska u mnogim zemljama, perzistentno inficirani konji u endemskim područjima predstavljaju izvore infekcije i bolest se nastavlja širiti u nova područja. Zbog navedenog, IAK je i dalje prijetnja zdravlju kopitara širom svijeta i utječe na njihov promet i trgovinu (MEALEY, 2014.).

Bolest se od 1971. godine u RH redovito testira agar-gel imunodifuzijskim testom (AGID, eng. *agar gel immunodiffusion*). Naredbom o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju koju propisuje Ministarstvo poljoprivrede, do 2019. godine je na godišnjoj razini pretraživana cjelokupna populacija kopitara u Republici Hrvatskoj.

Cilj ovog diplomskog rada je dati sažeti prikaz infektivne anemije kopitara i procijeniti učinkovitost permanentnog nadzora nad IAK s ciljem smanjenja broja pozitivnih životinja u RH.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. POVIJEST

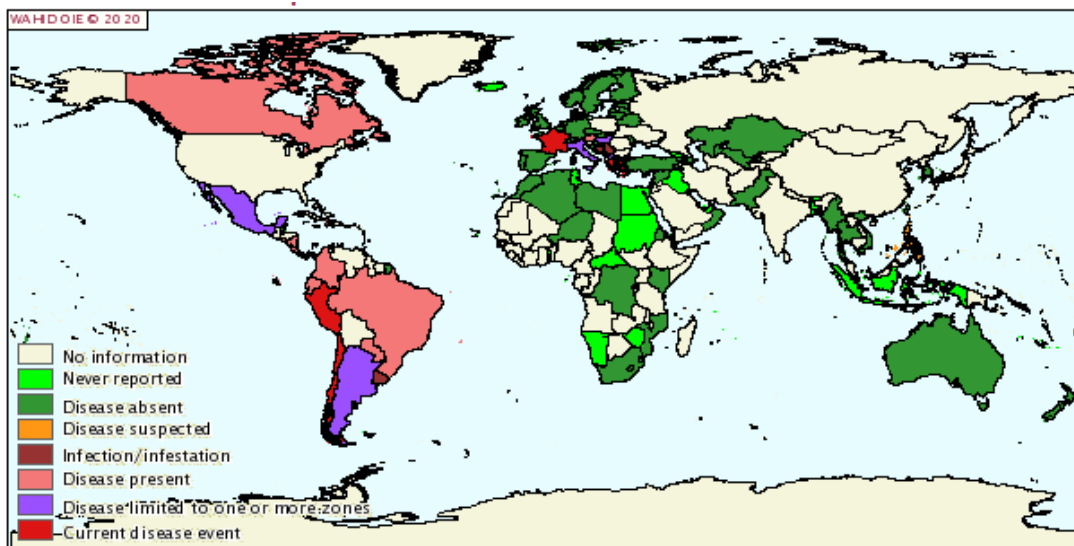
Klinički znakovi bolesti prvi su put opisani u konja u Francuskoj 1843. godine (LIGNÉE, 1843.). Vallée i Carrè 1904. godine opisuju uzročnika bolesti što ju svrstava među prve bolesti životinja dokazane da su uzrokovane virusom (VALLÉE i CARRÈ, 1904; CRAIGO i MONTELARO, 2011.). Tada je također opisana perzistentnost infekcije i prijenos bolesti putem krvi (COOK i sur., 2013.). Tek 1967. godine je dokazano da se terenski sojevi virusa IAK mogu umnažati u kulturi leukocita kopitara, a zatim su se određeni sojevi prilagodili prikladnijoj staničnoj kulturi fibroblasta. To je dovelo do značajnih postignuća u razumijevanju virusa IAK i imunopatogeneze bolesti (KONO i sur., 1970; KONO i YOSHINO, 1974; MEALEY, 2014.). Virus humane imunodeficijencije (HIV, eng. *human immunodeficiency virus*), nakon što je otkriven 1983. godine, klasificiran je u lentiviruse na temelju sličnosti u morfologiji s virusom IAK i njihove serološke unakrižne-reaktivnosti (MONTAGNIER i sur., 1984.). U Hrvatskoj, prvi slučaj IAK je opisan 1934. godine (BOSNIĆ, 1936.).

2.2. ZEMLJOPISNA PROŠIRENOST

Infektivna anemija kopitara je bolest raširena diljem svijeta i dijagnosticirana je na svim kontinentima izuzev Antarktike (CONSTABLE i sur., 2017.). Zbog najčešćeg načina prijenosa virusa putem insekata koji predstavljaju vektore, prevalencija bolesti je viša u područjima s toplijom klimom (MEALEY, 2014.). U Europi se bolest često pojavljuje i endemski je prisutna u Italiji i Rumunjskoj (CONSTABLE i sur., 2017; OIE, 2019.).

Prema podacima Svjetske organizacije za zdravlje životinja (OIE, eng. *World Organisation for Animal Health*) od 2010. do 2019. godine infekcija virusom IAK ili pojava bolesti je

najčešće zabilježena u sljedećim zemljama svijeta: Argentina, Bolivija, Bosna i Hercegovina, Brazil, Dominikanska Republika, Ekvador, Francuska, Gvajana, Gvatemala, Haiti, Honduras, Hrvatska (osim 2016. godine), Italija, Kanada, Kolumbija, Kostarika, Kuba, Mađarska, Meksiko, Nikaragva, Njemačka, Panama, Paragvaj, Rumunjska, Rusija, Salvador, Srbija, Sjedinjene Američke Države i Venezuela (OIE, 2019.).



Slika 1. Rasprostranjenost infektivne anemije kopitara u svijetu od srpnja do prosinca 2019. godine. (Izvor: OIE, 2020.)

2.3. ETIOLOGIJA

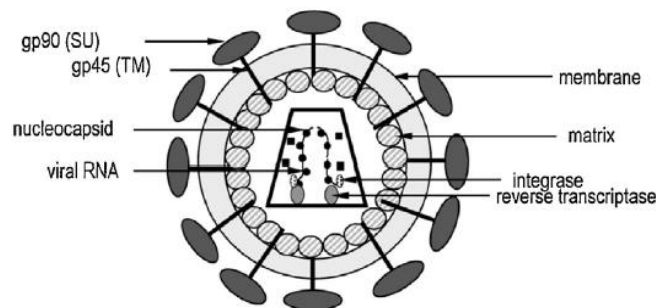
Uzročnik bolesti je virus IAK, RNK virus koji je klasificiran u rod *Lentivirus*, podporodicu *Orthoretrovirinae* i porodicu *Retroviridae*. Virus dijeli antigensku i morfološku sličnost s ostalim lentivirusima (LEROUX i sur., 2004; COOK i sur., 2013.). Virusne čestice virusa IAK su ovalne ili okrugle, promjera otprilike 115 nm i u njima je tipična lentivirusna stožasta jezgra okružena proteinskim matriksom, a on je obavijen lipidnom membranom. Lipidna ovojnica sadrži projekcije glikoproteina veličine 6-8 nm. Unutar jezgre se nalaze dvije kopije jednolančane RNK (MATHEKA i sur., 1976; WEILAND i sur., 1977; QUINLIVAN i sur., 2013.). Navedene kopije RNK genoma su usko povezane u virusnoj čestici s virusnim enzimima i proteinima kao što su virusna integraza, reverzna transkriptaza (RT, eng. *reverse transcriptase*) i nukleokapsidni proteini (WEILAND i sur., 1977.). Virusna RNK sadržava 8,2 kilobaznih parova (kbp). Genom virusa IAK se sastoji od tri glavna strukturalna gena (*gag*, *pol*

i *env*) koji su omeđeni na oba kraja virusnog genoma dugim terminalnim ponavljanjima (LTR, eng. *long terminal repeats*). Gen *gag* kodira sljedeće strukturne proteine: protein kapside (p26), protein nukleokapside (p11) i matriksni protein (p15). *Pol* gen kodira proteazu, RT i integrazu, dok *env* gen kodira površinske (gp90) i transmembranske (gp45) glikoproteine ovojnice virusa (BOLDBAATAR i sur., 2013; COOK i sur., 2013; MEALEY, 2014.). Proteinski produkti *gag* gena oblikuju jezgru virusne čestice gdje p11 ostaje povezan s virusnim genomom, p26 oblikuje stožastu strukturu jezgre, a p15 okružuje jezgru i oblikuje matriks (ISSEL i sur., 2014.). Osim navedenih strukturnih gena, virusni genom posjeduje i tri dodatna otvorena čitajuća okvira (ORF, eng. *open reading frames*) (Tat, Rev i S2) koji kodiraju akcesorne proteine uključene u regulatorne funkcije i važne za virusnu patogenezu (COOK i sur., 2013.). Proteini Tat i Rev su zajednički svim lentivirusima, dok je S2 jedinstven za virus IAK (DONG i sur., 2013.).

Prilikom nailaska na stanicu domaćina, površinski glikoprotein gp90 (koji se projektira s površine ovojnice virusa IAK) veže se za ekvini lentivirusni receptor-1 na stanici domaćina. Navedeni receptor je srodan receptorskim proteinima podrijetlom od čimbenika tumorske nekroze (TNF, eng. *tumor necrosis factor*) (ZHANG i sur., 2005.). Nakon vezanja, virus može biti internaliziran endocitozom (JIN i sur., 2005; BRINDLEY i MAURY, 2008.). Međutim, određeni sojevi virusa ulaze u stanicu domaćina stapanjem virusne ovojnice sa staničnom membranom domaćina (BRINDLEY i MAURY, 2008.). Jednom kada se virusna čestica nađe unutar stanice, virusna RNK se oslobađa i otpušta u citoplazmu stanice domaćina. Replikacija virusnog genoma počinje prevođenjem virusne RNK u jednolančanu komplementarnu DNK što je katalizirano RT-om. Stvaranje drugog lanca DNK koji je komplementaran prvom, posredovano je DNK-ovisnom DNK polimeraznom aktivnošću RT što rezultira stvaranjem linearne dvolančane virusne DNK (RUBINEK i sur., 1994.). Virusna DNK se zatim transportira u jezgru stanice domaćina i uz pomoć virusne integraze ugrađuje u genom domaćina gdje ostaje u obliku provirusa (MEALEY, 2014.). Ugradnjom u genom domaćina, provirus postaje sastavan dio kromosoma domaćina i to mu pomaže u izbjegavanju staničnog imunološkog nadzora te rezultira doživotnom perzistentnom infekcijom (ISSEL i sur., 2014; LIU i sur., 2015.). Integriran provirus koristi stanične mehanizme domaćina za DNK replikaciju i transkripciju do glasničke RNK (mRNA, eng. *messenger RNA*). Zatim slijedi evakuacija virusne mRNA u citoplazmu, sinteza različitih virusnih proteina i sklapanje virusne čestice (CRAIGO i MONTELARO, 2010.). Novo se sastavljene virusne čestice ispušćuju iz stanice domaćina i zadržavaju dio stanične membrane u obliku ovojnice. Ciklus

replikacije se nastavlja kako nove virusne čestice inficiraju nove stanice domaćina (MEALEY, 2014.).

Reverzna transkriptaza je sklona pogreškama i predviđa se da kao posljedica visokih stopa pogrešaka, svaki krug reverzne transkripcije rezultira barem jednom mutacijom virusnog genoma što dovodi do značajnog povećanja genetske raznolikosti (COOK i sur., 2013.). Znatan antigenski drift postoji u površinskim glikoproteinima (gp 45 i gp90) i pojava novih antigenih varijanti je povezana s ponavljajućim febrilnim epizodama karakterističnim za bolest (CONSTABLE i sur., 2017.). Postojanje virusnih kvazi-vrsta (eng. *quasispecies*) ukazuje na genetski različite virusne subpopulacije različitog fenotipa koje postoje unutar kronično inficirane, često asimptomatske životinje (SPONSELLER i sur., 2007.).



Slika 2. Model virusne čestice virusa IAK.

(Izvor: COOK i sur., 2013.)

2.4. EPIZOOTIOLOGIJA

Infekciозна anemija kopitara je bolest rasprostranjena širom svijeta od koje oboljevaju kopitari, uključujući konje, ponije, magarce, mule i zebre (MEALEY, 2014.). Klinički simptomi bolesti ovise o brojnim čimbenicima kao što su virusni soj, titar virusa u krvi, vrsta životinje i individualna genetika domaćina (COOK i sur., 2001.). Konji i poniji karakteristično razvijaju znakove bolesti unutar nekoliko dana do nekoliko tjedana nakon infekcije. Mule također nakon infekcije razvijaju kliničke znakove slične onima u konja i ponija ako su inficirane sojevima patogenima za konje. Suprotno tome, magarci ne razvijaju

očite znakove bolesti unatoč perzistentnoj infekciji virusom koji potječe od konja (CONSTABLE i sur., 2017.).

Izvori infekcije virusom IAK su zaražene životinje u svim stadijima bolesti (CONSTABLE i sur., 2017.). Prijenos krvi inficiranih životinja putem hematofagnih insekata je najčešći način prirodnog prijenosa virusa. Insekti predstavljaju samo mehaničke vektore zbog toga što se virus ne umnaža unutar njihovih stanica, a krv prenose na usnom aparatu. Navedeni hematofagni insekti odgovorni za prijenos virusa IAK između konja uključuju *Chrysops* spp. (jelensku muhu) i *Tabanus* spp. (konjski obad) koji pripadaju porodici *Tabanidae*, i *Stomoxys calcitrans* (stajsku muhu) (HAWKINS i sur., 1976; ISSEL i FOIL, 1984.). Konjski obad je od navedenih vektora najučinkovitiji u prenošenju virusa zbog velikog usnog aparata kojim može prenijeti veću količinu krvi (ISSEL i FOIL, 1984.). Prijenos se javlja isključivo ako je hranjenje insekata ometano, kao na primjer pokretima konja, kada obično pokušaju dovršiti svoj obrok na početnom domaćinu ili obližnjoj životinji. Ako je početan domaćin zaražen, insekt može prenijeti krv te životinje sekundarnom domaćinu i širiti infekciju (HAWKINS i sur., 1973; ISSEL i FOIL 1984; ISSEL i sur., 1988.). Obadi mogu prijeći put dulji od 6 km, no kada im je hranjenje ometano rijetko lete dalje od 200 m kako bi dovršili obrok. Zbog navedenog, u prevenciji širenja bolesti važno je sumnjive konje držati na udaljenosti od najmanje 200 m od ostalih primljivih životinja (CONSTABLE i sur., 2017.). Prijenos je vjerojatniji kada su vektori prisutni u većem broju što objašnjava veću pojavnost bolesti u područjima s toplijom klimom i tijekom ljetnih mjeseci (ISSEL i FOIL, 1984.). Također, vjerojatniji je prijenos virusa od konja s visokim titrom viremije i kliničkim oblikom bolesti nego od inaparentnih nositelja s niskom razinom virusa u krvi (MEALEY, 2014.). Uz hematofagne insekte, jatrogeno širenje infekcije također ima veliku ulogu u prenošenju bolesti. Virus IAK je nađen u sekretima i ekskretima inficiranih životinja te je jatrogeni prijenos putem upotrebe kontaminiranih igala, brizgalica, kirurških instrumenata i ostale veterinarske opreme, vrlo značajan (CHEEVERS i MCGUIRE 1985; ISSEL i sur., 1988; SELLON i sur., 1994.). Dokazano je da virus može na iglama preživjeti do 4 dana pri sobnoj temperaturi (WILLIAMS i sur., 1981.). U enzootskim područjima, izbijanja bolesti su također bila uzrokovana transfuzijom kontaminiranih krvnih pripravaka podrijetlom od konja (MORE i sur., 2008.). Transplacentarni prijenos se rijetko javlja i može rezultirati pobačajem ili ždrijebljenjem inficiranog ždrebeta koji često ugiba unutar 2 mjeseca (KUHAR i sur., 2014; CONSTABLE i sur., 2017.). Međutim, pozitivne kobile s visokim virusnim titrom, no bez kliničkim znakova bolesti, mogu oždrijebiti zdravu ždrebad (ISSEL i sur., 1985; COOK i

ISSEL, 2004.). Vertikalni prijenos se može pojaviti i tijekom porođaja ili ingestijom kontaminiranog kolostruma ili mlijeka (KEMEN i COGGINS, 1972; TASHJIAN, 1984.). Virusno specifična kolostralna protutijela su detektirana u serumu zdravih ždrebadi oždrijebljenih od inficiranih kobilica do 336 dana nakon oždrijebljenja (MCCONNICO i sur., 2000.). Postoji mogućnost i virusne infekcije putem intaktne oralne i nazalne sluznice, rana ili čak neoštećene kože no ta su ulazna vrata od minimalnog značaja u terenskim uvjetima (CONSTABLE i sur., 2017.). Izbijanje IAK u Irskoj 2006. godine upućivalo je na vjerojatnost prijenosa virusa putem aerosola (MORE i sur., 2008; BOLFA i sur., 2013.).

2.5. PATOGENEZA

Nakon infekcije, virus IAK se umnaža u tkivima bogatim makrofagima, a slezena je glavno mjesto virusne infekcije i njegovog umnažanja te sadržava preko 90% celularnog virusnog titra (CONSTABLE i sur., 2017.). Ostala mjesta odvijanja aktivne infekcije uključuju jetra, limfne čvorove, koštanu srž, mononuklearne stanice periferne krvi, pluća, nadbubrežne žlijezde, bubrege i mozak (HARROLD i sur., 2000.). Iako je virusno umnažanje ograničeno tijekom razdoblja stišavanja klinički vidljive bolesti, virus se nastavlja umnažati (OAKS i sur., 1998). Virus je detektabilan u malim koncentracijama u većini tkiva asimptomatskih konja inficiranih virusom IAK. Tijekom razdoblja relapsa klinički vidljive bolesti stupanj viremije raste, a tada virus izoliran iz krvi ima antigenske karakteristike različite od virusa koji je prvotno inficirao životinju. Antigenski drift gp45 i gp90 antigena, koji se stalno zbiva čak i u asimptomatskih konja s niskom razinom viremije, omogućuje mutacije virusa koji zatim izbjegava imunološki odgovor, umnaža se i uzrokuje klinički vidljivu bolest (CONSTABLE i sur., 2017.). Klinički su znakovi bolesti posredovani proupalnim citokinima kao što su čimbenik tumorske nekroze alfa (TNF α , eng. *tumor necrosis factor alpha*), interleukin-1alfa (IL-1 α), interleukin-1beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) i transformirajući čimbenik rasta beta (TGF β , eng. *transforming growth factor beta*) (LIM i sur., 2005.). Jednom otpušteni od stanica domaćina, proupalni citokini poput TNF α mogu pokrenuti aktivaciju puta arahidonske kiseline što rezultira produkcijom prostaglandina E2 (PGE2) i vodi do febrilnih epizoda bolesti (TORNQUIST i CRAWFORD, 1997; LIM i sur., 2005.). Pokazalo se i da infekcija virusom IAK može izazvati oksidacijski stres putem promjena razina glutaciona peroksidaze i mokraćne kiseline (BOLFA i sur., 2012.).

Imunološki odgovor na infekciju virusom IAK odgovoran je za kontrolu umnažanja virusa i ima važnu ulogu u patogenezi bolesti (SPONSELLER i sur., 2007.). Glavni klinički znakovi i

lezije IAK se mogu pripisati odgovoru domaćina na virus, a ne izravnom oštećenju tkiva (CONSTABLE i sur., 2017.). S obzirom da se citotoksični T-limfociti mogu detektirati kod eksperimentalnih infekcija 14-og dana nakon infekcije, smatra se da je stanično-posredovana imunost odgovorna za inicijalnu kontrolu infekcije (MEALEY i sur., 2005; COOK i sur., 2013.). Također, uočeno je da početna viremija kod akutne infekcije prestaje prije pojave neutralizirajućih protutijela, no završava istovremeno s pojavom citotoksičnih T-limfocita (HAMMOND i sur., 1997; MCGUIRE i sur., 2002.). Epitopi citotoksičnih T-limfocita su identificirani u nekoliko virusnih proteina, uključujući *gag*, *pol*, *env* i Rev (MCGUIRE i sur., 2000; MEALEY i sur., 2003; CHUNG i sur., 2005; MEALEY i sur., 2006.). Rana istraživanja pokazuju da se u razdoblju između viremičnih epizoda razvijaju serumska protutijela koja neutraliziraju virus u plazmi (koji potječe od prijašnjih epizoda viremije i kliničke bolesti) ali nisu sposobna neutralizirati virusne antigene varijante koje se javljaju tijekom sljedećih viremičnih epizoda (KONO, 1988.). Jednom kada je umnažanje kontrolirano, životinja neće imati očite kliničke znakove bolesti sve do pojave virusne varijante koja može izbjeći imunološki nadzor (COOK i sur., 2013.). Aminokiselinske promjene se primarno javljaju unutar hipervarijabilnih V3-V7 regija površinskog glikoproteina ovojnice virusa (gp90) (MEALEY i sur., 2004.). Navedena otpornost na neutralizaciju se može postepeno povećavati tijekom infekcije virusom IAK (HOWE i sur., 2002.). Nadalje, većina virusa u viremičnih konja se sastoje od antigen-protutijelo kompleksa. Antigen-protutijelo kompleksi su fagocitirani od strane stanica retikuloendotelnog sustava, uključujući tkivne makrofage, i uključeni u razvoj groznice, depresije, trombocitopenije, anemije i glomerulonefritisa (CONSTABLE i sur., 2017.). Bez obzira na sve navedeno, umnažanje virusa je naposljetku kontrolirano u inaparentnih nositelja i ta je kontrola vjerojatno rezultat širokih odgovora citotoksičnih T-limfocita i neutralizirajućih protutijela (MEALEY, 2014.). Međutim, klinički znakovi bolesti se često ponovno javljaju u inaparentnih nositelja nakon imunosupresije izazvane upotrebom kortikosteroida (TUMAS i sur., 1994; CRAIGO i sur., 2002.).

Anemija je stalna klinička abnormalnost povezana s infekcijom virusom IAK i njena je ozbiljnost u korelaciji s učestalošću i trajanjem febrilnih epizoda (MCGUIRE i sur., 1990.). Ona se pripisuje kraćem životnom vijeku eritrocita i njihovom smanjenom produkcijom. Infekcija virusom IAK skraćuje životni vijek cirkulirajućih eritrocita na otprilike 38 dana u odnosu na normalan vijek od 130 dana. Skraćeni životni vijek eritrocita je vjerojatno rezultat prisutnosti kompleksa antigen-protutijelo na površini eritrocita koji se zatim uklanjaju putem retikuloendotelnog sustava na što ukazuje prisutnost sideroleukocita u perifernoj krvi

inficiranih konja (CONSTABLE i sur., 2017.). Imuno-posredovana destrukcija je vjerojatno pokrenuta vezanjem virusnih hemaglutininskih podjedinica za eritrocite koje zatim oblažu protutijela i vežu C3 komponentu komplementa (SENTSUI i KONO, 1981; CHEEVERS i MCGUIRE, 1985; SENTSUI i KONO, 1987; MCGUIRE i sur., 1990.). Virus također ima supresivan učinak na stanice eritroidne loze u koštanoj srži (CONSTABLE i sur., 2017.). Iako je točan mehanizam supresije eritropoeze nepoznat, anemija je djelomično rezultat disregulacije eritropoeze koju uzrokuje TNF α (MOLDAWER i sur., 1989; ZAMAI i sur., 2000; DUFOUR i sur., 2003; FELLI i sur., 2005.).

Trombocitopenija je jedna od najranijih i najkonzistentnijih abnormalnosti u konja inficiranih virusom IAK i u uskoj je korelaciji s groznicom i viremijom (SELLON i sur., 1994.). Ona se pripisuje taloženju virus-protutijelo kompleksa na trombocite koji se naknadno uklanjaju tkivnim makrofagima (CONSTABLE i sur., 2017.). Imuno-posredovana destrukcija trombocita se javlja nakon vezanja imunoglobulina G (IgG) ili imunoglobulina M (IgM) što vodi trombocitopeniji, splenomegaliji i hepatomegaliji (BANKS i HENSON, 1972; CLABOUGH i sur., 1991.). Međutim, identificiran je i primaran produkcijski deficit. Trombocitopenija može biti potaknuta putem TNF α /TGF β posredovane supresije rasta ekvinih megakariocita (TORNQUIST i CRAWFORD, 1997.). Također, jedno od objašnjenja pojave trombocitopenije je povećano uklanjanje trombocita zbog povećane in vivo aktivacije i formiranja agregata trombocita što je oblik neimuno-posredovane destrukcije trombocita (CONSTABLE i sur., 2017.). Također, infekcija endotelnih stanica može potaknuti prijanjanje trombocita i njihovu agregaciju (OAKS i sur., 1999.). Međutim, supresija trombopoeze je vjerojatno predominantan mehanizam virusom inducirane trombocitopenije (MEALEY, 2014.).

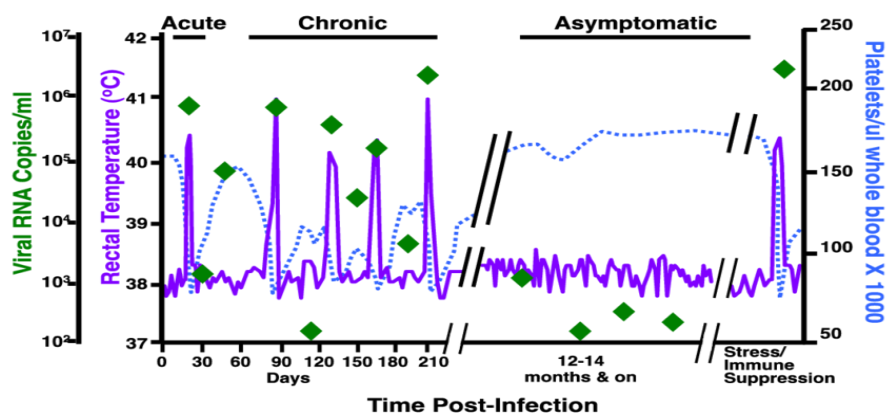
2.6. KLINIČKA SLIKA

Klinički tijek IAK ovisi o dozi i virulenciji virusa te osjetljivosti domaćina (KEMENY i sur., 1971.). Lakši klinički oblik se može javiti u magaraca i mula (COOK i sur., 2001.). U prirodnim uvjetima inkubacijski period IAK obično iznosi od 2 do 4 tjedna (CONSTABLE i sur., 2017.). Opisana su 3 karakteristična klinička stadija IAK: akutan, kroničan i inaparentan stadij bolesti, međutim razlike među njima nisu potpune (SELLON i sur., 1994.). Akutni stadij bolesti prati inicijalnu infekciju s virulentnim sojem virusa. Izražena viremija se može

razviti 5 do 30 dana nakon izlaganja virusu i rezultirati groznicom, trombocitopenijom, letargijom i inapetencijom (MEALEY, 2014.). Obično se na početku javljaju anoreksija, depresija, slabost i gubitak kondicije. Intermitentna groznica može iznositi i do 41°C i njene vrijednosti mogu brzo rasti i padati. Također, mogu se opaziti edemi ventralnog dijela abdomena, prepucija i ekstremiteta, žutica i petehijalna krvarenja sluznica. U navedenom ranom stadiju bolesti sluznice su obično kongestirane i edematozne te se može pojaviti rijedak serosangvinozni nosni iscjedak. Karakteristično je povećanje frekvencije i intenziteta srčanih tonova. Javlja se i značajno uvećanje slezene što se može otkriti rektalnim pregledom, a gravidne kobile mogu pobaciti. Većina životinja se oporavlja od navedenog akutnog stadija bolesti nakon 3 dana do 3 tjedna. Ostale životinje postaju s vremenom sve slabije i ugibaju nakon 10 do 14 dana bolesti (CONSTABLE i sur., 2017.). Povremeno, početak infekcije može biti blag do inaparentan i praćen brzim kliničkim oporavkom, no većina inficiranih konja proživljava rekurentne epizode akutne bolesti (MEALEY, 2014; CONSTABLE i sur., 2017.). Ako se životinje oporave od akutne infekcije, bolest postaje kronična i životinje mogu biti afebrilne određeno vrijeme (nekoliko dana do nekoliko mjeseci). Nakon toga slijede rekurentne epizode bolesti karakterizirane viremijom, groznicom, letargijom, anoreksijom, trombocitopenijom, anemijom, edemima i povremeno neurološkim znakovima (MCCLURE i sur., 1982; SELLON i sur., 1994; ISSEL i sur., 2014; MELAEY, 2014.). Neurološki znakovi koji se povremeno razvijaju mogu uključivati ataksiju i encefalitis (MCCLURE i sur., 1982; OAKS i sur., 2004.). Tijekom navedenih epizoda bolesti može doći i do uginuća životinje (CONSTABLE i sur., 2017.). Kliničke epizode obično traju 3 do 5 dana, a interval između epizoda je varijabilan i iznosi od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci (MEALEY, 2014.). Svaka epizoda je povezana s antigeno posebnom virusnom varijantom (MONTELARO i sur., 1984; RWAMBO i sur., 1990.).

Trombocitopenija se pojavljuje tijekom inicijalne epizode bolesti i može prethoditi pojavi serokonverzije konja (MORE i sur., 2008.). Ona je najozbiljnija tijekom febrilnih epizoda i može biti toliko izražena da omogućiti razvoj petehijalnih krvarenja. Anemija je normocitna i normokromna i može postati teža s pojavom rekurentnih epizoda. Prisutnost sideroleukocita (leukocita koji sadrže hemosiderin) smatra se jednim od pokazatelja bolesti. Također, hipergamaglobulinemija može biti prisutna (CONSTABLE i sur., 2017.). Biokemijska pretraga seruma može otkriti porast koncentracije bilirubina, povećanje aktivnosti glutamat hidrogenaze i smanjenje koncentracije željeza (MORE i sur., 2008.).

Kod većine inficiranih konja kliničke epizode bolesti se stišavaju unutar godine dana nakon početka infekcije i ti konji postaju inaparentni nositelji virusa (COOK i ISSEL, 2004; MEALEY, 2014). Inaparentni nositelji su klinički asimptomatski i imaju vrlo nizak virusni titar u plazmi (MEALEY, 2014.). Iako je rizik prijenosa virusa mali, oni predstavljaju rezervoare bolesti (ISSEL i COGGINS, 1979; ISSEL i ADAMS, 1979.). Infekcija je doživotna, a terapija imunosupresivnim lijekovima može ponovno izazvati viremiju i klinički oblik bolesti što ukazuje na mogućnost pobuđivanja kliničke epizode bolesti putem stresa (KONO i sur., 1976; TUMAS i sur., 1994; MEALEY, 2014.).

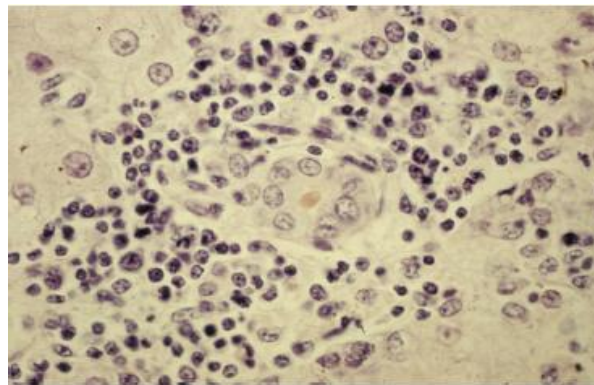


Slika 3. Karakterističan profil bolesti povezan s infekcijom virusom IAK s prikazom različitih stadija bolesti. (Izvor: CRAIGO i MONTELARO, 2013.)

2.7. PATOLOŠKE PROMJENE

Patološke promjene nađene u životinja inficiranih virusom IAK uključuju potkožne edeme, žuticu, petehijalna ili ekhimotična subserozna krvarenja, hepatomegaliju, splenomegaliju i generaliziranu limfadenopatiju (KONNO i YAMAMOTO, 1970; KEMEN i COGGINS, 1972; SELLON i sur., 1994.). Koštana srž je crvenkaste boje kao rezultat povećanja hematopoetskog tkiva i može sadržavati fokalne infarkte (CONSTABLE i sur., 2017.). U akutnoj fazi bolesti može se uočiti i tromboza krvnih žila (SELLON i sur., 1994.). Tijekom kroničnog stadija, iznurenost i bljedilo tkiva su često jedini veliki pokazatelji. Karakteristične histološke lezije uključuju hemosiderozu, perivaskularne infiltrate okruglih stanica u mnogim organima i opsežnu proliferaciju mononuklearnih fagocitnih stanica (CONSTABLE i sur.,

2017.). Infiltracije limfocita i makrofaga su prisutne u različitim organima uključujući jetra, slezenu, koštanu srž, nadbubrežne žlijezde, srce, bubrege i moždane ovojnice. Lezije u jetri uključuju negnojni hepatitis s infiltratima makrofaga i limfocita, primarno u periportalnim područjima. Navedeni stanični infiltrati su rezultat specifičnog imunološkog odgovora na virusne antigene (MCGUIRE i sur.,1990.). Uočiti se može i glomerulonefritis, vjerojatno uzrokovan taloženjem antigen-protutijelo kompleksa na glomerularnom epitelu (CONSTABLE i sur., 2017.). Glomerulonefritis je karakteriziran zadebljanjem bazalnih membrana i infiltratima upalnih stanica (BANKS i sur., 1972.). U konja je također čest nalaz intersticijske pneumonije (BOLFA i sur., 2013.). Lezije u konja s neurološkim oblikom bolesti uključuju limfohistiocitni periventrikularni leukoencefalitis, negnojni granulomatozni ependimitis, meningitis, encefalitis i plazmocitno-limfocitnu infiltraciju mozga i leđne moždine (MCCLURE i sur., 1982; OAKS i sur., 2004.). U inaparentnih nositelja, tkivne lezije su obično blage ili odsutne (MONTELARO i sur., 1993; SELTON i sur., 1994.).



Slika 4. Periportalna akumulacija limfocita i makrofaga u konja inficiranog virusom IAK (Hematoksilin-eozin bojenje).

(Izvor: MEALEY, 2014.)

2.8. DIJAGNOSTIKA

Većina slučajeva infekcije virusom IAK je otkrivena na osnovu pozitivnog rezultata na jedan ili više seroloških testova u kopitara bez očitih kliničkih znakova bolesti (COOK i sur., 2013.). U općoj upotrebi su dva testa: Agar-gel imunodifuzijski test (AGID ili Cogginsov test) i niz imunoenzimnih testova (ELISA, eng. *enzyme linked immunosorbent assay*), uključujući i kompetitivni imunoenzimni test (ALVAREZ i sur., 2007; PIZA i sur., 2007; REIS i sur., 2012; CRAIGO i sur., 2012; HU i sur., 2014; ALVAREZ i sur., 2015.). Agar-gel

imunodifuzijski test je najšire prihvaćen dijagnostički postupak za potvrdu IAK, standardiziran je upotrebom rekombinantnih reagensa i visoko je specifičan (MEALEY, 2014.). Većina komercijalno dostupnih AGID test kitova koristi rekombinantan virusni protein (p26) kao antigen za upotrebu u testu (COOK i sur., 2013.). Iako je najšire prihvaćen dijagnostički test, u terenskim uvjetima zabilježeno je razdoblje od čak 157 dana od infekcije do prvog pozitivnog rezultata (CULLINANE i sur., 2007.). Međutim, protutijela protiv p26 proteina su detektabilna AGID testom u većine konja 45 dana nakon infekcije (CONSTABLE i sur., 2017.). Komercijalno dostupne ELISA-e detektiraju protutijela protiv p26 proteina, gp45 proteina ili oba proteina (ISSEL i sur., 2013.). S obzirom da je ELISA osjetljivija od AGID testa ali manje specifična, pozitivan se rezultat mora potvrditi AGID testom (MEALEY, 2014.). Također, Western blot metoda se može koristiti za detektiranje protutijela protiv p26 proteina i proteina ovojnice virusa (gp45 i gp90). Strategija tri razine je strategija koja koristi kombinaciju testova, a bazirana je na njihovim prednostima: ELISA se koristi prva, zatim slijedi potvrda AGID testom, a Western blot se koristi ako su rezultati ELISA-e i AGID testa neskladni. Nedavno inficirani kopitari mogu predstavljati značajan rizik prijenosa virusa puno prije nego postanu seropozitivni. Zbog navedenog, veliki nedostatak indirektnih seroloških tehnika je razlika u vremenu između izlaganja patogenu i razvoja detektabilnih humoralnih odgovora (COOK i sur., 2013.). Lažno negativni rezultati AGID ili ELISA testa se pojavljuju zbog niske razine protutijela protiv p26 antigena. Lažno pozitivni rezultati se mogu pojaviti u ždrebadi inficiranih kobila. Kolostralni prijenos protutijela protiv p26 antigena može biti detektabilan do 6 mjeseci nakon ždrijebljenja (CONSTABLE i sur., 2017.).

Razvijeni su i testovi za detekciju provirusne DNK ili virusne RNK u krvi i tkivima i korisni su u detektiranju prisutnosti virusa kada su njegove koncentracije u krvi i /ili tkivu niske (CONSTABLE i sur., 2017.). Postupci otkrivanja nukleinskih kiselina se uglavnom svode na korištenje lančane reakcije polimerazom (PCR, eng. *polymerase chain reaction*), a većina objavljenih PCR protokola cilja virusni *gag* gen (COOK i sur., 2002; NAGARAJAN i SIMARD, 2007; QUINLIVAN i sur., 2007; CAPPELLI i sur., 2011; DONG i sur., 2012.). Međutim, tehnike dijagnostike IAK temeljene na PCR-u suočavaju se s dvije velike prepreke. Prva je prepreka što PCR može gubiti osjetljivost ili čak može doći do prestanka amplifikacije ako postoji varijacija u sekvencama koje vežu početnice (eng. *primers*) i/ili varijacija u sekvencama koje vežu probe u slučaju određenih Real-time PCR tehnika. Sekvence virusa IAK su vrlo varijabilne među geografski različitim izolatima i u individualno inficiranih

životinja određene regije virusnog genoma mogu tijekom vremena podlijeći značajnim mutacijskim promjenama (COOK i sur., 2013.). Zbog navedenog, posebni geografski izolati virusa IAK postoje u obliku složenih populacija srodnih virusnih genotipova ili kvazi-vrsta koje nisu identične (LEROUX i sur., 2004.). Istraživanja su pokazala da bi uz *env* gen značajne varijacije među izolatima mogle postojati u ostalim virusnim genima kao što je *gag* gen (QUINLIVAN i sur., 2007.). Drugi potencijalan problem kod razvoja direktnih molekularnih dijagnostičkih testova za virus IAK je taj što moraju posjedovati adekvatnu osjetljivost zbog toga što je nakon početnog izlaganja virusu i nakon prestanka kliničkih znakova bolesti virusni titar u krvi i tkivu često vrlo nizak (HARROLD i sur., 2000; COOK i sur., 2003.). S obzirom na sve navedeno, molekularna dijagnostika nudi prednost u otkrivanju viremije, ali trenutno je ograničena jer dostupne početnice za PCR ne detektiraju pouzdano sve sojeve virusa (BOLDBAATAR i sur., 2013; COOK i sur., 2013.).

Virus se može izolirati inokulacijom krvi sumnjive životinje na kulturu leukocita koja potječe od neinficiranih životinja (OIE, 2019.). Međutim, izolacija virusa se ne preporučuje kao dijagnostička metoda IAK jer joj nedostaje osjetljivost, a i pripremanje kulture leukocita je samo po sebi zahtjevno (OIE, 2019; ISSEL i sur., 2014.).

Biološki pokus uključuje intravenski prijenos 250 mL pune krvi sumnjivog konja primljivom ždrebetu i praćenje serokonverzije ždrebeta i razvoja kliničkih znakova IAK (COGGINS i sur., 1972.).

2.8.1. DIFERENCIJALNA DIJAGNOSTIKA

Kod akutnog oblika bolesti diferencijalno dijagnostički je potrebno isključiti purpuru hemorrhagicu, piroplazmozu, granulocitnu erlihiozu kopitara, arteritis konja, autoimunu hemolitičku anemiju, leptospirozu, parazitarne invazije i idiopatsku trombocitopeniju. Kroničan oblik bolesti treba razlikovati od unutarnjeg apscediranja (*Streptococcus equi*), kronične upalne bolesti, novotvorina i kroničnog hepatitisa (CONSTABLE i sur., 2017.).

2.9. PROFILAKSA

Ne postoji specifična terapija za liječenje IAK. Potporna terapija koja bi uključivala transfuziju krvi, nesteroidne protuupalne lijekove i obloge, može olakšati klinički oporavak, ali važno je zapamtiti da oporavljene životinje ostaju doživotno inficirane (ISSEL i sur., 2014; MEALEY, 2014; CONSTABLE i sur., 2017.).

Kontrola IAK se temelji na identifikaciji i prisilnom klanju ili usmrćivanju inficiranih životinja, karanteni i obveznom testiranju uvezenih konja. Također, ovdje se ubrajaju druge radnje s ciljem prevencije širenja virusa koje uključuju kontrolu insekata i strogu higijenu prilikom vakcinacije ili uzimanja uzoraka krvi konja (BRANGAN i sur., 2008.). Iako se zahtjevi među državama razlikuju, u mnogim se sljedeće kategorije konja moraju testirati na IAK: konji koji su uvezeni iz drugih država, konji koji sudjeluju na izložbama ili natjecanjima te prilikom njihove prodaje ili promjene vlasnika. Zbog praćenja bolesti poželjno je konje jednom godišnje testirati, a pogotovo u područjima s visokom prevalencijom (MEALEY, 2014.). Međunarodna regulatorna tijela uključujući OIE, također preporučuju serološki nadzor primljive populacije kopitara u međunarodnom prometu i nametanje restrikcija u trgovini i prometu za serološki pozitivne kopitare (COOK i ISSEL, 2004; OIE, 2013; ISSEL i sur., 2014.). Identifikacija inficiranih, klinički asimptomatskih životinja se uglavnom provodi putem seroloških testova. Konji bi trebali biti testirani prije uvođenja u krdo i ukoliko je moguće ponovno za 1 do 2 mjeseca. Ako se uvode sumnjivi konji, trebalo bi ih držati pod strogim nadzorom barem 6 mjeseci prije nego što se uvedu među ostale životinje. Inficirane i sumnjive konje treba izdvojiti od ostalih zdravih konja, magaraca i mula na udaljenosti od barem 200 metara (CONSTABLE i sur., 2017.). Ukoliko se životinja testira na IAK i rezultat je pozitivan, ona se smješta u karantenu te radi potvrde ponovno testira. Konji kojima je potvrđena IAK nazivaju se reaktorima. Svi konji koji su bili na udaljenosti do 200 metara od reaktora smatraju se sumnjivima i moraju se držati u karanteni. Takvi konji se testiraju u intervalima od 30 do 60 dana i svaki dodatan reaktor se uklanja. Karantena se ukida kada su svi konji koji su bili izloženi infekciji negativni barem 60 dana nakon neškodljivog uklanjanja posljednjeg reaktora. Konji koji nisu odmah usmrćeni ili direktno otpremljeni u odobrenu klaonicu, moraju biti trajno označeni žigom ili usnom tetovažom (MEALEY, 2014.). U zemljama s čestom pojavom bolesti uobičajena je kontrola prometa konja putem sustava dozvola i certifikata kao potvrda da su slobodni od bolesti i inzistiranje na žigosanju ili

tetoviranju svih konja. Konji s pozitivnim AGID ili ELISA testom smiju se premještati samo pod posebnim uvjetima (CONSTABLE i sur., 2017.).

Isušivanje močvarnih područja i kontrola hematofagnih insekata mogu pomoći u smanjivanju širenja bolesti. Zaštita se djelomice može postići uporabom repelenata i smještajem životinja u zatvorene prostore (CONSTABLE i sur., 2017.). Donori krvi i plazme bi trebali biti testirani zbog rizika prijenosa bolesti (MEALEY, 2014.). Važno je izbjegavati i mogućnost prijenosa virusa putem kirurških instrumenata koji mogu biti sterilizirani prokuhavanjem u vremenu od 15 minuta ili autoklaviranjem. Sva oprema treba biti očišćena od organske tvari prije provođenja dezinfekcije (CONSTABLE i sur., 2017.).

Postoje značajni problemi vezani uz razvoj cjepiva protiv IAK. Neutralizirajuća protutijela su specifična za odgovarajući virus, ali velika varijacija u fenotipovima divljeg virusa predstavlja problem u poticanju neutralizirajućih protutijela koja bi štitila protiv svih mogućih infektivnih fenotipova (CRAIGO i sur., 2015.). Cjepiva su dostupna u određenim dijelovima svijeta ali nisu u općoj upotrebi (TAGMYER i sur., 2008.). Inaktivirana, cijelo-virusna cjepiva su sigurna, ali podjedinična cjepiva mogu zapravo povećati pojavnost bolesti. Jedno eksperimentalno atenuirano DNK provirusno cjepivo je pružalo kompletnu zaštitu u eksperimentalno inficiranih konja i bilo je u široj upotrebi u Kini. Čini se da su atenuirana cjepiva najviše efikasna vjerojatno zbog toga što je kontinuirano umnažanje potrebno za poticanje razvoja imunog odgovora. Međutim, istraživanja provedena na modificiranom živom cjepivu koje se upotrebljavalo u Kini pokazala su da cjepivo nije sposobno potaknuti sterilan imunitet protiv raznolikih mogućih heterolognih virusa. Također, korištenje atenuiranih cjepiva je povezano s rizikom povratka virulencije virusa. U konačnici, zbog činjenice da navedena atenuirana cjepiva potiču humoralne odgovore koji se ne razlikuju od onih izazvanih prirodnim infekcijama, njihova upotreba nije u skladu s trenutnom kontrolom IAK temeljenom na serološkim testiranjima (COOK i sur., 2013.).

3. MATERIJALI I METODE

Podaci korišteni u ovom radu dobiveni su iz Laboratorija za infektivnu anemiju kopitara Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Ovaj laboratorij, akreditiranom prema normi HRN EN ISO 17025, referentni je laboratorij za dijagnostiku IAK u Republici Hrvatskoj, a pretraga dostavljenih uzoraka seruma kopitara izvodi se gel-difuzijskim precipitinskim testom.

Uzorkovanje krvi, odnosno seruma kopitara u svakom epizootičkom području obavljali su ovlaštene veterinarke. Nakon uzimanja krvi kopitara, krv je pohranjena u sterilne epruvete bez antikoagulansa uz poštovanje načela asepsa. Uzorci su u laboratorij dostavljani poštom ili putem kurira s popratnim dopisom, koji sadrži detaljne podatke o životinji i vlasniku životinje.

Gel-difuzijski precipitinski test (Cogginsov test) temelji se na imunodifuziji kojom se detektira nazočnost precipitirajućih protutijela na virusni strukturni protein p26 (COGGINS i sur., 1972.). Sam test se izvodi na podlozi od agaroznog gela na kojoj se izbuše jažice. Jažice su raspoređene simetrično, njih šest, tako da čine krug, dok se sedma nalazi u sredini. Pri samom izvođenju testa u središnju jažicu se ukapava specifični antigen, koji sadrži strukturni protein virusa IAK p26. U dvije nasuprotne okolne jažice ukapavaju se poznati, sigurno pozitivni serumi, dok se u preostale četiri jažice ukapavaju pretraživani serumi. Nakon inkubacije od 48 sati pri sobnoj temperaturi, pozitivna reakcija pretraživanih seruma očituje se stvaranjem precipitacijske linije između jažice u kojoj se nalazio odgovarajući pretraživani serum i središnje jažice u kojoj se nalazio antigen. Kod slabo pozitivnih seruma dokaz prisutnosti specifičnih protutijela na virus IAK očituje se kao savijanje jednog kraja linije precipitacije, i to između jažica u kojima su ukapani poznati pozitivni serum i antigen na strani jažice gdje se nalazio slabo pozitivni serum.

4.REZULTATI

U sklopu provedbe mjera propisanih Naredbom, u razdoblju od početka 2010. do kraja 2018. godine na IAK je ukupno pretraženo 157.407 krvnih seruma kopitara podrijetlom iz 21 županije u Republici Hrvatskoj. U navedenom razdoblju županije s najvećim brojem pretraženih uzoraka bile su: Sisačko-moslavačka 38.413 (24,4%), Zagrebačka 18.310 (11,6%) i Osječko-baranjska županija 11.107 (7,1%). Tijekom 2010. godine serološki je pretraženo 17.096 uzoraka, a pozitivne reakcije utvrđene su u 22 uzorka (0,13%). Najviša prevalencija zabilježena je u Ličko-senjskoj (1,02%) i Primorsko-goranskoj županiji (0,64%). U 2011. godini pretraženo je 16.738 krvnih seruma od kojih je pozitivnih bilo 8 (0,05%). Najviše pozitivnih uzoraka utvrđeno je u Ličko-senjskoj županiji 4 (0,81%). Tijekom 2012. godine pretraženo je 17.595 uzoraka od kojih je pozitivnih bilo 5 (0,03%). U Ličko-senjskoj županiji utvrđena su 3 (0,61%), a u Primorsko-goranskoj 2 pozitivna uzorka (0,25%). Tijekom 2013. godine pretraženo je 19.655 uzoraka, a pozitivne reakcije utvrđene su u 4 uzorka (0,02%). U Karlovačkoj županiji ustanovljena su 2 pozitivna uzorka (0,4%), 1 je ustanovljen u Sisačko-moslavačkoj (0,02%) i 1 u Zagrebačkoj županiji (0,04%). U 2014. godini pretražena su 16.409 seruma, a serološki pozitivnih je bilo 9 (0,05%). Najviša prevalencija zabilježena je u Požeško-slavonskoj županiji gdje je ustanovljeno 8 pozitivnih uzoraka (2,33%), a 1 pozitivan uzorak ustanovljen je u Sisačko-moslavačkoj županiji (0,02%). Tijekom 2015. godine pretražena su 15.949 seruma, a pozitivan je bio samo 1 uzorak (0,01%). Navedeni pozitivan serum bio je podrijetlom iz Vukovarsko-srijemske županije (0,16%). U 2016. godini od 19.681 ukupno pretraženih uzoraka niti jedan nije pokazao pozitivnu reakciju. Tijekom 2017. godine pretraženo je 16.921 uzoraka, a pozitivne reakcije utvrđene su u 2 uzorka (0,01%). Navedeni uzorci bili su podrijetlom iz Primorsko-goranske županije gdje je prevalencija iznosila 0,28%. Tijekom 2018. godine pretražena su 17.363 seruma od kojih su 3 bila pozitivna (0,02%). U Ličko-senjskoj županiji su ustanovljene 2 pozitivne reakcije (0,21%), a u Primorsko-goranskoj županiji 1 (0,14%).

Iz navedenog proizlazi da je seroprevalencija IAK u razdoblju od 2010. do 2018. godine u RH bila u rasponu od 0 do 0,13%. U tom periodu sveukupno su ustanovljena 54 pozitivna seruma (Tablica 4.).

S obzirom na godinu pretraživanja, seroprevalencija je bila najviša 2010. godine (0,13%), dok 2016. godine niti jedan uzorak seruma nije bio pozitivan (Grafikon 1.). Uspoređujući 10 županija s ustanovljenim serološki pozitivnim životinjama, najveći broj

ustanovljen je u Ličko-senjskoj (14), Primorsko-goranskoj (13) i Požeško-slavonskoj županiji (10).

Serološki pozitivne životinje nisu ustanovljene u Brodsko-posavskoj, Dubrovačko-neretvanskoj, Istarskoj, Koprivničko-križevačkoj, Krapinsko-zagorskoj, Međimurskoj, Osječko-baranjskoj, Varaždinskoj, Virovitičko-podravskoj i Zadarskoj županiji te Gradu Zagrebu.



Slika 5. Distribucija serološki pozitivnih kopitara na IAK u RH u razdoblju od 2010. do 2018. godine.

Tablica 1. Prikaz broja pretraženih, broja pozitivnih i postotka pozitivnih kopitara na IAK u pojedinim županijama prema godini pretraživanja (2010., 2011., 2012.).

Županija	2010.			2011.			2012.		
	ukupno	poz	%	ukupno	poz	%	ukupno	poz	%
Bjelovarsko-bilogorska	993	1	0,1	981	0	0	997	0	0
Brodsko-posavska	873	0	0	1.008	0	0	1.028	0	0
Dubrovačko-neretvanska	52	0	0	1	0	0	88	0	0
Grad Zagreb	590	0	0	472	0	0	573	0	0
Istarska	907	0	0	1.045	0	0	988	0	0
Karlovačka	567	1	0,18	372	1	0,26	495	0	0
Koprivničko-križevačka	562	0	0	603	0	0	597	0	0
Krapinsko-zagorska	534	0	0	637	0	0	876	0	0
Ličko-senjska	470	5	1,02	491	4	0,81	491	3	0,61
Međimurska	272	0	0	265	0	0	254	0	0
Osječko-baranjska	1.131	0	0	1.182	0	0	1.164	0	0
Požeško-slavonska	376	1	0,26	432	1	0,23	419	0	0
Primorsko-goranska	1.093	7	0,64	920	1	0,11	786	2	0,25
Sisačko-moslavačka	4.210	6	0,14	4.151	0	0	4.441	0	0
Splitsko-dalmatinska	462	0	0	317	1	0,31	393	0	0
Šibensko-kninska	273	1	0,36	241	0	0	301	0	0
Varaždinska	381	0	0	334	0	0	321	0	0
Virovitičko-podravska	471	0	0	442	0	0	446	0	0
Vukovarsko-srijemska	697	0	0	725	0	0	672	0	0
Zadarska	183	0	0	64	0	0	210	0	0
Zagrebačka	1.999	0	0	2.055	0	0	2.055	0	0
Ukupno	17.096	22	0,13	16.738	8	0,05	17.595	5	0,03

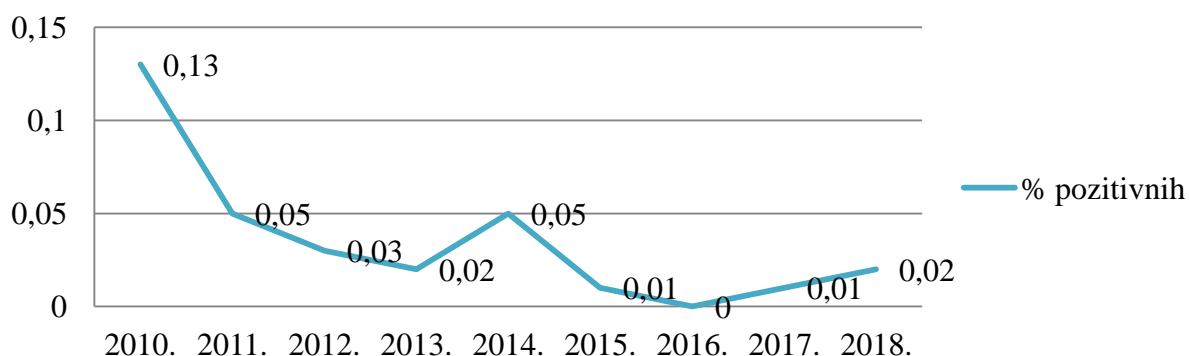
Tablica 2. Prikaz broja pretraženih, broja pozitivnih i postotka pozitivnih kopitara na IAK u pojedinim županijama prema godini pretraživanja (2013., 2014., 2015.).

Županija	2013.			2014.			2015.		
	ukupno	poz	%	ukupno	poz	%	ukupno	poz	%
Bjelovarsko-bilogorska	1.160	0	0	861	0	0	907	0	0
Brodsko-posavska	1.204	0	0	1.050	0	0	1.128	0	0
Dubrovačko-neretvanska	50	0	0	42	0	0	62	0	0
Grad Zagreb	677	0	0	484	0	0	505	0	0
Istarska	1.144	0	0	1.112	0	0	1.098	0	0
Karlovačka	558	2	0,4	398	0	0	430	0	0
Koprivničko-križevačka	754	0	0	685	0	0	664	0	0
Krapinsko-zagorska	728	0	0	601	0	0	511	0	0
Ličko-senjska	494	0	0	335	0	0	347	0	0
Međimurska	342	0	0	313	0	0	322	0	0
Osječko-baranjska	1.441	0	0	1.194	0	0	1.258	0	0
Požeško-slavonska	450	0	0	343	8	2,33	401	0	0
Primorsko-goranska	1.082	0	0	898	0	0	751	0	0
Sisačko-moslavačka	4.816	1	0,02	3.979	1	0,02	3.659	0	0
Splitsko-dalmatinska	327	0	0	213	0	0	271	0	0
Šibensko-kninska	310	0	0	186	0	0	187	0	0
Varaždinska	362	0	0	468	0	0	451	0	0
Virovitičko-podravska	558	0	0	471	0	0	402	0	0
Vukovarsko-srijemska	651	0	0	721	0	0	618	1	0,16
Zadarska	146	0	0	143	0	0	131	0	0
Zagrebačka	2.401	1	0,04	1.918	0	0	1.846	0	0
Ukupno	19.655	4	0,02	16.409	9	0,05	15.949	1	0,01

Tablica 3. Prikaz broja pretraženih, broja pozitivnih i postotka pozitivnih kopitara na IAK u pojedinim županijama prema godini pretraživanja (2016., 2017., 2018.).

Županija	2016.			2017.			2018.		
	ukupno	poz	%	ukupno	poz	%	ukupno	poz	%
Bjelovarsko-bilogorska	1.002	0	0	999	0	0	1.009	0	0
Brodsko-posavska	1.369	0	0	1.025	0	0	1.148	0	0
Dubrovačko-neretvanska	66	0	0	85	0	0	78	0	0
Grad Zagreb	602	0	0	458	0	0	492	0	0
Istarska	1.203	0	0	1.318	0	0	1.333	0	0
Karlovačka	498	0	0	532	0	0	530	0	0
Koprivničko-križevačka	774	0	0	642	0	0	653	0	0
Krapinsko-zagorska	698	0	0	734	0	0	557	0	0
Ličko-senjska	287	0	0	342	0	0	934	2	0,21
Međimurska	316	0	0	232	0	0	280	0	0
Osječko-baranjska	1.628	0	0	996	0	0	1.113	0	0
Požeško-slavonska	468	0	0	460	0	0	409	0	0
Primorsko-goranska	1.064	0	0	699	2	0,28	701	1	0,14
Sisačko-moslavačka	4.838	0	0	4.140	0	0	4.185	0	0
Splitsko-dalmatinska	444	0	0	489	0	0	340	0	0
Šibensko-kninska	286	0	0	333	0	0	389	0	0
Varaždinska	339	0	0	432	0	0	365	0	0
Virovitičko-podravska	508	0	0	279	0	0	283	0	0
Vukovarsko-srijemska	768	0	0	691	0	0	660	0	0
Zadarska	95	0	0	183	0	0	148	0	0
Zagrebačka	2.428	0	0	1.852	0	0	1.756	0	0
Ukupno	19.681	0	0	16.921	2	0,01	17.363	3	0,02

Grafikon 1. Seroprevalencija infekcije virusom IAK prema godini pretraživanja.



Tablica 4. Prikaz broja serološki pretraženih kopitara na IAK po županijama prema Naredbi od 2010. do 2018. godine i broja serološki pozitivnih kopitara.

Županija	Broj serološki pretraženih kopitara	Broj serološki pozitivnih kopitara	% pozitivnih
Bjelovarsko-bilogorska	8.909	1	0,01
Brodsko-posavska	9.833	0	0
Dubrovačko-neretvanska	524	0	0
Grad Zagreb	4.853	0	0
Istarska	10.148	0	0
Karlovačka	4.380	4	0,09
Koprivničko-križevačka	5.934	0	0
Krapinsko-zagorska	5.876	0	0
Ličko-senjska	4.191	14	0,33
Međimurska	2.596	0	0
Osječko-baranjska	11.107	0	0
Požeško-slavonska	3.758	10	0,27
Primorsko-goranska	7.994	13	0,16
Sisačko-moslavačka	38.413	8	0,02
Splitsko-dalmatinska	3.256	1	0,03
Šibensko-kninska	2.506	1	0,04
Varaždinska	3.453	0	0
Virovitičko-podravska	3.860	0	0
Vukovarsko-srijemska	6.203	1	0,02
Zadarska	1.303	0	0
Zagrebačka	18.310	1	0,01
Ukupno	157.407	54	0,03

5.RASPRAVA

Procjenjuje se da je infektivna anemija kopitara enzootski prisutna u više od 23% zemalja širom svijeta (BICOUT i sur., 2006.). U posljednjih nekoliko desetljeća bolest se smatrala enzootski prisutnom u Republici Hrvatskoj s povremenim izbijanjima (PETROVIĆ i sur., 1975., ŽUPANČIĆ i JUKIĆ, 1981., STAREŠINA, 2004.). Jedno od najvećih izbijanja bolesti je zabilježeno 2002. godine kada je veliki broj oboljelih konja uginuo (STAREŠINA, 2004.).

Određivanjem seroprevalencije IAK na području RH u razdoblju od 2010. do 2018. godine ustanovljena je seroprevalencija u rasponu od 0 do 0,13%. S obzirom na godinu pretraživanja, najviša seroprevalencija ustanovljena je 2010. godine (0,13%) dok je u narednim godinama bila značajno niža (0 do 0,05%). Usporedivši je s podacima do 2010. godine, seroprevalencija se značajno snizila, relativno je konstantna i ima trend pada. Tijekom 2016. godine od 19.681 ukupno pretraženih uzoraka niti jedan nije bio serološki pozitivan. Broj serološki pretraženih kopitara na godišnjoj razini kretao se od 15.949 do 19.681 što je u usporedbi s podacima do 2010. godine porast u broju pretraženih životinja. Broj serološki pozitivnih kopitara izuzev 2010. godine kada je iznosio 22, kretao se od 0 do 9. Usporedivši navedeno s podacima od 2005. do 2009. godine kada je na godišnjoj razini ustanovljeno od 26 do 89 serološki pozitivnih kopitara, rezultati upućuju na izrazito smanjenje broja pozitivnih životinja. Tijekom devetogodišnjeg perioda najveći broj serološki pozitivnih uzoraka ustanovljen je u Ličko-senjskoj (14), Primorsko-goranskoj (13) i Požeško-slavonskoj županiji (10). Podaci po županijama od prethodnih godina pokazuju da je tijekom 2007. godine najveći broj pozitivnih životinja ustanovljen u Bjelovarsko-bilogorskoj (12) i Ličko-senjskoj županiji (13), a tijekom 2008. i 2009. godine u Karlovačkoj županiji (2008. godine 10 pozitivnih, a 2009. godine 8 pozitivnih uzoraka) (arhivski podaci laboratorija za IAK). Središnja Hrvatska je zapravo područje gdje je do danas najviše izbijanja bolesti zabilježeno. Povoljni uvjeti za širenje bolesti postoje u poplavnim područjima rijeke Save kao i u močvarnim područjima središnje Hrvatske gdje obitava dio populacije konja (PETROVIĆ i sur., 1975., ŽUPANČIĆ i JUKIĆ, 1981., STAREŠINA, 2004.). Serološki pozitivne životinje u razdoblju od 2010. do 2018. godine nisu ustanovljene u Brodsko-posavskoj, Dubrovačko-neretvanskoj, Istarskoj, Kopriivničko-križevačkoj, Krapinsko-zagorskoj, Međimurskoj, Osječko-baranjskoj, Varaždinskoj, Virovitičko-podravskoj i Zadarskoj županiji te Gradu Zagrebu.

Uspoređujući seroprevalenciju u našoj zemlji s onom u susjednim zemljama, ondje je ona viša u odnosu na naše područje. Tako je 2010. godine u Bosni i Hercegovini od 438 pretraženih uzoraka krvnih seruma konja ustanovljeno 54 pozitivnih (12,33%) (VELIĆ i sur., 2011.).

Od 1972. godine, od kada se bolest redovito testira AGID testom u Hrvatskoj, prevalencija bolesti se značajno snizila (STEVANOVIĆ, 2015.). Prosječna seroprevalencija za razdoblje od 2010. do 2018. godine iznosila je 0,03% što su do danas najbolje postignuti rezultati kontrole bolesti. Provođenje mjera je rezultiralo kontinuiranim smanjivanjem seroprevalencije na području RH. Navedeni rezultati kontrole IAK primjer su doprinosa kontrole zaraznih bolesti razvoju i očuvanju konjogojstva. S obzirom da je IAK jedna od najznačajnijih zaraznih bolesti kopitara, te bolest koja može dovesti do iznimnih uzgojnih i gospodarskih gubitaka, neophodan je nastavak provođenja mjera kontrole bolesti kako bi se zadržala povoljna epizootiološka situacija na području RH.

6.ZAKLJUČCI

1. Infekciозна anemija kopitara je bolest s niskom seroprevalencijom na području Republike Hrvatske čije su godišnje vrijednosti seroprevalencije u razdoblju od 2010. do 2018. godine bile u rasponu od 0 do 0,13%.
2. Između županija je postojala značajna razlika u proširenosti tako da su područja s većom proširenošću bila Ličko-senjska, Požeško-slavonska i Primorsko-goranska županija, dok serološki pozitivne životinje u razdoblju od 2010. do 2018. godine nisu ustanovljene u Brodsko-posavskoj, Dubrovačko-neretvanskoj, Istarskoj, Koprivničko-križevačkoj, Krapinsko-zagorskoj, Međimurskoj, Osječko-baranjskoj, Varaždinskoj, Virovitičko-podravskoj i Zadarskoj županiji te Gradu Zagrebu.
3. Uzimajući u obzir devetogodišnji period vidljivo je da seroprevalencija ima trend pada i da je relativno konstantna.
4. U usporedbi s pojavnošću bolesti na području RH do 2010. godine, rezultati ukazuju na izrazito smanjenje broja serološki pozitivnih životinja.
5. Niska seroprevalencija i kontinuirano smanjenje broja pozitivnih kopitara u RH dokaz su učinkovitosti permanentnog nadzora nad IAK s ciljem smanjenja pojavnosti ove bolesti te je daljnje provođenje kontrole nužno za održavanje dobrih rezultata.

7. LITERATURA

- ALVAREZ, I., F. CIPOLINI, A. WIGDOROVITZ, K. TRONO, M. E. BARRANDEGUY (2015): The efficacy of ELISA commercial kits for the screening of equine infectious anemia virus infection. *Rev Argent Microbiol.* 47:25-28.
- ALVAREZ, I., G. GUTIERREZ, A. VISSANI, S. RODRIGUEZ, M. BARRANDEGUY, K. TRONO (2007): Standardization and validation of an agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia using a recombinant p26 antigen. *Vet. Microbiol.* 121:344-351.
- BANKS, K. L., J. B. HENSON (1972): Immunologically mediated glomerulitis of horses. II. Antiglomerular basement membrane antibody and other mechanisms in spontaneous disease. *Lab Invest* 26:708-715.
- BANKS, K. L., J. B. HENSON, T. C. MCGUIRE (1972): Immunologically mediated glomerulitis of horses. I. Pathogenesis in persistent infection by equine infectious anemia virus. *Laboratory Investigation* 26:701-707.
- BICOUT, D. J., R. CARVALHO, K. CHALVET-MONFRAY, P. SABATIER (2006): Distribution of equine infectious anemia in horses in the north of Minas Gerais State. Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 479-482.
- BOLDBAATAR, B., T. BAZARTSEREN, R. KOKBA, H. MURAKAMI, K. OGUMA, K. MURAKAMI, H. SENTSUJI (2013): Amplification of complete gag gene sequences from geographically distinct equine infectious anemia virus isolates. *J Virol Meth.* 189:41-46.
- BOLFA, P. F., C. LEROUX, A. PINTEA, S. ANDREI, C. CATOI, M. TAULESCU, F. A. TABARAN, M. SPINU (2012): Oxidant-antioxidant imbalance in horses infected with equine infectious anaemia virus. *Vet J* 192:449-454.
- BOLFA, P., M. NOLF, J. C. CADORE, C. CATOI, F. ARCHER, C. DOLMAZON, J. F. MORNEIX, C. LEROUX (2013): Interstitial lung disease associated with equine infectious anemia virus infection in horses. *Vet Res* 44:113.
- BOSNIĆ, L. (1936): Zarazna anemija kopitara (Anaemia infectiosa equorum). *Vet. Arhiv* 6, 417-527.
- BRANGAN, P., D. C. BAILEY, J. F. LARKIN, T. MYERS, S. J. MORE (2008): Management of the national programme to eradicate equine infectious anemia from Ireland during 2006: a review. *Equine Vet J* 40:702.
- BRINDLEY, M. A., W. MAURY (2005): Endocytosis and a low-pH step are required for productive entry of equine infectious anemia virus. *J Virol* 79:14482-14488.
- CAPPELLI, K., S. CAPOMACCIO, F. R. COOK, M. FELICETTI, M. L. MARENZONI, G. COPPOLA, A. VERINI-SUPLIZI, M. COLETTI, F. PASSAMONTI (2011): Molecular

detection, epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of equine infectious anemia virus. *J. Clin. Microbiol.* 49, 27-33.

CHEEVERS, W. P., T. C. MCGUIRE (1985): Equine infectious anemia virus: immunopathogenesis and persistence. *Rev. Infect. Dis.* 7, 83-88.

CHUNG, C., R. H. MEALEY, T. C. MCGUIRE (2005): Evaluation of high functional avidity CTL to Gag epitope clusters in EIAV carrier horses. *Virology* 342(2):228-239.

CLABOUGH, D. L., D. GEBHARD, M. T. FLAHERTY, L. E. WHETTER, S. T. PERRY, L. COGGINS, F. J. FULLER (1991): Immune-mediated thrombocytopenia in horses infected with equine infectious anemia virus. *J Virol* 65:6242-6251.

COGGINS, L., N. L. NORCROSS, S. R. NUSBAUM (1972): Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *Am. J. Vet. Res.* 33, 11-18.

CONSTABLE P. D., K. W. HINCHCLIFF, S. H. DONE, W. GRÜNBERG (2017): Equine infectious anemia. In: *A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats*. 11th ed. Elsevier, St. Louis, str. 795-799.

COOK, R. F., C. LEROUX, C. J. ISSEL (2013): Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. *Vet. Microbiol* 167:181-204.

COOK, R. F., C. J. ISSEL (2004): Equine infectious anemia. In: *Infectious diseases of livestock*. Vol 2. (J. A. W. Coetzer, R. C. Tustin, Eds.). Oxford University Press South Africa, Cape Town, pp 747-752.

COOK, R. F., S. J. COOK, F. L. LI, R. C. MONTELARO, C. J. ISSEL (2002): Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). *Journal of Virological Methods* 105:171-179.

COOK, R. F., S. J. COOK, S. L. BERGER, C. LEROUX, N. N. GHABRIAL, M. GANTZ, P. S. BOLIN, M. R. MOUSEL, R. C. MONTELARO, C. J. ISSEL (2003): Enhancement of equine infectious anemia virus virulence by identification and removal of suboptimal nucleotides. *Virology* 313: 588-603.

COOK, S. J., R. F. COOK, R. C. MONTELARO, C. J. ISSEL (2001): Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. *Vet Microbiol* 79:93-109.

CRAIGO, J. K., C. EZZELARAB, R. C. MONTELARO (2012): Development of a high throughput, semi-automated, infectious center cell-based ELISA for equine infectious anemia virus. *J Virol Meth.* 185:221-227.

CRAIGO, J. K., C. EZZELARAB, S. J. COOK, C. LIU, D. HOROHOV, C. J. ISSEL, R. C. MONTELARO (2015): Protective efficacy of centralized and polyvalent envelope immunogens in an attenuated equine lentivirus vaccine. *PLoS Pathog.* 11:e1004610.

CRAIGO, J. K., C. LEROUX, L. HOWE, J. D. STECKBECK, S. J. COOK, C. J. ISSEL, R. C. MONTELARO (2002): Transient immune suppression of inapparent carriers infected with a principal neutralizing domain-deficient equine infectious anaemia virus induces neutralizing antibodies and lowers steady-state virus replication. *Journal of General Virology* 83:1353-1359.

CRAIGO, J. K., R. C. MONTELARO (2010): EIAV envelope diversity: shaping viral persistence and encumbering vaccine efficacy. *Cur HIV Res.* 8:81-86.

CRAIGO, J. K., R. C. MONTELARO (2011): Equine infectious anemia virus infection and immunity: lessons for AIDS vaccine development. *Futur Virol* 6:139-142.

CRAIGO, J. K., R. C. MONTELARO (2013): Lessons in AIDS vaccine development learned from studies of equine infectious anemia virus infection and immunity. *Viruses* 5:2963-2976.

CULLINANE, A., M. QUINLIVAN, M. NELLY, H. PATTERSON, R. KENNA, M. GARVEY, S. GILDEA, P. LYONS, M. FLYNN, P. GALVIN, M. NEYLON, K. JANKOWSKA (2007): Diagnosis of equine infectious anaemia during the 2006 outbreak in Ireland. *Veterinary Record* 161:647-652.

DONG, J. B., W. ZHU, F. R. COOK (2013): Identification of a novel equine infectious anemia virus field strain isolated from feral horses in southern Japan. *J Gen Virol* 94:360-365.

DONG, J. B., W. ZHU, F. R. COOK, Y. GOTO, Y. HORII, T. HAGA (2012): Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. *Arch. Virol.* 157, 2105-2111.

DUFOUR, C., A. CORCIONE, J. SVAHN, R. HAUPT, V. POGGI, A. N. BEKA'SSY, R. SCIME, A. PISTORIO, V. PISTOIA (2003): TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. *Blood* 102:2053-2059.

FELLI, N., F. PEDINI, A. ZEUNER, E. PETRUCCI, U. TESTA, C. CONTICELLO, M. BIFFONI, A. DI CATALDO, J. A. WINKLES, C. PESCHLE, R. DE MARIA (2005): Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. *Journal of Immunology* 175:1464-1472.

HAMMOND, S. A., S. J. COOK, D. L. LICHTENSTEIN, C. J. ISSEL, R. C. MONTELARO (1997): Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process. *Journal of Virology* 71:3840-3852.

HARROLD, S. M., S. J. COOK, R. F. COOK, K. E. RUSHLOW, C. J. ISSEL, R. C. MONTELARO (2000): Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. *J Virol* 74:3112-3121.

- HAWKINS, J. A., W. V. ADAMS, B. H. WILSON, C. J. ISSEL, E. E. ROTH (1976): Transmission of equine infectious anemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. J Am Vet Med Assoc. 168:63-64.
- HAWKINS, J. A., W. V. ADAMS, L. COOK, B. H. WILSON, E. E. ROTH (1973): Role of horse fly (*Tabanus fuscicostatus* Hine) and stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.) in transmission of equine infectious anemia to ponies in Louisiana. Am J Vet Res 34:1583-1586
- HOWE, L., C. LEROUX, C. J. ISSEL, R. C. MONTEJARO (2002): Equine infectious anemia virus envelope evolution in vivo during persistent infection progressively increases resistance to in vitro serum antibody neutralization as a dominant phenotype. J Virol 76(21):10588-10597.
- ISSEL, C. J., K. RUSHLOW, L. D. FOIL, R. C. MONTEJARO (1988): A perspective on equine infectious anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis. Vet Microbiol 17:251-286.
- ISSEL, C. J., L. COGGINS (1979): Equine infectious anemia: current knowledge. J Am Vet Med Assoc 174:727-733.
- ISSEL, C. J., L. D. FOIL (1984): Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. J Am Vet Med Assoc 184:293-297.
- ISSEL, C. J., M. T. SCICLUNA, S. J. COOK, R. F. COOK, A. CAPRIOLI, I. RICCI, F. ROSONE, J. K. CRAIGO, R. C. MONTEJARO, G. L. AUTORINO (2013): Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. Vet Rec 172:210.
- ISSEL, C. J., W. V. ADAMS (1979): Serologic survey for equine infectious anemia virus in Louisiana. J Am Vet Med Assoc 174:286-288.
- ISSEL, C. J., W. V. Jr. ADAMS, L. MEEK, R. OCHOA (1982): Transmission of equine infectious anemia virus from horses without clinical signs of disease. J. Am. Vet. Med. Assoc. 180, 272-275.
- ISSEL, C. J., R. F. COOK, R. H. MEALEY, D. W. HOROHOV (2014): Equine infectious anemia in 2014: live with it or eradicate it? Vet Clin Equine. 30:561-577.
- ISSEL, C. J., W. V. ADAMS, L. D. FOIL (1985): Prospective study of progeny of inapparent equine carriers of equine infectious anemia virus. Am J Vet Res 46:1114-1116.
- JIN, S., B. ZHANG, O. A. WEISZ, R. C. MONTEJARO (2005): Receptor-Mediated Entry by Equine Infectious Anemia Virus Utilizes a pH-Dependent Endocytic Pathway. J Virol 79:14489-14497.
- KEMEN, M. J., L. COGGINS (1972): Equine infectious anemia: transmission from infected mares to foals. J Am Vet Med Assoc 161:496-499.

- KEMENY, L. J., L. O. MOTT, J. E. PEARSON (1971): Titration of equine infectious anemia virus. Effect of dosage on incubation time and clinical signs. *Cornell Vet* 61:687-695.
- KONNO, S., H. YAMAMOTO (1970): Pathology of equine infectious anemia. Proposed classification of pathological types of disease. *Cornell Vet* 60:393-449.
- KONO, Y., K. HIRASAWA, Y. FUKUNAGA, T. TANIGUCHI (1976): Recrudescence of equine infectious anemia by treatment with immunosuppressive drugs. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*16:8-15.
- KONO, Y., T. YOSHINO, Y. FUKUNAGA (1970): Growth characteristics of equine infectious anemia virus in horse leukocyte cultures. *Arch Gesamte Virusforsch* 30:252-256.
- KONO, Y. (1988): Antigenic variation of equine infectious anemia virus as detected by virus neutralization. *Archives of Virology* 98:91-97.
- KONO, Y., T. YOSHINO (1974): Propagation of equine infectious anemia virus in horse kidney cell cultures. *Natl Inst Anim Health Q Tokyo* 14:155-162.
- KUHAR, U., J. ZAVRŠNIK, I. TOPLAK, T. MALOVRH (2014): Detection and molecular characterisation of equine infectious anaemia virus from field outbreaks in Slovenia. *Equine Vet J.* 46:386-391.
- LEROUX, C., J. L. CADORE, R. C. MONTELARO (2004): Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet. Res.* 35, 485-512.
- LIGNÉE, M. (1843): Memoire et observations sur une maladie de sang, connue sous le nom d'anemie hydrohémie. Cachexie aqueuse du cheval. *Rec Med Vet* 20:30
- LIM, W. S., S. L. PAYNE, J. F. EDWARDS, I. KIM, J. M. BALL (2005): Differential effects of virulent and avirulent equine infectious anemia virus on macrophage cytokine expression. *Virology* 332:295-306.
- LIU, Q., X. F. WANG, J. MA, X. J. HE, X. J. WANG, J. H. ZHOU (2015): Characterization of equine infectious anemia virus integration in the horse genome. *Viruses* 7:3241-3260.
- MATHEKA, H. D., L. COGGINS, J. N. SHIVELY, N. L. NORCROSS (1976): Purification and characterization of equine infectious anemia virus. *Arch. Virol.* 51, 107-114.
- MCCLURE, J. J., W. A. LINDSAY, W. TAYLOR, R. OCHOA, C. J. ISSEL, S. J. COULTER (1982): Ataxia in four horses with equine infectious anemia. *J Am Vet Med Assoc* 180:279-283.
- MCCONNICO, R. S., C. J. ISSEL, S. J. COOK, R. F. COOK, C. FLOYD, H. BISSON (2000): Predictive methods to define infection with equine infectious anemia virus in foals out of reactor mares. *J Equine Vet* 20:387-392.

- MCGUIRE, T. C., D. G. FRASER, R. H. MEALEY (2002): Cytotoxic T lymphocytes and neutralizing antibody in the control of equine infectious anemia virus. *Viral Immunol* 15(4):521-531.
- MCGUIRE, T. C., K. I. O'ROURKE, L. E. PERRYMAN (1990): Immunopathogenesis of equine infectious anemia lentivirus disease. *Dev Biol Stand* 72:31-37.
- MCGUIRE, T. C., S. R. LEIB, S. M. LONNING, W. ZHANG, K. M. BYRNE, R. H. MEALEY (2000): Equine infectious anaemia virus proteins with epitopes most frequently recognized by cytotoxic T lymphocytes from infected horses. *Journal of General Virology* 81:2735-2739.
- MEALEY, R. H. (2014): Equine Infectious Anemia. In: *Equine infectious diseases*. 2nd ed. (D. C. Sellon, M. T. Long, Eds.). Saunders, Elsevier, St. Louis, str. 232-238.
- MEALEY, R. H., A. SHARIF, S. A. ELLIS, M. H. LITTKE, S. R. LEIB, T. C. MCGUIRE (2005): Early detection of dominant Env-specific and subdominant Gag-specific CD8+ lymphocytes in equine infectious anemia virus infected horses using major histocompatibility complex class I/peptide tetrameric complexes. *Virology* 339:110-126.
- MEALEY, R. H., B. ZHANG, S. R. LEIB, M. H. LITTKE, T. C. MCGUIRE (2003): Epitope specificity is critical for high and moderate avidity cytotoxic T lymphocytes associated with control of viral load and clinical disease in horses with equine infectious anemia virus. *Virology* 313:537-552.
- MEALEY, R. H., J. H. LEE, S. R. LEIB, M. H. LITTKE, T. C. MCGUIRE (2006): A single amino acid difference within the alpha-2 domain of two naturally occurring equine MHC class I molecules alters the recognition of Gag and Rev epitopes by equine infectious anemia virus-specific CTL. *J Immunol* 177(10):7377-7390.
- MEALEY, R. H., S. R. LEIB, S. L. POWNDER, T. C. MCGUIRE (2004): Adaptive immunity is the primary force driving selection of equine infectious anemia virus envelope SU variants during acute infection. *Journal of Virology* 78:9295-9305.
- MOLDAWER, L. L., M. A. MARANO, H. WEI, Y. FONG, M. L. SILEN, G. KUO, K. R. MANOGUE, H. VLASSARA, H. COHEN, A. CERAMI (1989): Cachectin/tumor necrosis factor-alpha alters red blood cell kinetics and induces anemia in vivo. *FASEB J* 3:1637-1643.
- MONTAGNIER, L., C. DAUGUET, C. AXLER (1984): A new type of retrovirus isolated from patients presenting with lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndrome: structural and antigenic relatedness with equine infectious anaemia virus. *Annales de l'Institut Pasteur/Virologic* 135:119-134.
- MONTELARO, R. C., B. PAREKH, A. ORREGO, C. J. ISSEL (1984): Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. *J Biol Chem* 259(16):10539-10544.

- MONTELARO, R. C., J. M. BALL, K. E. RUSHLOW (1993): Equine retroviruses. In: The retroviridae. Vol 2. (J. A. Levy, Ed.). Plenum Press, New York, pp 257-360.
- MORE, S. J., I. AZNAR, D. C. BAILEY, J. F. LARKIN, D. P. LEADON, P. LENIHAN, B. FLAHERTY, U. FOGARTY, P. BRANGAN (2008): An outbreak of equine infectious anemia in Ireland during 2006: investigation methodology, initial source of infection, diagnosis and clinical presentation, modes of transmission and spread in the Meath cluster. *Equine Vet J* 40:706-708.
- MORE, S. J., I. AZNAR, T. MYERS, D. P. LEADON, T. A. CLEGG (2008): An outbreak of equine infectious anaemia in Ireland during 2006: the modes of transmission and spread in the Kildare cluster. *Equine Veterinary Journal* 40: 709-711.
- NAGARAJAN, M. M., C. SIMARD (2007): Gag genetic heterogeneity of equine infectious anemia virus (EIAV) in naturally infected horses in Canada. *Virus Research* 129:228-235.
- OAKS, J. L., C. ULIBARRI, T. B. CRAWFORD (1999): Endothelial cell infection in vivo by equine infectious anaemia virus. *J Gen Virol* 80:2393-2397.
- OAKS, J. L., M. T. LONG, T. V. BASZLER (2004): Leukoencephalitis associated with selective viral replication in the brain of a pony with experimental chronic equine infectious anemia virus infection. *Vet Pathol* 41(5):527-532.
- OAKS, J. L., T. C. MCGUIRE, C. ULIBARRI, T. B. CRAWFORD (1998): Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. *J Virol* 72:7263-7269.
- OIE (2019): Equine infectious anaemia, chapter 3.5.6. OIE Terrestrial Manual 2019, pp 1-5.
- PETROVIĆ, D., Ž. ŽUPANČIĆ, B. JUKIĆ (1975): Incidence of equine infectious anemia in Yugoslavia, its determination by agar-gel diffusion test from May 1971 to May 1975, and results of its systematic control in same period. *Vet. Arhiv* 45, 103-115.
- PIZA, A. S. T., A. R. PEREIRA, M. T. TERRERAN, O. MOZZER, A. TANURI, P. E. BRANDAO, L. J. RICHTZENHAIN (2007): Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in *Escherichia Coli* as antigen. *Prev Vet Med* 78:239-245.
- QUINLIVAN, M., R. F. COOK, A. CULLINANE (2007): Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anaemia virus based on sequence determination of the gag gene. *Vet Rec* 160:611-618.
- QUINLIVAN, M., R. F. COOK, R. KENNA, J. J. CALLINAN, A. CULLINANE (2013): Genetic characterization by composite sequence analysis of a new pathogenic field strain of equine infectious anemia virus from the 2006 outbreak in Ireland. *J. Gen. Virol.* 94, 612-622.
- REIS, J. K., R. S. DINIZ, J. P. HADDAD, I. B. FERRAZ, A. F. CARVALHO, E. G. KROON, P. C. FERREIRA, R. C. LEITE (2012): Recombinant envelope protein (rgp90)

- ELISA for equine infectious anemia virus provides comparable results to the agar gel immunodiffusion. *J Virol Meth.* 180:62-67.
- RUBINEK, T., S. LOYA, M. SHAHARABANY, S. H. HUGHES, P. K. CLARK, A. HIZI (1994): The catalytic properties of the reverse transcriptase of the lentivirus equine infectious anemia virus. *Eur J Biochem.* 219:977-983.
- RWAMBO, P. M., C. J. ISSEL, W. V. ADAMS, K. A. HUSSAIN, M. MILLER, R. C. MONTELARO (1990): Equine infectious anemia virus (EIAV) humoral responses of recipient ponies and antigenic variation during persistent infection. *Arch Virol* 111(3-4):199-212.
- SELLON, D. C., F. J. FULLER, T. C. MCGUIRE (1994): The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. *Virus Res* 32:111-138.
- SENTSUI, H., Y. KONO (1981): Hemagglutination of several strains of equine infectious anemia virus. *Arch Virol* 67(1):75-84.
- SENTSUI, H., Y. KONO (1987): Complement-mediated hemolysis of horse erythrocytes treated with equine infectious anemia virus. *Arch Virol* 95:53-66.
- SENTSUI, H., Y. KONO (1987): Phagocytosis of horse erythrocytes treated with equine infectious anemia virus by cultivated horse leukocytes. *Arch Virol* 95:67-77.
- STEVANOVIĆ, V. (2015): Implementation and efficacy of a three-tiered strategy in diagnosis of equine infectious anemia in Croatia. PhD Thesis, University of Zagreb, Zagreb, Croatia.
- SPONSELLER, B. A., W. O. SPARKS, Y. WANNEMUEHLER, Y. LI, A. K. ANTONS, J. L. OAKS, S. CARPENTER (2007): Immune selection of equine infectious anemia virus env variants during the long-term inapparent stage of disease. *Virol.* 363:156-165.
- STAREŠINA, V.: Karakterizacija virusa infekcijske anemije kopitara izdvojenog iz krvi konja tijekom enzootije 2002. u Hrvatskoj. Disertacija. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska.
- TAGMYER, T. L., J. K. CRAIGO, S. J. COOK, D. L. EVEN, C. J. ISSEL, R. C. MONTELARO (2008): Envelope determinants of equine infectious anemia virus vaccine protection and the effects of sequence variation on immune recognition. *J Virol.* 82, 4052-4063.
- TASHJIAN, R. J. (1984): Transmission and clinical evaluation of an equine infectious anemia herd and their offspring over a 13-year period. *J Am Vet Med Assoc.* 184(3):282-288.
- TORNQUIST, S. J., T. B. CRAWFORD (1997): Suppression of megakaryocyte colony growth by plasma from foals infected with equine infectious anemia virus. *Blood* 90:2357-2363.
- TUMAS, D. B., M. T. HINES, L. E. PERRYMAN, W. C. DAVIS, T. C. MCGUIRE (1994): Corticosteroid immunosuppression and monoclonal antibody-mediated CD5+ T lymphocyte

depletion in normal and equine infectious anaemia virus-carrier horses. *J Gen Virol* 75:959-968.

VALLÉE, H., H. CARRÉ (1904): Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval. *Compt Rend Acad Sci* 139:331-333.

WEILAND, F., H. D. MATHEKA, L. COGGINS, D. HARTNER (1977): Electron microscopic studies on equine infectious anemia virus (EIAV). *Arch. Virol.* 55, 335-340.

VELIĆ, R., L. VELIĆ, B. DUKIĆ, H. BEŠIROVIĆ, A. ALIĆ, A. ZUKO, J. OMERAGIĆ, A. GUŠIĆ (2011): Equine infectious anemia in Bosnia and Herzegovina in year 2010. *Vet. stanica* 323-326.

WILLIAMS D. L., C. J. ISSEL, C. D. STEELMAN, W. V. ADAMS, C. V. BENTON (1981): Studies with equine infectious anemia virus: transmission attempts by mosquitoes and survival of virus on vector mouthparts and hypodermic needles, and in mosquito tissue culture. *Am J Vet Res* 42(9): 1469-1473.

ZAMAI, L., P. SECCHIERO, S. PIERPAOLI, A. BASSINI, S. PAPA, E. S. ALNEMRI, L. GUIDOTTI, M. VITALE, G. ZAULI (2000): TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood* 95, 3716-3724.

ZHANG, B., S. JIN, J. JIN, F. LI, R. C. MONTELARO (2005): A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (28), 9918-9923.

ŽUPANČIĆ, Ž., B. JUKIĆ (1981): Equine infectious anemia in Croatia and other parts of Yugoslavia from 1977 till 1979. *Vet. Stanica* 5, 41-61.

8.SAŽETAK

Seroprevalencija infektivne anemije kopitara u Republici Hrvatskoj

Infektivna anemija kopitara (IAK) je zarazna bolest kopitara uzrokovana lentivirusom. Poput ostalih retrovirusa, virus IAK uzrokuje perzistentnu doživotnu infekciju u inficiranih životinja. Zbog navedenog kao i zbog činjenice da se kontrola bolesti uglavnom svodi na identifikaciju i prisilno klanje ili usmrćivanje inficiranih kopitara, bolest je vrlo značajna. Nadzor se uglavnom temelji na dokazu protutijela serološkim metodama iako se sve češće koriste i metode dijagnostike temeljene na lančanoj reakciji polimerazom (PCR). Bolest se od 1971. godine u Republici Hrvatskoj redovito testira agar-gel imunodifuzijskim testom (AGID). Sukladno Naredbi o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju koju propisuje Ministarstvo poljoprivrede, od 2010. do kraja 2018. godine je na godišnjoj razini pretraživana cjelokupna populacija kopitara u RH. U navedenom razdoblju ukupno je pretraženo 157407 uzoraka krvnih seruma kopitara podrijetlom iz 21 županije u RH. Godišnje vrijednosti seroprevalencije u razdoblju od 2010. do 2018. godine bile su u rasponu od 0 do 0,13%. U usporedbi s dosadašnjim podacima, rezultati ukazuju na kontinuirano smanjenje broja serološki pozitivnih kopitara uz povremena odstupanja koja nisu značajna. Seroprevalencija je značajno varirala po županijama, a najviša je zabilježena u Ličko-senjskoj, Požeško-slavonskoj i Primorsko-goranskoj županiji. Provedenim pretraživanjem dokazana je niska seroprevalencija IAK na području RH i učinkovitost permanentnog nadzora s ciljem smanjenja broja pozitivnih životinja.

Ključne riječi: infektivna anemija kopitara, seroprevalencija, Republika Hrvatska

9.SUMMARY

Seroprevalence of equine infectious anaemia in Croatia

Equine infectious anaemia (EIA) is an infectious disease of equids which is caused by lentivirus. Like other retroviruses, equine infectious anaemia virus (EIAV) causes persistent lifelong infection in infected animals. Due to that and due to the fact that control of the disease is still universally based on identifying and then euthanasia or slaughter of infected equids, this disease is very significant. Control of EIA is mostly based on antibody detection by serologic methods, although PCR based methods are more and more often used in diagnostics. In Croatia this disease is regularly tested from 1971. by agar gel immunodiffusion (AGID). According to annual orders issued by the Ministry of Agriculture, from 2010. to the end of 2018. the entire population of equids in Croatia was annually searched for EIA. In the specified period, 157407 blood samples of equids were tested originating from 21 counties. Annual seroprevalence values in the period from 2010. to 2018. ranged from 0 to 0,13%. Compared to previous data, the results indicate a continuous decrease in the number of serologically positive equids with occasional deviations that are not significant. There was considerable variation of seroprevalence on county level and most cases were found in Lika-Senj, Požega-Slavonia and Primorje-Gorski Kotar. This study has shown a low seroprevalence of EIA in Croatia and effectiveness of permanent control with the aim of reducing the number of positive animals.

Key words: equine infectious anaemia, seroprevalence, Croatia

10.ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13. 05. 1995. godine u Heilbronn, Njemačka. Osnovnu i srednju školu sam pohađala u Malom Lošnju gdje sam završila Opću gimnaziju u Srednjoj školi Ambroza Haračića. Godine 2010. upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu kojeg sam uspješno završila kao redoviti student s prosjekom ocjena položenih ispita 4.44. Tijekom studija sudjelovala sam na raznim međunarodnim kongresima i seminarima. Stručnu praksu sam odradila u Veterinarskoj stanici Grada Zagreba. Osim njemačkog jezika koji mi je materinji, aktivno se služim i engleskim jezikom.