Molekularna dijagnostika i filogenetske osobitosti ENV gena virusa mačje imunodeficijencije u prirodno inficiranih mačaka u Republici Hrvatskoj

Kunić, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:248074

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Veterinarski fakultet

VALENTINA KUNIĆ

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA I FILOGENETSKE OSOBITOSTI *ENV* GENA VIRUSA MAČJE IMUNODEFICIJENCIJE U PRIRODNO INFICIRANIH MAČAKA U REPUBLICI HRVATSKOJ

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2018.

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom

Predstojnik: prof. dr. sc. Zoran Milas

Mentori: dr. sc. Matko Perharić
izv. prof. dr. sc. Zrinka Štritof

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina
2. Izv. prof. dr. sc. Zrinka Štritof
3. Doc. dr. sc. Suzana Hađina
4. Dr. sc. Matko Perharić

ZAHVALE

Posebno se zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Matku Perhariću, koji je svojim doprinosom, entuzijazmom i predanošću omogućio izradu ovog diplomskog rada, koja bez njegove pomoći i suradnje ne bi bila moguća.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Zrinki Štritof i dr. sc. Vesni Mojčec Perko na stručnim savjetima i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su me podržavali tijekom ovih šest godina studija i učinili ih zaista posebnima.

Najveća zahvala ide mom tati Željku Kuniću, koji je oduvijek moj najglasniji navijač i najveća podrška.

KRATICE:

AZT- zidovudin (engl. *Azidothymidine*)

CD- diferencijacijski (razlikovni) biljezi (engl. *Cluster of differentiation*)

CXCR- kemokini receptor (engl. *Chemokine receptor*)

DNK- deoksiribonukleinska kiselina

EDTA- etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

FAIDS- sindrom stečene imunodeficijencije mačaka (engl. *Feline acquired immunodeficiency sindrome*)

FeLV- virus zarazne leukemije mačaka (engl. *Feline Leukemia Virus*)

FIV-virus mačje imunodeficijencije (engl. *Feline Immunodeficiency Virus*)

gp120- virusni glikoprotein lipidne ovojnice

gp41- virusni glikoprotein lipidne ovojnice

gp40- virusni glikoprotein ovojnice

HIV- virus humane imunodeficijencije (engl. *Human Immunodeficiency Virus*)

IFN-α- humani rekombinantni interferon alfa

IFN-ω - mačji rekombinantni interferon omega

kbp- kilobazni par (označava tisuću parova komplementarnih nukleotida)

mA- miliamper

MVV- maedi-visna virus

mRNK- glasnička ribonukleinska kiselina

nm- nanometar

PCR- lančana reakcija polimerazom (engl. *Polimerase Chain Reaction*)

p17- virusni matriksni protein

p24- kapsidni protein virusa

RH- Republika Hrvatska

rHuEpo- rekombinantni humani eritropoetin

RNK- ribonukleinska kiselina

SAD- Sjedinjene Američke Države (engl. *United States of America*)

tzv- takozvani

UV- ultraljubičasto (engl. *ultraviolet*)

V- volt

POPIS PRILOGA:

Tablica 1. Taksonomska podjela unutar porodice Retroviridae. KING i sur., 2012.

Tablica 2. Rasprostranjenost pojedinih podtipova FIV-a u svijetu. SYKES, 2014.

Slika 1. Elektroforeza u agaroznom gelu.

Slika 2. Filogenetsko stablo virusa mačje imunodeficijencije dobiveno Maximum Likehood metodom (ML) temeljenoj na Tamura 3 parametar modelu s Gama distribucijom.

Slika 3. Izdvojeni prikaz B podtipa kojem pripada svih 14 nukleotidnih sljedova FIV provirusnog *env* gena dobivenih ovim istraživanjem kao i 29 FIV nukleotidnih sljedova povučenih iz genske banke

SADRŽAJ:

1. UVOD 1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA 3
2.1 POVIJEST 3
2.2 ZEMLJOPISNA PROŠIRENOST 4
2.3 ETIOLOGIJA 5
2.4 EPIZOOTIOLOGIJA 8
2.5 PATOGENEZA 9
2.6 KLINIČKA SLIKA 10
2.7 PATOLOŠKE PROMJENE 11
2.8 DIJAGNOSTIKA 12
2.9 LIJEČENJE 13
2.10 PROFILAKSA 14
2.11 JAVNO ZDRAVSTVO 15
3. MATERIJALI I METODE 16
4. REZULTATI 18
5. RASPRAVA 22
6. ZAKLJUČCI 24
7. POPIS LITERATURE: 25
8. SAŽETAK 33
9. SUMMARY 34
10. ŽIVOTOPIS 36

1. UVOD

Virus mačje imunodeficijencije (FIV) uzročnik je jedne od najznačajnijih zaraznih bolesti domaćih mačaka. Pored domaćih mačaka virus je patogen i za ostale pripadnike porodice Felidae, a infekcija je dokazana i unutar porodice Hyaenide (TROYER i sur., 2005.). Zajedno s infekcijom virusom zarazne leukemije mačaka predstavlja vodeći uzrok uginuća domaćih mačaka zarazne etiologije.

Virus je prvi puta izoliran 1986. godine iz T-limfocita mačaka sa sindromom stečene imunodeficijencije (PEDERSEN i sur., 1987.). Radi svojih biokemijskih i morfoloških značajki, FIV je klasificiran u porodicu Retroviridae te unutar roda *Lentivirus* (PEDERSEN i sur., 1987.; YAMAMOTO i sur., 1989.; TROYER i sur.; 2005.). Virusna čestica sadrži tri strukturna gena: *gag*, *pol* i *env* (CRAIGO i MONTELARO, 2010.). Na temelju filogenetskih razlika virus je podijeljen u šest osnovnih podtipova, od A do F (WEAVER, 2010.; SYKES, 2014.).

Infekcija FIV-om globalno je rasprostranjena zarazna bolest. Globalna proširenost zaraze procjenjuje se od 14 % pa sve do 44 %, ovisno o zemljopisnom području (HARTMANN, 1998.). Novije istraživanje na području Republike Hrvatske dokazuje infekciju FIV-om u 13.13% nasumično pretraženih slobodnoživućih mačaka u urbanom području, dok je taj broj 20,88% u vlasničkih mačaka s kliničkim znakovima bolesti (PERHARIĆ, 2018.).

Izvor infekcije jesu zaražene mačke, a dominantni put prijenosa bolesti je putem ugriza jer se virus u slini zaraženih mačaka nalazi u visokoj koncentraciji (SHELTON i sur., 1989.; LEVY i sur., 2006.). Klinička slika u zaraženih mačaka nespecifična je te dovodi do sindroma stečene imunodeficijencije kojim dominiraju oportunističke infekcije i razvoj malignih novotvorevina (HARTMANN, 2011.). Sličnu pojavu i tijek bolesti uočavamo kod ljudi inficiranih virusom humane imunodeficijencije (HIV).

Zbog nespecifične kliničke slike, objektivne metode dijagnostike FIV-a uključuju dokaz specifičnih protutijela ili dokaz uzročnika u pretraživanom kliničkom materijalu. U dijagnostici infekcije FIV-om najčešće se koriste komercijalno dostupni imunoenzimski testovi koji dokazuju specifična protutijela. Uvođenjem cjepiva protiv FIV-a te nemogućnošću većine imunoenzimskih testova da razlikuju cijepna protutijela od protutijela nastalih kao posljedica prirodne infekcije, molekularna metoda dijagnostike dobila je svoju praktičnu primjenu. Najčešće korištena molekularna metoda dijagnostike temelji se na lančanoj reakciji

polimerazom (PCR) kojom dokazujemo najmanje varijabilne regije *gag* i *env* strukturnih gena FIV-a (STEINRIGL i KLEIN, 2003.).

Etiološko izliječenje zaraženih jedinki do danas nije zabilježeno, stoga se liječenje zasniva na suzbijanju oportunističkih infekcija i podizanju opće otpornosti. Iako FIV dijeli mnoge sličnosti s HIV-om, patogen je isključivo za pripadnike porodica Felidae i Hyaenidae te do danas nije zabilježen slučaj zaražavanja ljudi (BUTERA i sur., 2000.).

Cilj ovog znanstvenog rada je na području Republike Hrvatske (RH) postaviti molekularnu dijagnostiku FIV-a dokazivanjem prisustva *env* gena provirusne DNK, te tako ujedno i potvrditi perzistentnu infekciju i doživotno kliconoštvo zaraženih mačaka. Nadalje, cilj ovoga znanstvenoga rada jest i filogenetska analiza FIV-a utvrđenog u mačaka s područja RH temeljena na provirusnom *env* genu. Filogenetskom analizom odsječka *env* gena virusa FIV-a utvrđenih na području RH i njihovom usporedbom s *env* genima pohranjenim u genskoj banci utvrdit ćemo pripadnost virusa mačje imunodeficijencije s područja RH određenom virusnom podtipu te time uvrstiti naše virusne sojeve na globalnu filogenetsku kartu.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1 POVIJEST

Porodica Retroviridae otkrivena je početkom 20. stoljeća, 1908. godine, kada su danski liječnik i veterinar dokazali virusnu etiologiju leukemije u kokoši (ELLERMANN i BANG, 1908.). Prvi opis bolesti uzrokovane pripadnikom porodice Retroviridae, roda *Lentivirus*, zabilježen je 1843. godine u Francuskoj, a odnosio se na infekcioznu anemiju kopitara (LIGNÉE, 1843.). Detaljniji opis bolesti objavljen je 1904.godine, uključivao je opis akutnog, subakutnog i kroničnog tijeka bolesti, no virusna etiologija i klasifikacija uzročnika dokazane su naknadno (VALLÉE i CARRÉ, 1904.).

Sredinom prošlog stoljeća započinje taksonomska klasifikacija virusa porodice Retroviridae i roda *Lentivirus* nakon otkrića maedi- visna virusa u ovaca (MVV) na Islandu, odnosno etiologije zarazne bolesti s neurološkim znakovima u ovaca. Zbog tipično sporog tijeka te bolesti i sporog razvoja kliničkih znakova, rod *Lentivirus* dobio je ime od latinske riječi *lenti* (hrv. sporo) (SIGURDSSON, 1954.; LIN i THORMAR, 1972.). Prva retrovirusna zarazna bolest domaćih životinja dijagnosticirana na području Republike Hrvatske bila je infekciozna anemija kopitara 1934. godine (BOSNIĆ, 1936.).

Virus mačje imunodeficijencije otkriven je među posljednjima od virusa porodice Retroviridae, roda *Lentivirus*. Izoliran je 1986. godine u SAD-u u Saveznoj državi Kaliforniji iz T-limfocita mačaka sa sindromom stečene imunodeficijencije (PEDERSEN i sur., 1987.). Taj izolat prozvan je Petaluma soj, po imenu grada u kojem je otkriven. Petaluma soj još od tada jedan je od najčešćih laboratorijskih sojeva korištenim u istraživanjima (WEAVER, 2010.). Dvije godine nakon prve izolacije, tj.1989. godine, virus je po prvi puta izoliran iz sline zaraženih mačaka (PEDERSEN i sur.,1989.). Od tada je virus izoliran u mnogih pripadnika porodice Felidae kao što su puma (Puma concolor), lav (Panthera leo), leopard (Panthera pardus), pallasova mačka (Otocolombus manul) i ris (Lynx rufus) (OLRNSTED i sur., 1992.; BROWN i sur, 1994.; CARPENTER i sur., 1996.; BARR i sur, 1997.; ROELKE i sur., 2009.; LAGANA i sur, 2013.). Infekcija FIV-om u populaciji hijena otkrivena je 2005. godine (TROYER i sur., 2005.). U Republici Hrvatskoj, infekcija FIV-om prvi je puta službeno potvrđena na klinikama Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu upotrebom seroloških pretraga (KUČER i sur., 2000.).

2.2 ZEMLJOPISNA PROŠIRENOST

Nakon otkrića FIV-a u SAD-u 1986. zanimanje za njega raste te je ubrzo infekcija unutar populacije domaćih mačaka dokazana diljem svijeta, na svim kontinentima osim Antarktike (HARTMANN, 1998.; SYKES, 2014.). Rasprostranjenost i prevalencija FIV-a ovisi o zemljopisnom području, gustoći prijemljive populacije i načinu držanja mačaka (LEVY i sur., 2006.; SELLON i HARTMANN, 2012.). Procjena globalne seroprevalencije infekcije FIV-om je 44% među populacijom bolesnih te varira od 1% do14% u populaciji klinički zdravih domaćih mačaka (HARTMANN, 1998.).

U Europi su podaci sljedeći: seroprevalencija FIV-a u Italiji varira između 24% i 30,90% u bolesnih mačaka (BANDECCHI i sur., 1992.; PENNISI i BO, 1994.), dok su u klinički zdravoj populaciji anti-FIV protutijela dokazana u 10,70% do 14,10% mačaka (PENNISI i BO, 1994.; MAGI i sur.,2002.). U Srbiji seroprevalencija FIV pozitivnih mačaka iznosi 27% (POTKONJAK i sur., 2014.), u Sloveniji 33,30% (TOZON i sur., 2008., u Engleskoj 10,40% (MUIRDEN, 2002.), a u Njemačkoj između 3,20% i 8,40% (FUCHS i sur., 1994.; GLEICH i sur.,2009.).

Posljednji podaci iz Hrvatske o infekciji FIV-om su 13,13% pozitivnih među slobodnoživućim nasumično pretraženim mačkama u urbanom području, dok je taj broj 20,88% u vlasničkih mačaka s očitovanjem kliničkih znakova. Isto istraživanje navodi značajno veći postotak infekcije u mužjaka (31,20%), nego u ženki (8%), u skupini vlasničkih mačaka, a unutar navedene skupine mužjaka, značajna je razlika u prevalenciji infekcije među kastriranim (18,75%) i nekastriranim mužjacima (35,48%) (PERHARIĆ i sur., 2018.).

2.3 ETIOLOGIJA

Zbog svojih biokemijskih i morfoloških značajki, FIV je klasificiran u porodicu Retroviridae te unutar roda *Lentivirus* (PEDERSEN i sur., 1987.; YAMAMOTO i sur., 1989.). Navedena porodica nije svrstana ni u jedan taksonomski red, a ime je dobila po enzimu reverzna transkriptaza koji je zajednički za sve viruse ove porodice. Podjela unutar porodice prikazana je u sljedećoj tablici:

PORODICA	PODPORODICA	
Retroviridae	**Orthoretrovirinae**	*Alpharetrovirus*
		Betaretrovirus
		Gammaretrovirus
		Deltaretrovirus
		Epsilonretrovirus
		Lentivirus
	Spumaretrovirinae	*Spumavirus*

Tablica 1. Taksonomska podjela unutar porodice Retroviridae. KING i sur., 2012.

Kao i kod ostalih retrovirusa, virusna čestica FIV-a je okrugla do elipsoidna oblika, promjera 100 do 125 nm te ima troslojnu strukturu, a čine ju fosfolipidna ovojnica (*envelope*) s glikoproteinima, proteinski matriks te ikozaedralna kapsida koja sadržava genom (nukleokapsida). Genom FIV-a čine dvije pozitivno orijentirane jednolančane ribonukleinske kiseline, ssRNA (+), u obliku dvije heliks zavojnice (BENDINELLI i sur., 1995; SYKES, 2014.). Virusna RNK sadržava 9,2 kilobaznih parova (kbp). Genom FIV-a sastoji se od tri strukturna gena, a to su *gag* (kodira protein nukleokapside/ p24/ i matriksni protein /p17/), *pol* (kodira enzime reverzna transkriptaza, proteaza i integraza) i *env* (kodira površinski gp120 i transmembranski gp41-glikoproteini ovojnice). Osim navedena 3 glavna, prisutni su još neki akcesorni i regulatorni geni (CRAIGO i MONTELARO, 2010., SYKES, 2014.).

FIV invadira stanice putem njihovog primarnog receptora CD134, koji je eksprimiran na mačjim T-limfocitima, B-limfocitima i aktiviranim makrofagima te sekundarnog receptora CXCR4 koji je u normalnim okolnostima kemokinski receptor (SYKES, 2014.). Primarno mjesto umnažanja FIV-a upravo su $CD4^+$ limfociti. Prva je faza virusnog umnožavanja

prepoznavanje ciljne stanice i vezanje virusne čestice na nju što je regulirano specifičnom međusobnom interakcijom između glikoproteina lipidne ovojnice virusa (gp120) i staničnih receptora na površini T-limfocita, navedenih CD134 i kemokinog receptora CXCR4. Nekim lentivirusima, poput virusa infekciozne anemije kopitara, dovoljan je primarni receptor kako bi se vezali, no drugima poput FIV-a i HIV-a potreban je i navedeni kemokinski receptor (CRAIGO i MONTELARO, 2010.). Slijede ulazak virusne čestice u citoplazmu stanica domaćina, otapanje lipidne ovojnice i proteinskog matriksa te oslobađanje virusne RNK u citoplazmu koju zatim enzim reverzna transkriptaza, svojstven porodici Retroviridae, prevodi u dvolančanu DNK. Novostvorena DNK transportira se u jezgru stanice domaćina gdje se integrira u genom domaćina te se tada naziva provirusna DNK. Slijedi transkripcija provirusne DNK u virusnu glasničku RNK (mRNK) u jezgri i njena evakuacija u citoplazmu te posljedična sinteza *gag* i *env* virusnih gena nužnih za formiranje nukleokapside i lipidne ovojnice s pripadajućim virusnim proteinima. Završna faza podrazumijeva sklapanje kompletne virusne čestice izlaskom iz stanice domaćina procesom pupanja (budding) (CRAIGO i MONTELARO, 2010., SYKES, 2014.).

Terenski izolati FIV-a podijeljeni su u nekoliko genetski različitih podtipova (A-F). Ta filogenetska raznolikost rezultat je velikog broja genetskih rekombinacija, osobito unutar hipervarijabilne regije *env* gena (STEINRIGL i KLEIN, 2003., SELLON i HARTMANN, 2012.). Glavnu prepreku u razvijanju djelotvorne vakcine protiv lentivirusa predstavlja upravo njihova velika podložnost mutacijama i heterogenost virusa te je zbog toga vrlo važno odrediti genetsku raznolikost lentivirusa u svakom području u kojem se planira vakcinacija protiv istih kako bi se vakcina prilagodila regionalno prevalentnim podtipovima (STEINRIGL i KLEIN, 2003.; SYKES, 2014.). Svojstva *env* gena također su i klinički relevantna jer određuju stanični tropizam prema virusu i utječu na patogenezu. Interakcija između glikoproteina koje kodira *env* gen i stanice domaćina je inicijalni kritični korak za infekciju, što ih čini potencijalnim metama za terapijske intervencije. Europske mačke inficirane su podtipovima A, B, C i D, s time da podtip A prevladava na području sjeverne Europe (Njemačka, Nizozemska), a podbtip B značajniji je u južnoj Europi, na primjer Italiji, gdje je prisutna i velika heterogenost unutar podtipa (PISTELLO i sur., 1997.; SELLON i HARTMANN, 2012.). Istraživanje Adolfa Steinrigla iz 2010.godine provedeno na 66 FIV pozitivnih mačaka pokazalo je da podtip A dominira u Njemačkoj, dok podtip B dominira u susjednoj Austriji. Uz to, austrijski sojevi podtipa B vrlo su divergirali od klasičnih sekvenci podtipa B, što indicira relativno dug period lokalne evolucije (STEINRIGL i sur., 2010.). Također, istraživanje na području RH iz 2016. godine provedeno na 29 uzoraka seruma FIV pozitivnih mačaka filogenetskom analizom

odsječka *gag* gena svrstalo je ih je u podtip B (PERHARIĆ i sur., 2016.). Rasprostranjenost pojedinih podtipova FIV-a u svijetu prikazana je u sljedećoj tablici:

A	Novi Zeland, Australija, zapadni SAD, južna Afrika, sjeverozapadna Europa, Japan, UK
B	Središnji i istočni SAD, Karibi, središnja i zapadna Europa, Brazil, istočni Japan
C	SAD, Kanada, Novi Zeland, jugoistočna Azija
D	Vijetnam, rijetko SAD
E	Argentina
F	SAD (područje Teksasa)

Tablica 2. Rasprostranjenost pojedinih podtipova FIV-a u svijetu. SYKES, 2014.

Otpornost uzročnika je slaba, retrovirusi preživljavaju samo nekoliko minuta izvan domaćina pa tako i FIV vrlo brzo gubi svoju patogenost i virulenciju te je inaktiviran uporbom standardnih dezinficijensa (klor, etanol, kvarterni amonijevi spojevi) i zagrijavanjem na 60 °C (SYKES, 2014.).

2.4 EPIZOOTIOLOGIJA

Virus mačje imunodeficijencije sposoban je inficirati domaće i divlje mačke te hijene, a rasprostranjen je po cijelom svijetu. Na infekciju su primljive mačke oba spola, svih pasmina i dobnih skupina, a inficirane životinje predstavljaju izvor infekcije. Gotovo sva istraživanja spominju prevalenciju koja je viša u muških mačaka, što se smatra rezultatom prijenosa virusa ugrizom, a mačci češće sudjeluju u borbama pa su i češće izloženi ugrizu (SELLON i HARTMANN, 2012.).

FIV se u slini nalazi u velikim koncentracijama i prijenos putem ugriza razmjenom zaražene krvi i sline najznačajniji je oblik prijenosa među mačkama. Do ugriza najčešće dolazi prilikom borbe i parenja, za vrijeme kojeg mužjak grize ženku za kožu vrata (PONTIER i sur., 2009.). Virus se može prenijeti i transplacentarno, prilikom partusa i laktogeno, no ovi načini prijenosa smatraju se rijetkima u prirodnim uvjetima (SYKES, 2014.). Jatrogeni prijenos infekcije također je dokazan uporabom kontaminiranih kirurških konaca i transfuzijom pune krvi (DRUCE i sur., 1997.). Virus je također dokazan u celularnim i acelularnim frakcijama ejakulata mačaka, no doprinos veneralne transmisije širenju virusa u prirodnim uvjetima je nepoznat i smatra se rijetkim. Eksperimentalnom laparoskopskom inokulacijom inficiranog sjemena u neizloženu mačku dokazano je da je takav prijenos moguć (JORDAN i sur., 1996.). Potvrđen je i sluznički put prijenosa infekcije u kontroliranim uvjetima (inokulacijom infektivnog materijala oralno, vaginalno i rektalno), ali u prirodnim uvjetima nema veće važnosti u epizootiologiji FIV-a (OBERT i HOOVER, 2002., SELLON i HARTMANN, 2012.).

Ponekad se javlja koinfekcija s virusom mačje leukemije (FeLV) te je infekcija jednim od ta dva retrovirusa rizični faktor za infekciju drugim. Neki od ostalih rizičnih faktora za infekciju FIV-om su muški spol, starija dob, miješana pasmina, mogućnost izlaska iz kuće/ stana, agresivnost i nekastrirane jedinke (GLEICH i sur., 2009.).

2.5 PATOGENEZA

FIV u mačaka može uzrokovati sindrom stečene imunodeficijencije, usporediv s infekcijom HIV-om u ljudi, uključujući povećan rizik za oportunističke infekcije, neurološke bolesti i neoplazije, dakle dominantan patološki učinak FIV-a jest progresivno ometanje i narušavanje normalnog funkcioniranja imunosnog sustava (HARTMANN, 2011.). Patogeneza infekcije FIV-om ovisi o mnogo faktora, a najčešće opisivani čimbenici koji utječu na razvoj, tijek i ishod bolesti su dob životinje u vrijeme infekcije (mlađe jedinke ranije razviju kliničke znakove), svojstvima soja virusa (neki sojevi su mnogo patogeniji od drugih, a neki specifično neurotropni), količina virusa, ulazna vrata infekcije, zdravstveno stanje domaćina (SELLON i HARTMANN, 2012.). Glavna meta FIV-a su CD4+ T-limfociti. Također, inficira i CD8+ T-limfocite, B-limfocite, makrofage, dendritične stanice, mikrogliju i astrocite (SYKES, 2014.). S ulaznih vrata infekcije, virus makrofagima i limfocitima bude diseminiran do limfnih organa (timus, slezena, limfni čvorovi) gdje se umnaža, a zatim se limfocitima i makrofagima širi po organizmu te je dokazan u koštanoj srži, mozgu, plućima, crijevima, bubrezima (BEEBE i sur., 1994.).

2.6 KLINIČKA SLIKA

Tijek bolesti dijeli se na tri faze: akutnu (primarnu), subkliničku i terminalnu, tj. FAIDS, no kod prirodnih infekcija pojedine faze mogu izostati. Akutna faza uglavnom ima blage kliničke znakove: vrućica, letargija, znakovi enteritisa, stomatitis, dermatitis, konjunktivitis, znakovi respiratornih bolesti i generalizirana limfadenopatija (GOTO i sur., 2000.; HARTMANN, 2011.). U drugoj, subkliničkoj/ asimptomatskoj, fazi bolesti broj CD4+ limfocita se popravlja, a količina virusa u plazmi izrazito je mala, no infekcija nije latentna jer se produkcija virusa nastavlja u vrlo malim količinama. Ova faza može potrajati godinama, čak doživotno (SYKES, 2014.). Čimbenici koji imaju utjecaj na trajanje asimptmatske faze uključuju patogenost virusa kojime je mačka inficirana (ovisi o podtipu FIV-a), izloženost sekundarnim patogenima i starost mačke u vrijeme infekcije (PEDERSEN i sur, 2001.). U zadnjoj simptomatskoj fazi bolesti, FAIDS-u, klinički znakovi odraz su oportunističkih infekcija, neoplazmi, mijelosupresije i neuroloških poremećaja. Unatoč izrazito nespecifičnoj kliničkoj slici, najučestaliji simptom koji se javlja u oko 50% zaraženih mačaka jest kronični ulcerozni proliferativni stomatitis koji se može javiti u bilo kojoj fazi infekcije. Također, mačke inficirane FIV-om imaju oko pet puta veće šanse da obole od limfoma ili leukemije od neinficiraih mačaka (HARTMANN, 2011.).

2.7 PATOLOŠKE PROMJENE

Brojne patološke promjene zabilježene su mačaka inficiranih FIV-om, a neki od njih su kaheksija, stomatitis (često limfoplazmocitni ulcerozni) s gingivitisom, upale gastrointestinalnog trakta i znakovi sekundarnih neoplazija i sekundarnih infekcija (SELLON i HARTMANN, 2012., SYKES, 2014.). Limfni čvorovi u akutnoj su fazi hiperplastični dok su terminalnoj fazi narušene strukture uz gubitak folikula i celularnu depleciju. Koštana srž može biti nepromijenjena ili je prisutna displazija s područjima granulocitne hiperplazije i limfoidnim agregatima (CVETNIĆ, 2005.; SYKES, 2014.). Mogu biti prisutne i lezije na bubrezima zbog hipergamaglobulinemije i posljedičnog odlaganja imunokompleksa u vidu intersticijskog nefritisa, membranoznog glomerulonefritisa i glomeruloskleroze (CVETNIĆ, 2005.; SELLON i HARTMANN, 2012.). Lezije na jetri uključuju kolangiohepatitis i centrolobularnu nekrozu, a na plućima alveolitis i intersticijsku limfocitnu pneumoniju (CVETNIĆ, 2005.). Ostale zabilježene promjene obuhvaćaju neurološke promjene (blagi limfoplazmacitni meningitis, difuzna glioza, perivaskularna limfocitna infiltracija te blaga neuronalna degeneracija i apoptoza) te miopatiju povezanu s FIV-om (CVETNIĆ, 2005.; SELLON i HARTMANN, 2012.; SYKES, 2014.). Važno je napomenuti da ni jedna navedena patološka promjena nije patognomonična i da na osnovi makroskopskih i histoloških promjena nije moguće postaviti objektivnu dijagnozu, odnosno potvrditi infekciju (SYKES, 2014.).

2.8 DIJAGNOSTIKA

Laboratorijski nalazi pretraga krvi i krvnog seruma često uključuju anemiju (uglavnom neregenerativnu), neutropeniju i limfopeniju (smanjen broj cirkulirajućih CD4+ limfocita), smanjen omjer CD4+ i CD8+ limfocita koji je najkonstantniji, ali ne i patognomoničan pokazatelj (LITSTER i sur., 2014.). Objektivna dijagnostika uključuje dokaz specifičnih protutijela ili dokaz uzročnika u pretraživanom kliničkom materijalu. Serološka dijagnostika najčešće podrazumijeva ELISA test kojim se u pretraživanom kliničkom materijalu dokazuju specifična protutijela. FIV se može izolirati iz limfocita iz periferne krvi na primarno mačjoj T-staničnoj kulturi, no ta metoda je tehnički zahtjevna, dugotrajna (2-3 tjedna) i skupa pa se rijetko koristi u rutinskoj dijagnostici (SYKES, 2014.) Molekularna metoda dijagnostike (PCR) dobiva na važnosti s uvođenjem vakcine protiv FIV-a, što je onemogućilo razlučivanje jesu li specifična protutijela inducirana vakcinacijom ili su nastala zbog infekcije (STEINRIGL i KLEIN, 2003.). No, ukoliko je vakcina adekvatno inaktivirana njena aplikacija ne smije rezultirati produkcijom provirusne DNK te stoga ne interferira s PCR testom. Western-blott metoda smatra se zlatnim standardom u dijagnostici FIV-a (HARTMANN i sur., 2007.). Već 14 dana nakon infekcije moguće je lančanom reakcijom polimeraze i kulturelno dokazati virus u plazmi i limfocitima, a viremija dostiže vrhunac između 8. i 12. tjedna nakon infekcije (MATTEUCCI i sur., 1993.; BEEBE i sur., 1994.). Protutijela protiv FIV-a postaju detektabila 2-4 tjedna postinokulacijski u eksperimentalno zaraženih mačaka, iako to može varirati ovisno o količini inokuliranog virusa. Preporuka je provesti objektivnu dijagnostiku u svake mačke, bez obzira pokazuje li kliničke znakove ili ne, jer pravovremena dijagnostika može produžiti život zaražene mačke i spriječiti daljnje širenje infekcije unutar populacije (LEVY i sur., 2008.).

2.9 LIJEČENJE

Kao i kod ostalih bolesti uzrokovanih pripadnicima roda Lentivirus, etiološko liječenje FIV-a nije provedivo (HARTMANN i sur., 1998.). Terapija mačaka zaraženih FIV-om uključuje primjenu antivirusnih lijekova, imunomodulatora te dobru potpornu skrb (SYKES, 2014.). Uz navedeno, FIV pozitivne mačke mogu doživjeti duboku starost uz dobru kondiciju (GLEICH i sur., 2009.).

Zidovudin (AZT) najistraživaniji je antivirusni lijek dostupan za primjenu u veterinarskoj medicini. On inhibira aktivnost enzima reverzne transkriptaze i analog je nukleozida čime sprječava infekciju novih stanica, no ne sprječava replikaciju virusa u već inficiranim stanicama (SELLON i HARTMANN, 2012.). No, AZT ima i neke nuspojave koje uključuju supresiju koštane srži što može dovesti do jake neregenerativne anemije te je tijekom prvog mjeseca terapije potrebno hematološke pretrage provoditi svaki tjedan, a u ostalim mjesecima terapije jednom mjesečno. Ukoliko vrijednosti hematokrita padnu ispod 20%, terapija se odmah prekida (SYKES, 2014.). Brojni drugi antivirusni lijekovi, kao što su stavudin, didanozin, lamivudin, abacavir, suramin, ribavirin i dr., dokazali su svoju učinkovitost u in vitro uvjetima, no oni ispitani na životinjama doveli su do učestalih i jakih nuspojava (HARTMANN i sur, 2015.).

Osim klasičnih antivirusnih lijekova rabe se i imunomodulatori/ imunostimulatori, odnosno antioksidansi i interferoni. Interferoni su glikoproteini stanica imunosnog sustava većine kralježnjaka, koji imaju imunomodulirajuće, a neki i antivirusno djelovanje (SELLON i HARTMANN, 2012.). U liječenju se koriste humani rekombinantni interferon (IFN-α) i mačji rekombinantni interferon (IFN-ω) (SYKES, 2014.).

Potporna i simptomatska terapija mačaka u terminalnoj fazi može uključivati tekućinsku terapiju, transfuziju, nutritivnu potporu te dentalnu profilaksu s ekstrakcijom zubi, otopinom za ispiranje usta na bazi klorheksidina i topikalnom primjenom laktoferina u usnoj šupljini. Liječenje stomatitisa uključuje antimikrobne lijekove djelotvorne i u anaerobnim uvjetima kao što su metronidazol i klindamicin. Ostale oportunističke infekcije također zahtjevaju antimikrobnu terapiju koja po potrebi treba biti prolongirana i ponavljana tijekom cijelog života. Topikalna primjena prednizona ili prednizolona i atropina potrebna je za mačke s anteriornim uveitisom. Sistemski se glukokortikoidi ne primjenjuju ukoliko nije apsolutno nužno. Za kontroliranje jake neregenerativne anemije koristi se rekombinantni humani eritropoetin (rHuEpo) (SELLON i HARTMANN, 2012., SYKES, 2014.).

2.10 PROFILAKSA

Mjere profilakse dijelimo na mjere opće profilakse i imunoprofilaksu. Opće profilaktičke mjere uključuju testiranje svih mačaka nepoznatog FIV statusa, izolaciju zaraženih jedinki te kastraciju. Također, sve mačke korištene kao donori krvi za transfuziju moraju biti testirane i imati poznati FIV status. Kako virus u vanjskoj okolini vrlo brzo gubi svoju patogenost i virulenciju, standardna dezinfekcija opreme i prostora u kojem je zaražena mačka boravila djelotvorna je mjera opće profilakse (SYKES, 2014.).

Imunoprofilaksa FIV-a otežana je zbog šest podtipova virusa među kojima je slaba unakrižna zaštita te zbog velike sklonosti lentivirusa prema mutacijama. Istraživanjem je dokazano da promjena od samo dvije aminokiseline unutar *env* proteina može rezultirati neadekvatnim i nedostatnim imunosnim odgovorom (SAMMAN i sur., 2010., BECZKOWSKI i sur, 2015.). Upravo je iz tog razloga vrlo važno prije provođenja vakcinacije na nekom području utvrditi predominantan podtip virusa na tom određenom teritoriju (STEINRIGL i KLEIN, 2003.). Eksperimentalna cjepiva koja sadrže jedan podtip virusa rezultirala su stvorenom imunošću samo protiv homolognih sojeva unutar istog podtipa virusa, bez zaštite od drugih podtipova. U SAD-u je 2002. godine na tržište pušteno prvo cjepivo protiv FIV-a (Fel-O-Vax®, Fort Dodge Animal Health), inaktivirana vakcina s adjuvansom, a sadrži podtip A (soj Pantaluma) i D (soj Shizuoka) i namjenjeno je imunizaciji mačića starijih od 8 tjedana (KUSUHARA i sur., 2005.). Iako dostupno cjepivo zaštićuje imunizirane mačke protiv pojedinih sojeva virusa i dalje zbog velike heterolognosti i sklonosti virusa mutacijama ne postoji univerzalno cjepivo protiv svih terenskih sojeva FIV-a. Zbog interferiranja s dijagnostičkim testiranjem, nepouzdane efikasnosti na terenskim sojevima i povećanog rizika od sarkoma povezanog s adjuvansnim vakcinama, cjepivo se preporuča koristiti samo na mačkama s visokim rizikom izloženosti FIV-u i isključivo na mačkama negativnog statusa. Zbog navedenog se identifikacija i izolacija zaraženih jedinki i dalje smatra najboljom profilaktičkom mjerom (SYKES, 2014.).

2.11 JAVNO ZDRAVSTVO

FIV je isključivo patogen za pripadnike porodica Felidae i Hyaenidae i do danas su nepoznati slučajevi zaražavanja ljudi, čak i onih koji imaju povećan rizik izloženosti virusu (BUTERA i sur., 2000.). Nikada nisu dokazana specifična protutijela u osoba koje je ugrizla FIV pozitivna mačka niti u osoba koje su si nehotice ubrizgale infektivni materijal koji je sadržavao FIV (YAMAMOTO i sur., 1989.; SELLON i HARTMANN, 2012.).

3. MATERIJALI I METODE

Materijal korišten za potrebe ovog istraživanja bila je puna krv domaćih mačaka. Ukupno 14 uzoraka pune krvi mačaka, koje su polučile pozitivne rezultate seroloških pretraga na infekciju virusom mačje imunodeficijencije, korišteno je u daljnim molekularnim analizama. Uzorci su prikupljeni na klinikama Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kod svih 14 mačaka provedena je klinička obrada koja je uključivala uzimanje anamnestičkih podataka od vlasnika, klinički pregled pacijenta te laboratorijske pretrage krvi. Na temelju kliničke obrade, u svih mačaka ustanovljeno je odstupanje od fiziološkog zdravstvenog stanja te je nakon pristanka vlasnika, uzorkovana puna krv za serološku dijagnostiku infekcije virusom mačje imunodeficijencije. Venepunkcija je obavljana aseptičnom metodom, sterilnom iglom i brizgalicom iz *v. jugularis* ili *v. cephalice antebrachi*. Volumen uzorkovane krvi iznosio je oko 2 mL. Odmah nakon venepunkcije puna krv je pohranjena u epruvetu s antikoagulansom EDTA. Serološka metoda dijagnostike provedena je neposredno nakon pohrane u epruvetu s antikoagulansom, dok je ostatak pune krvi pohranjen u zamrzivač na -30 °C do provedbe daljnjih istraživanja.

Serološka pretraga uzoraka pune krvi mačaka provodila se korištenjem komercijalno dostupnog imunoenzimskog testa (IDEXX SNAP Combo Plus test; IDEXX Laboratories, Westbrook, USA) prema uputama proizvođača. Korišteni test u uzorku pune krvi mačaka dokazuje specifična protutijela za glikoprotein gp 40 virusa mačje imunodeficijencije.

U svrhu molekularne dijagnostike FIV-a, odnosno utvrđivanja perzistentne infekcije dokazom prisustva *env* gena provirusne DNK u uzorku pune krvi, najprije je izdvojena sveukupna DNK iz uzoraka pune krvi mačaka. Za izdvajanje DNK korišten je komercijan komplet QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka).

Za daljnje potrebe ovog istraživanja korištena je molekularna metoda lančane reakcije polimerazom. PCR metodom omogućeno je umnažanje ciljnog dijela provirusnog genoma virusa mačje imunodeficijencije. Umnažano je 552 baznih parova provirusnog *env* gena. U svrhu umnažanja ciljnog dijela provirusne DNK korištene su početnice FIV-7316F (5′ - ATA CCA AAA TGT GGA TGG TG - 3′) i FIV-7868R (5′ - TGC AAG ACC AAT TTC CAG CA - 3′) (STEINRIGL i KLEIN, 2003.). PCR reakcija provedena je u reakcijskom volumenu od 30 µL, a sadržavala je 3 µL pufera za PCR reakciju (10x koncentriran), 0,9 µL $MgCl_2$ (50 mM), 0,6 µL dNTP smjese (10 mM), po 2 µL otopine uzvodne i nizvodne početnice (FIV-7316F, 10 µM i FIV-7868R, 10 µM), 0,25 µL enzima Platinum Taq polimeraze (5 U/µL), 20,25 µL vode

bez nukleaza, te po 1 µL DNK izdvojene iz pune krvi mačke. Početna denaturacija izvodila se pri 94 °C tijekom 3 minute, zatim su uslijedila 35 ciklusa ponavljanja koja su se sastojala od 30 sekundi pri 94 °C, 30 sekundi pri 53 °C i 1 minute pri 72 °C. Završno produljivanje lanca odvijalo se 7 minuta pri 72 °C. Nakon završetka PCR reakcije, epruvetice s dobivenim PCR proizvodima pohranjene su na temperaturu od 4 °C do izvedbe elektroforeze u gelu.

Uspješnost PCR reakcije, odnosno umnažanja dijela provirusne DNK, utvrđena je postupkom elektroforeze u agaroznom gelu. Elektroforeza se odvijala pri naponu od 100 V, jakosti struje 80 mA tijekom 30 minuta. Po završetku elektroforeze umnoženi PCR proizvodi provjereni su pod UV svjetlom, te je agarozni gel fotografiran pomoću kamere s filterima za UV svjetlost. Svih 14 dobivenih PCR proizvoda poslano je u servis za sekvenciranje Macrogen, Amsterdam, Nizozemska. Za utvrđivanje nukleotidnog slijeda korištene su početnice upotrebljene i kod izvođenja PCR reakcije.

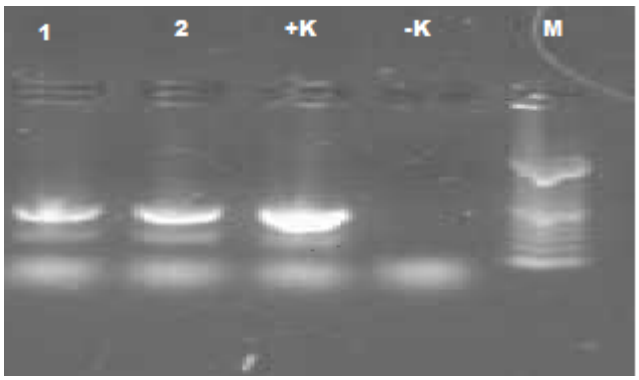
Računalna obrada dobivenih nukleotidnih sljedova napravljena je računalnim programima Chromas 2.6.2.0 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australia), Bio Edit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 (HALL, 1999.) i ClustalX 2.0 (LARKIN i sur. 2007.). Za potrebe filogenetske analize, nukleotidnim sljedovima dobivenim tijekom ovog istraživanja, dodani su nukleotidni sljedovi FIV *env* gena iz genske banke (NCBI- GenBank; www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Korišteni nukleotidni sljedovi FIV *env* gena iz genske banke bili su: AF531047 (ATVId02), AF531043 (DEBAb91), AF531037 (DEBAd58), AY196343 (DEBAd59), AY196340 (DENWd60), AY196338 (DEBAd65), AY196339 (DEFRd68), AF531038 (DENWd70), AF531034 (CHTGa05), AF531033 (CHSHa10), X60725 (FIV 113), M36968 (FIV PPR), L06135 (FIV Wo), D37813 (Sendai1), M25381 (Petaluma), AF531045 (ATVIa33), AF531040 (ATVIa85), AF531036 (ATVIa90), AF531032 (ATESb20), AF531046 (ATSTb30), AF531031 (ATVIb31), AF531042 (ATVIb97), AY196341 (ATSTc01), AY196336 (ATNOc07), AY196332 (ATNOd01), AY196331 (ATESd03), AY196335 (ATVId05), AY196334 (ATVId06), AY196342 (ATNOd16), AY196333 (ATVId20), AY196337 (ATVId23), AF531044 (DEBWa06), AF531039 (DEBEd72), AF531035 (ITROd76), AF531041 (ITROd78), X69501 (ItalyM2), X69502 (ItalyM3), M59418 (TM2), D37817 (Aomori2), D37814 (Sendai2), AJ304985 (PP2), AJ304988 (RP1), AF452126 (Maryland), U11820 (USIL2489 7B), AF474246 (BM3070), D37811 (Shizuoka), D37815 (Fukuoka).

Međusobna usporedba 14 nukleotidnih sljedova *env* gena provirusne DNK FIV-a dobivenih ovim istraživanjem, njihova usporedba s nukleotidnim sljedovima iz genske banke

i završna filogenetska analiza provodile su se pomoću računalnog programa Mega 7 7.0.21 (KUMAR i sur., 2016.).

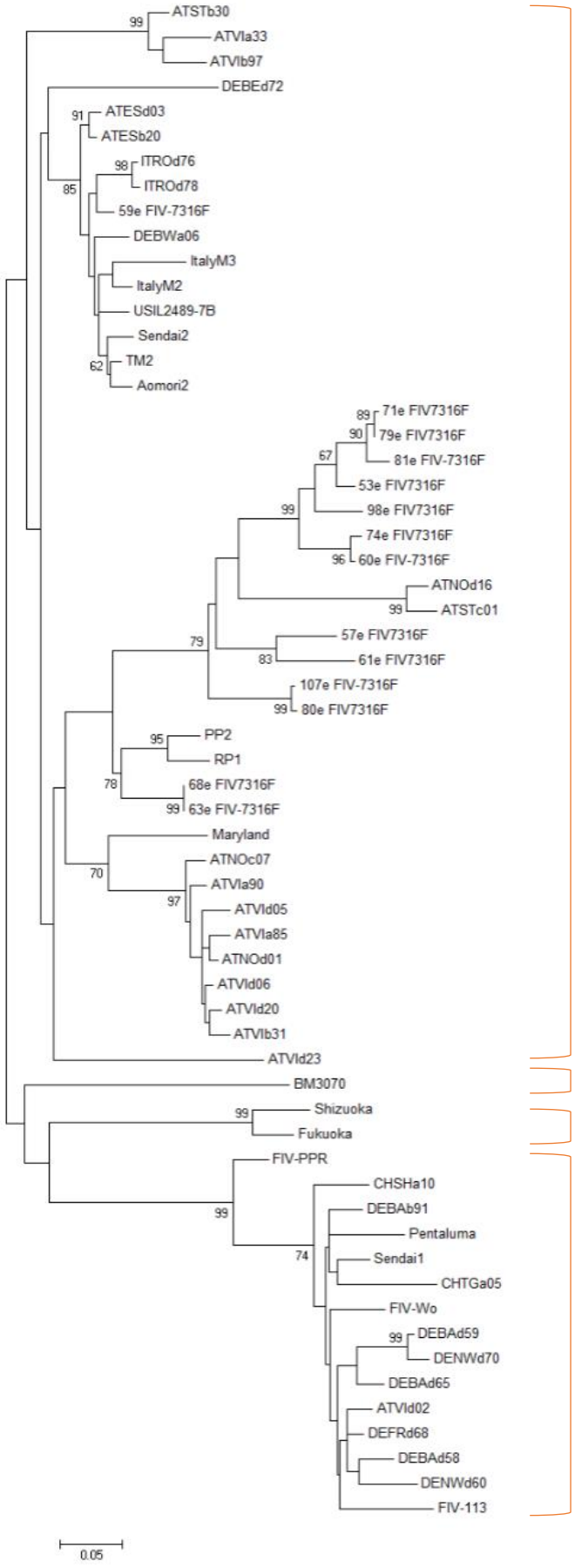
4. REZULTATI

Lančanom reakcijom polimeraze uspješno je umnožen ciljni dio *env* gena provirusne DNK virusa mačje imunodeficijencije čime je ujedno dokazana perzistentna infekcija virusom FIV-a u svih 14 pozitivnih uzoraka pune krvi mačaka (slika 1).



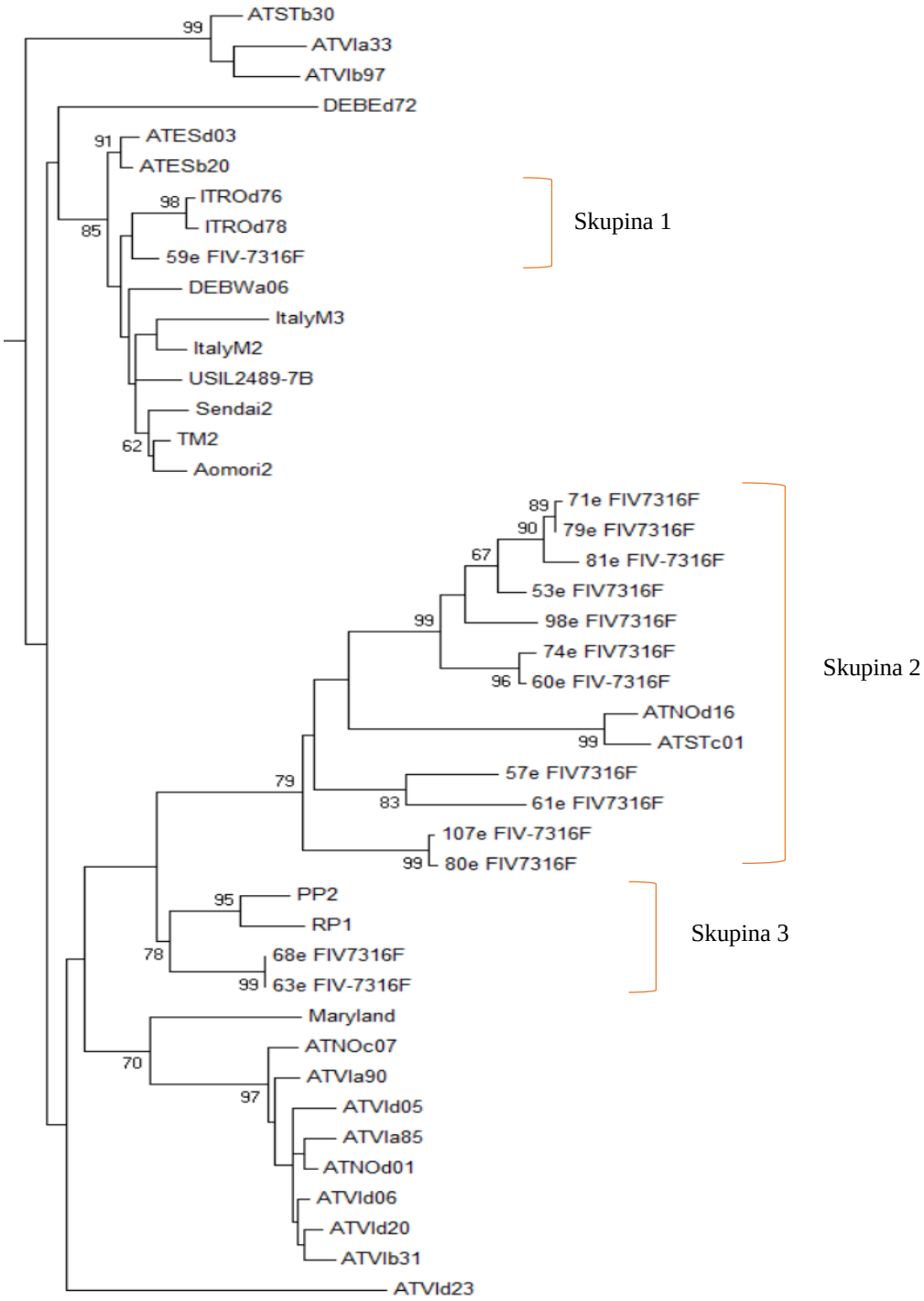
Slika 1. Elektroforeza u agaroznom gelu. Dokaz umnoženog odsječka provirusnog FIV *env* gena veličine 552 baznih parova. Uzorci 1 i 2.- pozitivni uzorci, +K- pozitivna kontrola, -K- negativna kontrola, M- molekulski biljeg, 100 bp.

Filogenetskom analizom 14 nukleotidnih sljedova provirusnog *env* gena virusa mačje imunodeficijencije izdvojenih iz prirodno inficiranih domaćih mačaka na području Republike Hrvatske i njihovom filogenetskom usporedbom s ukupno 47 nukleotidnih sljedova *env* gena dobivenih iz genske banke, dokazano je da izolati s područja Republike Hrvatske pripadaju B podtipu virusa mačje imunodeficijencije (slika 2).


ATSTb30
ATVIa33
ATVIb97
DEBEd72
ATESd03
ATESb20
ITROd76
ITROd78
59e FIV-7316F
DEBWa06
ItalyM3
ItalyM2
USIL2489-7B
Sendai2
TM2
Aomori2
71e FIV7316F
79e FIV7316F
81e FIV-7316F
53e FIV7316F
98e FIV7316F
74e FIV7316F
60e FIV-7316F
ATNOd16
ATSTc01
57e FIV7316F
61e FIV7316F
107e FIV-7316F
80e FIV7316F
PP2
RP1
68e FIV7316F
63e FIV-7316F
Maryland
ATNOc07
ATVIa90
ATVId05
ATVIa85
ATNOd01
ATVId06
ATVId20
ATVIb31
ATVId23
BM3070
Shizuoka
Fukuoka
FIV-PPR
CHSHa10
DEBAb91
Pentaluma
Sendai1
CHTGa05
FIV-Wo
DEBAd59
DENWd70
DEBAd65
ATVId02
DEFRd68
DEBAd58
DENWd60
FIV-113
0.05
Podtip B
Podtip C
Podtip D
Podtip A

Slika 2. Filogenetsko stablo virusa mačje imunodeficijencije dobiveno Maximum Likehood metodom (ML) temeljenoj na Tamura 3 parametar modelu s Gama distribucijom. Stablo je izrađeno na temelju 345 nukleotida od ukupno 61 nukleotidnog slijeda FIV *env* gena koji uključuju 14 nukleotidnih sljedova FIV virusa dokazanih na području RH tijekom ovog istraživanja i 47 FIV nukleotidnih sljedova dostupnih u genskoj banci. Boostrap vrijednosti dobivene s 1000 ponavljanja prikazane su pokraj pripadajućih čvorova (prikazane su vrijednosti > 60) te odgovaraju postotku dobivenih stabala kod kojih su FIV *env* sekvence grupirane kako je prikazano. Duljina grana odgovara broju supstitucija po nukleotidnom mjestu.

Unutar filogenetske skupine koja tvori tzv. B podtip, 14 nukleotidnih sljedova provirusnog *env* gena virusa dokazanih na području RH tijekom ovog istraživanja, tvore tri odvojene skupine (Slika 3).



Slika 3. Izdvojeni prikaz B podtipa kojem pripada svih 14 nukleotidnih sljedova FIV provirusnog *env* gena dobivenih ovim istraživanjem kao i 29 FIV nukleotidnih sljedova iz genske banke.

5. RASPRAVA

Infekcija virusom mačje imunodeficijencije (FIV) zajedno s infekcijom virusom zarazne leukemije mačaka (FeLV) predstavlja vodeći uzrok uginuća domaćih mačaka zarazne etiologije. Bolest je proširena u populaciji domaćih mačaka diljem svijeta. Prevalencija ovisi o zemljopisnom području, gustoći prijemljive populacije, te načinu držanja mačaka (CARPENTER i sur., 1996., SELLON i HARTMANN, 2012.).

Mjere opće profilakse infekcije virusom mačje imunodeficijencije još uvijek predstavljaju najučinkovitije mjere sprječavanja širenja bolesti među populacijom domaćih mačaka. Osnovna prepreka uvođenju i razvoju učinkovitog cjepiva protiv FIV-a jest velika genetska raznolikost pojedinih terenskih virusnih podtipova, te posljedično izostajanje adekvatnog imunosnog odgovora prema različitim virusnim podtipovima (SAMMAN i sur., 2010., SELLON i HARTMANN, 2012.). Iako danas na tržištu postoji cjepivo, zbog velike heterogenosti virusa i skolonosti virusa mutacijama, ono još uvijek ne zaštićuje cijepljene mačke protiv širokog spektra terenskih sojeva FIV-a. Upravo je poznavanje filogenetskih karakteristika terenskih sojeva virusa FIV-a s različitih zemljopisnih područja jedan od osnovnih preduvjeta razvoja učinkovitijeg cjepiva. Posljednji podaci iz Hrvatske o prevalenciji infekcije FIV-om su 13.13% pozitivnih među slobodnoživućim nasumično pretraženim mačkama u urbanom području, dok je taj broj 20,88% u vlasničkih mačaka s očitovanjem kliničkih znakova bolesti (PERHARIĆ i sur., 2018.). Istraživanje iz 2016. godine provedeno na 29 uzoraka seruma FIV pozitivnih mačaka filogenetskom analizom odsječka *gag* gena svrstalo je ih je u B podtip (PERHARIĆ i sur., 2016.). Iz navedenog razloga, svrha ovoga istraživanja bila je istražiti filogenetske osobitosti provirusnog *env* gena virusa mačje imunodeficijencije na području Republike Hrvatske.

Istraživanje je provedeno na 14 FIV serološki pozitivnih uzoraka pune krvi domaćih mačaka. Tijekom istraživanja uspostavljen je i prilagođen PCR protokol za dokaz provirusnog *env* gena FIV-a. Daljnjim filogenetskim analizama, odnosno usporedbom s dostupnim nukleotidnim sljedovima provirusnog *env* gena iz genske banke, utvrdili smo pripadnost naših terenskih sojeva virusnom podtipu B. Dobiveni rezultati u skladu su s ranije objavljenim studijama koje ističu da je dominantan virusni podtip na području Republike Hrvatske, južne i dijela srednje Europe upravo B podtip (STEINRIGL i sur., 2010., PERHARIĆ, 2016.). Nijedan nukleotidni slijed provirusnog *env* gena filogenetskim analizama nije pokazao pripadnost A

virusnom podtipu, iako je on dominantan u sjevernoj i dijelu srednje Europe (STEINRIGL i sur., 2010.; SAMMAN i sur., 2011.).

Unutar B podtipa, nukleotidni sljedovi dobiveni ovim istraživanjem tvore tri odvojene skupine. Izolat 59e FIV7326F pokazuje filogenetsku sličnost izolatima s područja Italije (ITROd78 i ITROd76) i čini prvu skupinu. Drugu skupinu čini 11 nukleotidnih sljedova dobivenih ovim istraživanjem (71e FIV7326F, 79e FIV7326F, 81e FIV7326F, 53e FIV7326F, 98e FIV7326F, 74e FIV7326F, 60e FIV7326F, 57e FIV7326F, 61e FIV7326F, 107e FIV7326F, 80e FIV7326F). Oni tvore zasebnu granu unutar B podskupine, te pokazuju usku filogenetsku srodnost s izolatima s područja Austrije (ATNOd16, ATSTc01). Posljednju treću skupinu čine dva nukleotidna slijeda dobivena ovim istraživanjem (68e FIV7326F, 63e FIV7326F) koja su najsrodnija s izolatima izdvojenim na području Portugala (PP2, RP1). Utvrđena regionalna filogenetska sličnost virusa mačje imunodeficijencije otvara mogućnost razvoja i uvođenja učinkovitog cjepiva, kao i izrade osjetljivijih i specifičnijih početnica za molekularnu dijagnostiku.

Svih 14 nukleotidnih sljedova *env* gena dobivenih ovim istraživanjem pripadaju B podtipu FIV-a, no ipak je među njima dokazana određena filogenetska heterogenost.

6. ZAKLJUČCI

1. Perzistentna infekcija mačaka virusom mačje imunodeficijencije prvi je puta, na području Republike Hrvatske, utvrđena dokazom prisustva dijela provirusnog *env* gena FIV-a.

2. Filogenetskom analizom umnoženih nukleotidnih sljedova provirusnog *env* gena, utvrđeno je da svi pretraženi uzorci na području Republike Hrvatske pripadaju virusnom podtipu B virusa mačje imunodeficijencije.

3. Analizom nukleotidnih sljedova dokazanih na području Republike Hrvatske uočava se međusobna heterogenost te srodnost s virusima podtipa B dokazanih na području Austrije, Portugala i Italije.

7. POPIS LITERATURE:

BANDECCHI, P., D. MATTEUCCI, F. BALDINOTTI, G. GUIDI, F. ABRAMO, F. TOZZINI, M. BENDINELLI (1992): Prevalence of feline immunodeficiency virus and other retroviral infections in sick cats in Italy. Vet. Immunol. Immunolpathol. 31, 337-345.

BARR, M. C., L.L. ZOU, F. LONG, W.A. HOOSE, R.J. AVERY (1997): Proviral organization and sequence analysis of feline immunodeficiency virus isolated from a pallas cat. Virology 228, 84-91.

BECZKOWSKI, P.M., M. HARRIS, N. TECHAKRIENGKRAI, J.A. BEATTY, B.J. WILLETT, M.J. HOSIE (2015): Neutralising antibody response in domestic cats immunised with a commercial feline immunodeficiency virus (FIV) vaccine. Vaccine. 33, 977-984.

BEEBE, A.M., N. DUA, T.G. FAITH, P.F. MOORE, N.C. PEDERSEN, S. DANDEKAR (1994): Primary stage of feline immunodeficiency virus infection: viral dissemination and cellular targets. J. Virol. 68, 3080-3091.

BENDINELLI, M., M. PISTELLO, S. LOMBARDI, A. POLI, C. GARZELLI, D. MATTEUCCI, L. CECCHERINI-NELLI, G. MALVALDI, F. TOZZINI (1995): Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and important cat pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 8, 87-112.

BOSNIĆ, L., (1936): Zarazna anemija kopitara (Anaemia infectiosa equorum). Vet. Arhiv. 6, 417-527.

BROWN E.W., N. YUHKI, C. PACKER, S. J. O'BRIEN (1994): A lion lentivirus related to feline immunodeficiency virus- epidemiologic and phylogenetic aspects. J. Virol 68, 5953- 5968

BUTERA, S.T., J. BROWN, M.E. CALLAHAN, S.M. OWEN, A.L. MATTHEWS, D.D. WEIGNER, L.E. CHAPMAN, P.A. SANDSTROM (2000): Survey of veterinary conference attendees for evidence of zoonotic infection by feline retroviruses. J. Am. Vet. Med. Assoc. 217, 1475-1479.

CARPENTER, M.A., E.W. BROWN, M. CULVER, W.E. JOHNSON, J. PECON-SLATTERY, D. BROUSSET, S.J. O′BRIEN (1996): Genetic and phylogenetic divergence of feline immunodeficiency virus in the puma (Puma concolor). J. Virol. 70, 6682-6693.

CRAIGO, J.K., R.C. MONTELARO (2010): Lentivirus tropism and disease. In: Lentiviruses and Macrophages. DESPOT, M., Caister Academic Press, Norfolk, UK. pp. 1-23.

CVETNIĆ, S. (2005): Virusne bolesti životinja. Školska knjiga, Zagreb

DRUCE, J.D., W.F. ROBINSON, S.A. LOCARNINI, M.T. KYAW-TANNER, S.F. SOMMERLAD, C.J. BIRCH (1997): Transmission of human and feline immunodeficiency viruses via reused suture material. J. Med. Virol. 53, 13-18.

ELLERMANN, V., O. BANG (1908): Experimentelle Leukämie bei Hühnern. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infectionskr. Hyg. Abt. Orig. 46, 595-609.

FUCHS, A., L. BINZEL, M. LONSDORFER (1994): Epidemiology of FeLV and FIV infection in the Federal Republic of Germany. Tierärztl. Praxis. 22, 271-277.

GLEICH, S. E., S. KRIEGER, K. HARTMANN (2009): Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. J. Feline Med. Surg. 11, 985-992.

GOTO, Y., Y. NISHIMURA, K. BABA, T. MIZUNO, Y. ENDO, K. MASUDA, K. ONHO, H. TSUJIMOTO (2000): Quantification of viral ribonucleic acid in plasma of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. Am. J. Vet. Res. 61, 1609- 1613.

HALL, T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT. Nucleic Acid Symposium Series. 41, 95-98.

HARTMANN, K. (1998): Feline immunodeficiency virus inection: an overview. Vet. J. 155, 123-137.

HARTMANN, K., P. GRIESSMAYR, B. SCHULZ, C.E. GREENE, A.N. VIDYASHANKAR, O. JARRETT, H.F. EGBERNIK (2007): Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. J. Feline Med. Surg. 9, 439- 445.

HARTMANN, K. (2011): Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 143, 190-201.

HARTMANN, K., A. WOODING, M. BERGMANN (2015): Efficacy of antiviral drugs against feline immunodeficiency virus. Vet. Sci, 2, 456-476.

KING, A.M.Q., M.J. ADAMS, E.B. CARSTENS, E.J. LEFKOWITZ (2012): Virus taxonomy. Ninth report of the International Committee on taxonomy of viruses. Elsevier Inc, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo.

KUČER, N., J. MADIĆ, LJ. BEDRICA (2000): Prevalence of antibodies of FIV and FeLV in Croatia. Praxis Vet. 3, 173-177.

KUMAR, S., G. STECHER, K. TAMURA (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33, 1870-1874.

KUSUHARA, H., T. HOHDATSU, M. OKUMURA, K. SATO, Y. SUZUKI, K. MOTOKAWA, T. GEMMA, R. WATANABE, C. HUANG, S. ARAI, H. KOYAMA (2005): Dual-subtype vaccine (Fel-o-Vax FIV) protects cats against contact challenge with heterologous subtype B FIV infected cats Vet. Microbiol. 108, 155-165.

JORDAN, H.L., J. HOWARD, R.K. SELLON, D.E. WILDT, W.A. TOMPKINS, S. KENNEDY- STOSKOPF (1996): Transmission of feline immunodeficiency virus in domestic cats via artificial insemination. J. Virol. 70, 8224-8228.

LAGANA, D.M., J.S. LEE, J.S. LEWIS, S.N. BEVINS, S. CARVER, L.L. SWEANOR, R. McBRIDE, C. McBRIDE, K.R. CROOKS, S. VANDEWOUDE (2013): Characterization of regionally associated Feline immunodeficiency virus (FIV) in Bobcats (*Lynx rufus*). J. Wildlife Dis 49, 718-722.

LARKIN, M.A., G. BLACKSHIELDS, N.P. BROWN, R. CHENNA, P.A. McGETTIGAN, H. McWILIAM, F. VALENTIN, I.M. WALLACE, A. WILIM, R. LOPEZ, J.D. THOMPSON, T.J. GIBSON, D.G. HIGGINS (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 23, 2947-2948.

LEVY, J.K., H.M. SCOTT, J.L. LACHTARA, P.C. CRAWFORD (2006): Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. J. Am. Vet. Med. Assoc. 228, 371–376.

LEVY, J.K., C. RAWFORD, 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.

LIGNÉE, M., (1843): Memoire et observationis sur ure maladie de sarg, connue sous le nom d'anhemie hydrohemie. Cachexie aqueuse du cheval. Recueil de Medicine Veterinaire. 20, 30.

LIN, F.H., H. THORMAR (1972): Properties of maedi nucleic acid and the presence of ribonucleic acid- and deoxyribonucleic acid- dependent deoxyribonucleic acid polymerase in the virons. J. Virol. 10, 228-233. Utility of CD4%: CD8% low T-lymphocyte ratio to differentiate feline immunodeficiency virus (FIV)- infected from FIV- vaccinated cats. Vet. Microbiol. 170, 197- 205.

LITSTER, A., J.M. LIN, J. NICHOLS, H.Y. WENG (2014): Diagnostic utility of CD4 %:CD8 low % T-lymphocyte ratio to differentiate feline immunodeficiency virus (FIV)-infected from FIV- vaccinated cats. Vet. Microbiol. 170, 197-205.

MAGI, M., M. C. PRATI, B. SEBASTIANI, P. BANDECCHI, V. GUBERTI (2002): Feline heartworm disease: a study on antibody seroprevalence in Tuscany. Vet. Rec. 150, 415-416.

MATTEUCCI, D., F. BALDINOTTI, P. MAZZETTI, M. PISTELLO, P. BANDECCHI, R. GHILARDUCCI, A. POLI, F. TOZZINI, M. BENDINELLI (1993): Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cultivation and polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31, 494- 501.

MUIRDEN, A. (2002): Prevalence of feline leukemia virus and antibodies of feline immunodeficiency virus and feline coronavirus in stray cats sent to an RSPCA hospital. Vet. Rec. 150, 621-625.

OBERT, L.A., E.A. HOOVER (2002): Early pathogenesis of transmucosal feline immunodeficiency virus infection. J. Virol. 76, 6311-6322.

OLRNSTED R. A., R. LANGLEY, M. E. ROELKE, R. M. GOEKEN, D. ADGER-JOHNSON, J. P. GOFF, J. P. ALBERT, C. PACKER, M. K. LAURENSON, T. M. CARO, L. SHEEPERS, D. E. WILDT, M. BUSH, J. S. MERTENSON (1992): Worldwide prevalence of lentivirus infection in wild feline species: epidemiologic and phylogenetic aspects. J. Virol 66, 6008-6018.

PEDERSEN, N.C., E.W. HO, M.L. BROWN, J. YAMAMOTO (1987): Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. Science. 235, 790-793.

PEDERSEN, N.C., J.K. YAMAMOTO, T. ISHIDA, H. HANSEN (1989): Feline immunodeficiency virus infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 21, 111-129.

PEDERSEN, N.C., C.M. LEUTENEGGER, J. WOO, J. HIGGINS (2001): Virulence differences between two field isolates of feline immunodeficiency virus (FIV-APetaluma and FIV -CPGammar) in young adult specific pathogen free cats. Vet. Immunol. Immunopathol. 79, 53-67.

PENNISI, M. G., S. BO (1994): Indagine epidemiologica nazionale FELV/FIV. Veterinaria 8, 9-15.

PERHARIĆ, M., M. BIĐIN, V. STAREŠINA, Z. MILAS, N. TURK, Z. ŠTRITOF, S. HAĐINA, J. HABUŠ, V. STEVANOVIĆ, V. MOJČEC-PERKO, S. KOVAČ, K. MARTINKOVIĆ, LJ. BARBIĆ (2016): Phylogenetic characterisation of feline immunodeficiency virus in naturally infected cats in Croatia indicates additional heterogeneity of subtype B in Europe. Arch. Virol. 161, 2567-2573.

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.

PISTELLO, M., G. CAMMAROTA, E. NICOLETTI, D. MATTEUCCI, M. CURCIO, D. DEL MAURO, M. BENDINELLI (1997): Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationship of Italian isolates of feline immunodeficiency virus indicates a high prevalence and heterogeneity of subtype B. J. Gen. Virol. 78, 2247-2257.

PONTIER D., D. FOUCHET, N. BAHI- JARET, H. POULET, M. GUISERIX, E. NATOLI, F. SAUVAGE (2009): When domestic cat (Felis silvestris catus) population structures interact with their viruses. Comptes Rendus Biologies. 332(2–3):321–328.

POTKONJAK, A., V. VRAČAR, I. STANČIĆ, LJ. SPASOJEVIĆ KOSIĆ, D. BACIĆ, M. CINCOVIĆ, B. TOHOLJ, O. STEVANČEVIĆ, Z. RISTIĆ (2014): Occurrence of Bartonella henselae, FeLV and FIV infection in 60 stray cats from Serbia. Acta Vetrinaria 64, 378-385.

ROELKE, M.E., BROWN, M.A., TROYER, J.L., WINTERBACH, H., WINTERBACH, C., HEMSON, G., SMITH, D., JOHNSON, R.C., PECON-SLATTERY. J., ROCA, A.L., ALEXANDER, K., KLEIN, L., MARTINELLI, P., KRISHNASAMU, K., O'BRIEN, S.J (2009): Pathological manifestation of feline immunodeficiency virus (FIV) infection in wild African lions. Virology 390, 1-12.

SAMMAN, A., E.L. McMONAGLE, N. LOGAN, B.J. WILLETT, R. BIEK, M.J. HOSIE (2011): Phylogenetic characterisation of naturally occurring feline immunodeficiency virus in the United Kingdom. Vet. Microbiol. 150, 239-247.

SAMMAN, A., N. LOGAN, E.L. McMONAGLE, T. ISHIDA, M. MOCHIZUKI, B.J. WILLETT, M.J. HOSIE (2010): Neutralization of feline immunodeficiency virus by antibodies targeting the V5 loop of Env. J. Gen. Virol. 91, 242-249.

SELLON, R.K., K. HARTMANN (2012): Feline immunodeficiency virus infection. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4th ed., GREENE, C.E., Ed.; Elsevier, Saunders: St Louis, MO, USA. pp. 136-149.

SHELTON, G.H., R.M. WALTIER, S.C. CONNOR, C.K. GRANT (1989): Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection in pet cats. J. Am. Animal. Hosp. Assoc. 25, 7–12.

SIGURDSSON, B. (1954): Observations on three slow infections in sheep. Maedi, paratuberculosis, rida, a slow encephalitis of sheep with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. Br. Vet. J. 110, 255-270.

STEINRIGL, A., D. KLEIN (2003): Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in Central Europe: a prerequisite for vaccination and molecular diagnostics. J. Gen. Virol. 84, 1301-1307.

STEINRIGL, A., R. ERTL, I. LANGBEIN, D. KLEIN (2010): Phylogenetic analysis suggests independent introduction of feline immunodeficiency virus clades A and B to Central Europe and identifies diverse variants of clade B. Vet. Immunol. Immunopathol. 134, 82–89.

SYKES, J.E. (2014): Feline immunodeficiency virus infection. In: Canine and feline infectious diseases, SYKES, J.E., Ed.; Elsevier, Saunders: St. Louis, Missouri 63043, USA. Pp. 209-223.

TOZON, N., A. NEMEC SVETE, M. ZEMLJIČ, M. ZAKOŠEK, D. BARLIČ-MAGANJA (2008): High prevalence of feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) in Slovenia. Acta Veterinaria 58, 191-201.

TROYER, J.L., J. PECON-SLATTERY, M.E. ROELKE, W. JOHNSON, S. VANDEWOUDE, N. VAZQUEZ-SALAT, M. BROWN, L. FRANK, R. WOODROFFE, C. WINTERBACH, H. WINTERBACH, G. HEMSON, M. BUSH, K.A. ALEXANDER, E. REVILLA, S.J. O'BRIEN (2005): Seroprevalence and genomic divergence of circulating strains of feline immunodeficiency virus among Felidae and Hyaenidae species. J. Virol. 79, 8282-8294.

VALLÉE, H., H. CARRÉ (1904): Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D Sci. Nat. 139, 331-333.

WEAVER, E.A. (2010): A detailed phylogenetic analysis of FIV in the United States. PLoS One 5, e12004.

YAMAMOTO, J.K., H. HANSEN, E.W. HO, T.Y. MORISHITA, T. OKUDA, T.R. SAWA, R.M. NAKAMURA, N.C. PEDERSEN (1989): Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. J. Am. Vet. Med. Assoc. 194, 4213-4220

8. SAŽETAK

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA I FILOGENETSKE OSOBITOSTI *ENV* GENA VIRUSA MAČJE IMUNODEFICIJENCIJE U PRIRODNO INFICIRANIH MAČAKA U REPUBLICI HRVATSKOJ

Valentina Kunić

Infekcija virusom mačje imunodeficijencije (FIV) retrovirusna je zarazna bolest domaćih mačaka te predstavlja jedan od vodećih uzroka uginuća mačaka zarazne etiologije. Bolest je proširena među populacijom domaćih mačaka diljem svijeta s visokom prevalencijom u urbanim sredinama. Kao i ostali pripadnici roda *Lentivirus,* FIV uzrokuje perzistentnu infekciju transkripcijom virusne ribonukleinske kiseline (RNK) u provirusnu deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK), te njezinom ugradnjm u genom domaćina. Upravo radi sličnosti s virusom humane imunodeficijencije (HIV), FIV predstavlja istraživački model u pronalasku učinkovitijeg liječenja i imunoprofilakse HIV-a. Obzirom da etiološko izliječenje zaražene jedinke nije moguće provesti te da imunoprofilaksa ne zaštićuje mačke od filogenetski različitih podtipova terenskih sojeva virusa, mjere opće profilakse predstavljaju najznačaniji model u prevenciji i suzbijanju zaraze. Upravo je poznavanje filogenetskih karakteristika terenskih sojeva virusa jedan od osnovnih preduvjeta razvoja učinkovitijih dijagnostičkih i imunoprofilaktičnih mjera. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi perzistentnu infekciju virusom mačje imunodeficijencije dokazom specifičnih nukleotidnih sljedova provirusnog *env* gena. Po prvi puta na području Republike Hrvatske, infekcija je dokazana navedenom molekularnom metodom dokazom *env* gena u 14 serološki FIV pozitivnih mačaka. Filogenetskim analizama i usporedbama umnoženog odsječka provirusnog *env* gena FIV-a s nukleotidnim sljedovima *env* gena iz genske banke, utvrđena je pripadnost svih 14 izolata s područja Republike Hrvatske virusnom podtipu B. Pored pripadnosti B podtipu dokazana je i srodnost s izolatima bližeg zemljopisnog područja. Većina nukleotidnih sljedova provirusnog *env* gena dobivenih ovim istraživanjem najsrodnija je s izolatima virusa mačje imunodeficijencije s područja Austrije. Iako svih 14 nukleotidnih sljedova provirusnog *env* gena pripada B podtipu, uočena je i njihova međusobna heterogenost.

Ključne riječi: virus mačje imunodeficijencije, FIV, filogenetska analiza, B podtip, Hrvatska

9. SUMMARY

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS *ENV* GENE IN NATURALLY INFECTED CATS IN CROATIA

Valentina Kunić

Feline immunodeficiency virus (FIV) infection is a retroviral infectious disease of domestic cats and is one of the leading causes of death of infectious etiology among cats. The disease is spread among the population of domestic cats around the world with high prevalence in urban areas. As other members of the genus *Lentivirus*, FIV causes persistent infection by transcribing viral ribonucleic acid (RNK) into proviral deoxyribonucleic acid (DNA) and incorporating it into the host genome. Because of its similarity with the human immunodeficiency virus (HIV), FIV presents a valuable research model for finding more effective treatment and HIV immunoprophylaxis. Given that etiologic treatment of the infected individual is not possible to carry out and that the immunoprophylaxis does not protect the cats from the phylogenetically different subtypes of field viral strains, general prophylactic measures represent the most significant model for prevention and suppression of the infection. Knowledge of the phylogenetic characteristics of field viral strains is one of the prerequisites for the development of more effective diagnostic and immunoprophylactic measures. The aim of this study was to determine the persistent infection from the feline immunodeficiency virus by proving the specific nucleotide sequences of the provirus *env* gene. The persistent infection was first proved in the Republic of Croatia in 14 FIV serologically positive cats by the stated molecular method. Phylogenetic analyses of the multiplicated sequence of FIV proviral *env* gene, along in comparison with the sequences of *env* gene from the gene bank, identified the phylogenetic affiliation of all 14 isolates from the territory of the Republic of Croatia to the viral subtype B. In addition to belonging to the viral B subtype, the isolates are phylogenetically shown to correlate with the other isolates from the nearest geographic region. Most of the nucleotide sequences obtained by this research show the most resemblance with the isolates of the feline immunodeficiency virus from Austria. Although phylogenetically all 14 nucleotide sequences of the proviral *env* gene belong to the B subtype, their mutual heterogeneity is also observed.

Key Words: Feline immunodeficiency virus, FIV, phylogenetic analysis, subtype B, Croati

10. ŽIVOTOPIS

Valentina Kunić rođena je 30. travnja 1993. godine u Zagrebu. U razdoblju od 2008. do 2012. godine pohađala je zagrebačku III. opću gimnaziju te 2012. godine upisuje Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Trenutno je apsolventica šeste godine s ukupnim prosjekom ocjena 4.615. i 364.5 ostvarenih ECTS bodova.