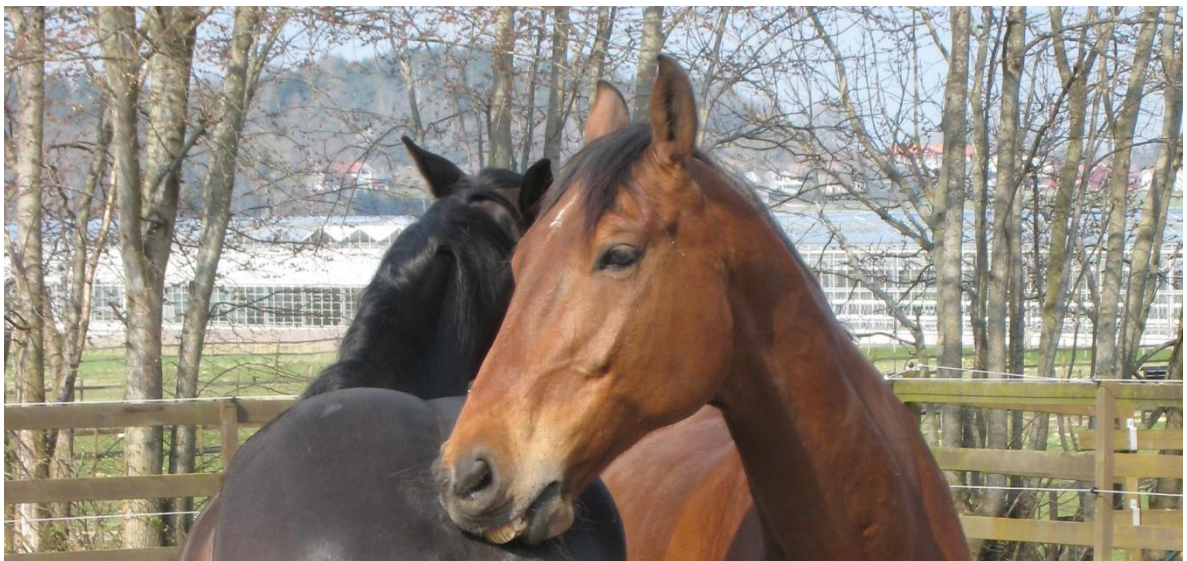




Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Antigena strukturer av betydelse för ett skyddande förvärvat immunsvär mot ekvint infektiöst anemivirus (EIAV)

Andrea Larsson



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014: 67

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2014



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Antigena strukturer av betydelse för ett skyddande förvärvat immunsvaret mot ekvint infektiöst anemivirus (EIAV)

Antigenic structures involved in development of protective acquired immunity against Equine infectious anemia

Andrea Larsson

Handledare:

Magnus Åbrink, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Caroline Fossum, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2014

Omslagsbild: Fotograf: Maria Svernhage

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014: 67
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Ekvint infektiös anemi virus, förvärvat immunförsvar, cellmedierat immunförsvar, Antikroppsmedierat immunförsvar, Vård-virusdynamik, neutraliserande antikroppar.

Key words: Equine infectious anemia, acquired immunity, cellmediated immunresponse, humoral immunresponse, host- virus dynamics, neutralizing antibody.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning.....	1
Summary	2
Inledning.....	3
Virusets yttre egenskaper och uppbyggnad.....	3
Infektionsförlopp.....	4
Patogenes	4
Material och metod.....	4
Litteraturoversikt.....	5
Hur uppför sig viruset i värden?	5
Tidig infektion.....	5
Framskriden infektion	5
Förvärvat immunförsvar.....	6
Cellmedierat immunförsvar	6
Antikroppsmedierat immunförsvar.....	7
Diskussion.....	8
Litteraturförteckning.....	10

SAMMANFATTNING

Denna litteraturstudie undersöker vilka immunogena strukturer som har betydelse för utveckling av ett skyddande förvärvat immunsvaret mot ekvint infektiöst anemivirus (EIAV).

Ekvin infektiös anemi (EIA) är en virussjukdom som drabbar hästdjur. Den kännetecknas av ett förlopp med periodiska viremier. Symtomen som ses i samband med viremi orsakas av proinflammatoriska cytokiner från det medfödda immunsvaret. Värden blir vanligtvis asymtomatisk inom ett år efter infektion, därefter fortsätter individen att vara persistent infekterad under resten av livet.

EIAV kan överföras via kanyler eller blodsugande vektorer (bromsar och stallflugor) som intar blod från hästar med viremi. Virus från blodet på insektens mundelar förs ut i cirkulationen när den biter en ny häst. Viruset infekterar och replikerar i makrofager, vilket leder till att vävnader som har rikligt med makrofager har höga virus titrar, även om halterna varierar med infektionsfas och virulens hos virusstammen.

Ett cellmedierat förvärvat immunsvaret förmodas vara en mycket viktig faktor för att begränsa virusreplikationen under den akuta fasen. Antagandet bygger på att virusspecifika cytotoxiska T-lymfocyter uppkommer mycket tidigt. De eliminerar infekterade celler genom lysis, vilket minskar viremin och därmed även de kliniska symtomen. Det här tidiga cellmedierade svaret är riktat mot immunodominanta, variabla höljestruturer, men specificiteten förändras under infektionens gång. Gradvis riktas specificiteten hos det cellmedierade immunsvaret till immunoressesiva, mindre mutationsbenägna epitoper på virusets hölje och till andra bevarade virala strukturer som Gag-proteinet.

Det antikroppsmedierade immunsvaret riktas huvudsakligen mot höljesepitoper. Liksom det cellmedierade immunsvaret, riktas det initialt mot variabla strukturer, för att hos ett moget antikropps svar vara både bredare och riktat mot mer bevarade strukturer. Neutraliserande antikroppar har påvisats vid olika tidpunkter; från 14 dagar PI till ett par månader efter infektion, och oftast efter att de första icke-neutraliserande antikropparna påvisats. Effekten av tidiga neutraliserande antikroppar är inte fullt förstådd, men troligen är de neutraliserande antikropparna involverade i att understödja det cellmedierade försvaret under den kroniska och subakuta fasen, samt för att upprätthålla kontroll hos asymtomatiska hästar.

Adaption av det förvärvade immunsvaret skapar ett selektionstryck i virusets miljö. Hästens immunsvaret förmår inte eliminera viruset helt, och mellan virusgenerationer kan stammens kontinuerliga mutationer producera nya varianter som inte känns igen av befintligt immunsvaret. Dessa så kallade escape-mutants privilegieras då av selektionstrycket, och kan replikera i högre grad än andra typer. Det första förvärvade immunsvaret driver en snabb antigendrifting genom att vara riktat mot mycket få, variabla epitoper som är sannolika att mutera i högre utsträckning. Ett skyddande immunsvaret verkar alltså kräva en bred specificitet mot bevarade virusstrukturer hos både det cellmedierade och antikroppsmedierade immunsvaret.

SUMMARY

The aim of this study is to account for some of the viral antigenic structures, involved in development of a protective acquired immunity in horses infected with equine infectious anaemia virus (EIAV).

Equine infectious anemia (EIA) is a viral disease affecting equids, mainly *E. caballus*. The disease is characterized by recurrent cycles of viremia, which in turn, triggers innate immunity. Pro-inflammatory cytokines cause the symptoms seen during the acute and recurrent viremia, such as fever, lethargy, anemia, thrombocytopenia and weight-loss. Infected individuals usually recover from clinical EIA within a year post infection, thus the horse remain persistently infected throughout its life.

EIAV can be transmitted through injection needles or by bloodfeeding vectors such as horse flies and stable flies. Once introduced to the circulation of a naïve recipient, the virus infects and replicate in tissue macrophages, why the tissues with a richer macrophage population is observed to have the highest virustiters. The tissue viral-burden is seemingly dependent on phase of disease and virulence of the infection strain.

The cell-mediated immunity is assumed to be the first line of defense, with an important limiting effect on virus replication, as virus-specific CTLs are detected at the time when acute viremia is terminated. CTL-recognition is early directed towards immunodominant, variable epitopes at two envelope glycoproteins, gp90 and gp45. During the course of infection, the response is gradually redirected towards immunorecessive, less variable regions of gp-90 and gp-45, as well as to more conserved viral structures such as Gag-proteins.

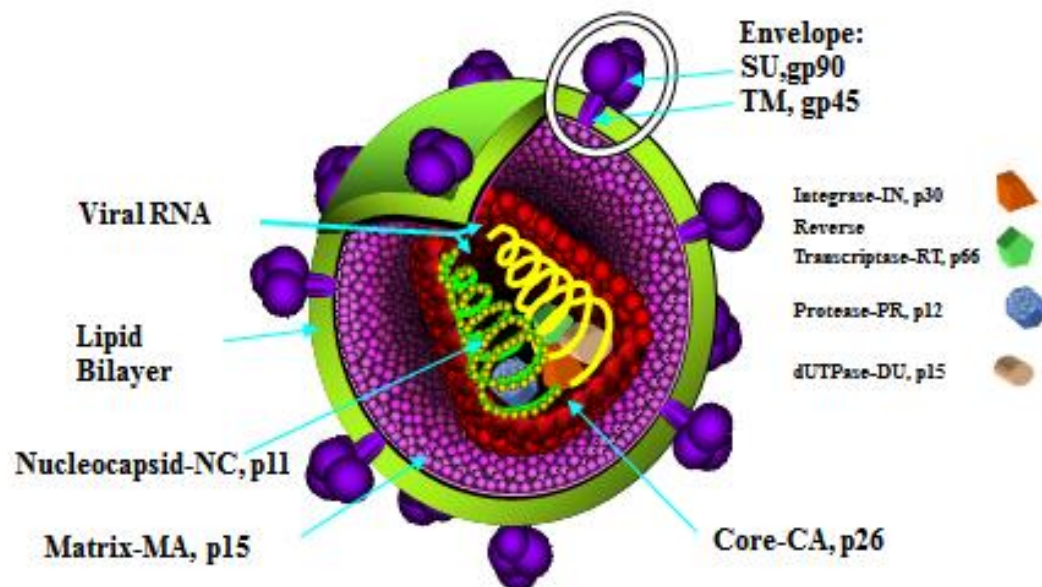
Humoral immunity is mainly targeting gp90 and gp-45, and much like the cellmediated response, it will initially recognize immunodominant, highly variable epitopes. Mature humoral immuneresponse, is typically directed towards less variable regions of the SU and TM and also becomes broader, with conformational-dependent recognition. Detection of neutralizing antibody from different studies range between at earliest 14 days PI to 3 months PI, and the contribution of these antibodies to control of early infection is unclear. However they seem important to contribute to control of long-term infection in combination with CTLs.

Adaptive immunity creates an environment of selection-pressure upon the virus. During early infection, the target structure is highly specific, and recognition is narrow. Since the horse is unable to completely eliminate the virus, it is likely to select for new mutant-variants, which escape the acquired response during early infection. A mature acquired immune response is harder to escape since it is broadening with every new viral type produced, and directed to regions that allow less mutation for the virus to remain viable and virulent.

INLEDNING

Equine Infectious Anemia (EIA) är en sjukdom orsakad av ett retrovirus som hör till gruppen lentivirus; Equine infectious anemia virus (EIAV). Det enkelsträngade RNAviruset infekterar hästar, åsnor, mulor och orsakar en av de allvarliga hästsjukdomar listade som anmälningspliktiga av OIE (Cook *et al*, 2013). Hästar är speciellt mottagliga. I vissa fall blir sjukdomen mycket svår och hästen blir progressivt sämre med karaktäristiska, periodiska symptom såsom feber, diarré, trombocytopeni, letargi, inappetens och anemi i samband med viremitoppar. EIAs unika egenskaper och infektionsbild (med symptomlösa bärare) i kombination med dess släktskap med HIV har gjort det intressant att studera den även ur humanmedicinskt perspektiv. EIAV förekommer på många håll i världen och sprids med blodsugande vektorer, främst av arter ur *tabanidae* (bromsar). Virus från blodet på insektens mundelar från ett tidigare blodmål, överförs när insekten biter en ny individ (Cook *et al*, 2013). I Europa förekommer sjukdomen endemiskt i Rumänien och Italien (SVA, 2012).

Virusets yttre egenskaper och uppbyggnad



Figur 1. Illustration av ett EIAV virion.. Issel, C.J., Cook, R.F., Mealey, R.H. & Horohov, D.W."Equine infectious anemia (EIA) in 2014: Live with it or eradicate it?" 2014. (Unpublished data obtained through personal communication.) Used with permission from Dr Charles J Issel..

EIAV består liksom andra virus ur släktet lentivirus, av ett genom, omgivet av kapsid och ytterst av ett plasmamembran, ett hölje. EIAV har det enklaste genomet av virusfamiljen. Förankrat i höljet finns två glykoproteiner, gp90 och gp45 som även benämns Surface Unit (SU) och Transmembrane Unit (TM). EIAV infekterar makrofager genom att binda till samma receptor som Tumör nekrosfaktor (TNF) gör. Viruset binder med hjälp av gp-90 (SU) som därför underlättar upptaget av infektiösa virion genom endocytos (Cook *et al*, 2013). SU och TM anses i dagsläget vara de huvudsakliga epitopena för det antikroppmedierade immunsvaret, men innehåller även epitoper för cellmedierad immunitet. Kartläggning av SU har avslöjat distinkta variabla och bevarade regioner; mutationerna är alltså inte jämt förelade över hela strukturen, utan koncentreras till åtta regioner (Cook *et al*, 2013). Mindre är känt om TM, men man anser att ektodomänen på TM är mer variabel än den membranskyddade svansen

(Tagmyer *et al*, 2007). Ytterligare virala proteiner (ex Gag) har associerats med igenkänning via cellmedierat immunsvär. De antigena strukturerna ger immunsväret en chans att begränsa och eliminera virusinfektionen genom att dessa känns igen av immunförsvärets celler som cirkulerande viruspartiklar eller som viruspeptider på infekterade celler. Den immunologiska kontrollen av infektionen kompliceras emellertid av att dessa strukturer ständigt förändras, ett fenomen som kallas antigendrift (Cook *et al*, 2013).

Infektionsförlopp

Infektionsbilden för EIA är mycket karaktäristisk, och skiljer sig från andra virus inom sitt släkte. Inkubationstiden är kort och kliniska symtom av sjukdomen förekommer i samband med upprepade, distinkta cykler av viremi (SVA 2012, Harrold *et al*, 2000). Den typiska infektionsgången hos en häst är en initial akut fas, en subakut/kronisk fas och ett asymtomatiskt bärarstadie. Första feberattacken ses inom 1-2 veckor efter infektion. Under denna akuta fas uppvisar hästen vanligen kraftiga kliniska symtom med viremi, feber, trombocytopeni och anemi. Efter den första viremitoppen följer vanligtvis flera episoder av nya men något mildare viremier (subakut), för att sedan övergå i en liknande kronisk fas (Leroix *et al*, 2001, SVA 2012). Infektionsgången kan variera kraftigt beroende på stam av EIAV och individuellt immunsvär som hästen utvecklar (Cook *et al*, 2013). Övergången till asymtomatisk sjukdom sker vanligen inom ett år, och därefter är individerna i regel subkliniskt infekterade resten av livet, med låga virustiter eller nivåer under detektionsgräns i plasma. Hästar som drabbas mildare av infektionen med färre typiska återfall i viremi brukar benämnas nonprogressors. Individer som inte förmår att kontrollera infektionen effektivt benämns istället som progressors och karaktäriseras av fler och allvarigare cykler med viremi (Leroix *et al*, 2001). Asymtomatiska hästar avviker i regel inte från normal hälsostatus, och skiljer sig alltså inte kliniskt från seronegativa individer. Diagnostisering sker därför ibland i samband med rutinundersökning av blodprover eller utredning av andra anledningar (Cook *et al*, 2013).

Patogenes

Förhöjd virustiter i blodet utlöser kliniska symtom, då detta triggas frisättande av pro-inflammatoriska cytokiner. IgG och IgM antikroppar binder viralt antigen och bildar immunkomplex som deponeras på trombocyter och erythrocyter, vilket leder till att de elimineras genom fagocytos. De förhöjda nivåerna av pro-inflammatoriska cytokiner bidrar ytterligare till trombocytopenin, suppression av megakaryocyter samt hämmad erythropoes. Processen med ökad immunmedierad eliminering av erythrocyter och trombocyter bidrar också till hepatomegali och splenomegali (Cook *et al*, 2013).

EIA är alltså en svårhanterad sjukdom som lyckligtvis är utrotad i Sverige (SVA, 2012). Syftet med denna litteraturstudie är att redogöra för viktiga antigena strukturer, som, enligt befintlig forskning, anses vara betydande för utveckling av skyddande immunsvär.

MATERIAL OCH METOD

Under litteratursökning användes sökdatabaserna web of science, pubmed och endast mycket begränsat, scopus. Sökningarna var ganska breda tidigt under arbetet och sökord inkluderar, men är inte begränsat till: EIAV pathogenesis (OR lesions OR symtoms), EIAV (OR EIA) AND acquired immunity (OR CTL, OR humoral OR antibody). Då många av artiklarna berörde vaccnutveckling, utslöts en del oaktuella artiklar genom att lägga in NOT vaccine, som sökspecifikation för titeln. Sökord till andra artiklar har ibland hämtats direkt i referenslistan på speciellt intressanta artiklar.

LITTERATURÖVERSIKT

Hur uppför sig viruset i värden?

Tidig infektion

Infektiösa virion som introduceras till cirkulationen infekterar både makrofager och monocyter, men replikation anses ske endast i makrofager (Harrold *et al*, 2000). Monocyter förmodas dock bidra till systemisk spridning genom att föra med sig viruset ut i vävnader utan att upptäckas av immunsvaret. När monocyterna sedan mognar ut i vävnaden börjar viruset att replikera. I ett försök användes ponnyer för att testa virusreplikation i några utvalda vävnader; dessa var njure (cortex och medulla), sublingual- och mandibularlymfknota, benmärg, lever, mjälte, samt hjärnprover (medulla, cerebrum, och cerebellum). Den vävnadsbundna virusbördan sågs variera kraftigt mellan infektionsstadier och virulens hos virusstammen under försöket. Mätning av virustiter under akut infektion (2 veckor PI) visade på en vitt spridd virusreplikation i alla undersökta vävnader för båda virusstammarna som användes i studien (fältstam EIAV_{wyo} respektive cellkulturanpassade EIAV_{pv}). Halter av viralt DNA i vävnadsprover från djur akut infekterade med EIAV_{pv} var dock generellt lägre än för EIAV_{wyo}. Samtidigt fastställde studien, trots en vitt spridd replikation, mjälten som den dominerande vävnaden för virusreplikation under den akuta sjukdomsfasen. Akut infekterade hästar associeras också med mycket höga virustiter i plasma, i kontrast mot asymtomatiska djur (Harrold *et al*, 2000).

Närvaron av virala antigen vid en viremi triggar det medfödda immunförsvaret och leder till frisättning av pro-inflammatoriska cytokiner. Cytokinerna orsakar de kliniska symtom som associeras med akut EIA och cykliska återfall. Eftersom viruset specifikt infekterar en av de celltyper som medierar medfött immunförvar-, diskuteras om viruset manipulerar makrofager till ökad frisättning av pro-inflammatoriska cytokiner eller om det är enbart den allmänna reaktionen på närvaro av virus med påföljande cytokinproduktion som ger symtomen (Cook *et al*, 2013).

Framskriden infektion

Förekomst av viralt DNA eller RNA under senare skede av infektionen, har indirekt bekräftat att vävnadsbundna makrofager är främsta källan till virusreplikation, då resultaten visade generell hög förekomst i vävnaderna mjälte, lever och njure (Harrold *et al*, 2000), som alla är rikligt infiltrerade av makrofager. I den här studien var endast två asymtomatiska individer representerade men resultatet var enhetligt. Asymtomatiska djur visade sig ha mycket låga vävnadskoncentrationer av virus överlag, baserat på halterna DNA och RNA i samtliga testade vävnadstyper, men med tendens till högre koncentration i mjälte. Inget eller mycket låga koncentrationer av RNA och inga infektiösa virion uppmättes i plasma under feberfri period (Harrold *et al*, 2000).

Tidigare studier har endast hittat begränsade virustitrar i PBMC, vilket stödjer den utbredd accepterade teorin att det bara är mogna vävnadsmakrofager och inte cirkulerade monocyter som i första hand infekteras och replikation sker i (Harrold *et al*, 2000). Trots det hittade Harrold *et al* (2000), oväntat höga koncentrationer av viralt DNA och/ eller RNA i PBMC hos tre av fyra individer, akut infekterade med antingen EIAV_{wyo} eller EIAV_{pv}. Det fyndet utmanar ovanstående teori om monocyter som värdceller, men författarna anger som möjlig förklaring till fyndet att detta kan reflektera den ökade aktiveringen av monocyter i samband med infektion (Harrold *et al*, 2000).

Avsaknad av sjukdomstecken överensstämmer alltså med låga vävnadskoncentrationer av virus, och låga eller odetekterbara koncentrationer i plasma, baserat på kvantitativa mätningar av infektiösa virion (Harrold *et al*, 2000). Att de låga halterna beror på ett funktionsdugligt förvärvat försvar demonstreras tydligt av infekterade SCID- föl som inte förmår att häva viremin (Cook *et al*, 2013). Trots immunförsvarets gedigna kontroll hos immunokompetenta hästar elimineras aldrig viruset helt, utan kvarstår i reservoarvävnader. Så snart immunförsvaret dämpas, ökar replikationstakten hos viruset igen. Exempelvis behandling med glukokortikoider eller dexamethasone utlöser ny viremi hos hästar som uppnått en asymtomatisk fas (Cook *et al*, 2013). Försök med friska, seronegativa hästar som infekteras av blod från asymtomatiska individer, ger ytterligare indikationer på att viruset persisterar, men att sjukdomstecken inte utbryter på grund av kontroll från det förvärvade immunsvaret (Issel *et al*, 1982). Viruset verkar inte heller genomgå någon betydande attenuering hos värden (Cook *et al*, 2013). Eftersom viruset persisterar livslångt i värden fortsätter det att formas av det selektionstrycket från det sammantagna förvärvade immunsvaret. Virustyper med ökande resistens mot brett neutraliserande antikroppar har påvisats upp till 800 DPI av Sponseller *et al* (2007).

Förvärvat immunförsvar

Det förvärvade immunsvaret mot EIAV är komplext och kräver minst 6-8 månader för att mogna (Hammond *et al*, 1997).

Cellmedierat immunförsvar

Cytotoxiska T-Lymfocyter (CTL) är förmodligen den viktigaste virushämmande faktorn i det tidiga förvärvade immunsvaret. CTLs mot virus har påvisats så tidigt som 14 dagar efter infektion (PI) (Mealey *et al*, 2005), i flera fall innan neutraliserande antikroppar påvisats (Hammond *et al*, 1997).

Tidigt CTL-svar ses primärt vara riktat mot immunodominanta (relativt starkt immunogena strukturer), variabla epitoper på SU. Mekanismen anses ha stor betydelse för att begränsa virusreplikationen, vilket dämpar den initiala viremin (Taylor *et al*, 2010). Senare under infektionen dras svaret mot mer immunorecessiva, mindre variabla epitoper på både SU och TM (Tagmyer *et al*, 2007).

Svaret mot strukturerna på höljet anses alltså ha en immunodominant inriktning. Epitoperna på SU har mycket variabla regioner som muterar lätt och ofta. Därför är det troligt att immunsvaret riktat mot variabla höljesepitoper kan selektera fram ett nytt utseende på viruset (Mealey *et al*, 2004), därigenom är det möjligt att viruset kan undkomma kontroll från det förvärvade immunsvaret, vilket leder till den akuta viremin och de karaktäristiska återfallen (Taylor *et al*, 2010). Hypotesen har fått stöd av forskning på föl med Severe combined immunodeficiency (SCID). I jämförelse mellan immunokompetenta föl och SCID föl med rekonstruerad förvärvad immunitet, var mutationstendensen i olika variabla, kända SU immunogena strukturer, betydligt lägre hos SCID-föl. Då föl med SCID saknar selektionstrycket som uppkommer med ett funktionellt förvärvat immunsvaret, sker inte mutation i samma höga omfattning och samtidigt är de mutationer som sker, synonyma med föregående struktur i högre utsträckning, jämfört med mutationer observerade hos virus som infekterar immunokompetenta föl. Denna jämförelse kunde på grund av den begränsade livslängden hos SCID- drabbade hästar, endast genomföras under tidigt skede av infektionen (Mealey *et al*, 2004).

Långvarigt skydd mot kliniska symtom är dock förknippat med cellmedierat svar mot mer bevarade virusepitoper. Bevarade epitoper för cellmedierat immunsvaret har registrerats inom mindre mutationsbenägna höljeregioner, samt på virala Gag-proteiner. Hos asymtomatiska och framgångsrikt vaccinerade hästar har SU- och TM-specifikt cellmedierat immunsvaret undersökts. CTLs och T-hjälpar (Th) riktade mot dessa epitoper hittades hos flertalet av hästarna, vilket stödjer tanken att strukturerna potentiellt innehåller viktiga determinanter för ett mer moget cellmedierat immunsvaret. Epitoperna benämns som bredreaktiva peptider när de inducerar proliferation av CTLs och Th från asymtomatiska, skyddade individer. Bägge celltyperna var vid mätillfället riktade mot både variabla och bevarade, mindre mutationsbenägna, epitoper inom SU och TM. (Tagmyer *et al*, 2007).

Om specificiteten skulle förbli fortsatt smal och riktad till variabla strukturer, likt det scenario som ses under den akuta fasen, skulle detta förmodligen bidra till att driva viruset till kontinuerlig antigendrift. De nya epitoper som uppkommer klarar sig sedan undan befintligt förvärvat immunsvaret. Gag- epitoper muterar mer sällan, och associeras inte med någon uttalad antigenescape, även om variation i aminosyrasekvensen vilket resulterade i minskad bindningsstyrka från CTLs har påvisats (Mealey *et al*, 2005, Taylor *et al*, 2010, Tagmyer *et al*, 2007). Gag- specifika CTLs påträffas i relativt höga koncentrationer hos asymtomatiska hästar och kopplas därför ihop med kontroll av virusreplikationen (Chung *et al*, 2005, Taylor *et al*, 2010, Mearley *et al*, 2005). Som möjliga mekanismer bakom kontrollen diskuteras Gag-specifika CTL-s med affinitet mot flera olika antigena epitoper på Gag, eller alternativt, CTL-s med affinitet mot färre, mycket starkt bevarade Gag-epitoper (Chung *et al*, 2005). Värdet av ett cellmedierat immunsvaret med högre bindningsstyrka (affinitet) till färre epitoper på Gag, över en svagare affinitetsstyrka till flera epitoper förmodas vara avgörande för effektiv identifiering och snabb lys av virusinfekterade celler via cellmedierat immunförsvar. Det kan inte heller uteslutas att samma principer gäller för andra virala strukturer (Chung *et al*, 2005).

Antikroppsmedierat immunförsvar

Humoralt immunförsvar är främst riktat mot SU, och till viss del mot TM (Ball *et al*, 1992), men även antikroppar riktade mot viralt Gag har påvisats (Taylor *et al*, 2010). Observationer har hittills indikerat att antikroppssvaret utvecklas från att främst vara riktat mot linjära epitoper med hög specificitet under tidig infektion, till att senare vara riktat mot konformationsberoende epitoper (Hammond *et al*, 1997). Hästar infekterade av en virulent stam, hade i regel en större andel av antikropparna som band till de syntetiserade virala peptiderna än hästar infekterade med en avirulent stam, vilket Ball *et al* (1992) tror beror på mer omfattande virusreplikation i hästar infekterade av ett virulent virus.

En kartläggning av regioner på SU avslöjade målstrukturer för antikroppar, både neutraliserande och icke-neutraliserande. En principiell neutraliserande domän (PND) lokaliserades som upptar två av tre bindningsplatser för neutraliserande monoklonala antikroppar på SU (Ball *et al*, 1992). Resultatet visade också att affiniteten till olika regioner varierade över tiden hos individerna, vilket indikerar att antigendrift förekommer och att försvaret hela tiden riktas om mot olika strukturer (Ball *et al*, 1992). Mycket likt det cellmedierade svaret mot höljesepitoper, är det variabla regioner som det antikroppsmedierade immunsvaret tidigt och med hög specificitet riktar in sig på. Affiniteten till de variabla strukturerna med högre mutationsgrad driver en selektion mot nya antigena epitoper som leder till antigendrift, och viruset undkommer upptäckt av immunförsvaret (Mealey *et al*, 2005).

En annan egenskap hos gp90/SU som uppmärksammas under senare tid är dess kraftiga glykosylering (Cook *et al*, 2013, Sponseller *et al*, 2012). Undkommande av neutraliserande

antikroppmedierat immunsvaret har kunnat kopplas till förändringar i placering av glukoskedjor, som förmodas antingen förändra konformationen på inbindningsstället eller fysiskt dölja inbindningsstället på PND (Sponseller *et al*, 2012). Efterhand när svaret mognar uppstår antikroppar mot mer bevarade immunorecessiva strukturer på SU och TM (Tagmyer *et al*, 2007), men antikropparna ökar också i sin bindningsstyrka (Hammond *et al*, 1997).

Uppfattningen om när de första virus-specifika antikropparna uppträder, skiljer sig mellan studier och författare. Vid 21 dagar registrerades serokonvertering av Hammond *et al* (1997). En studie av Ball *et al* (1991) registrerade serokonvertering 17- 21 dagar PI, men författare verkar vara överens om att antikroppar så tidigt under infektionen är icke- neutraliserande och riktade mot enkla, linjära epitoper på höljet. De egenskaperna gör det mindre sannolikt att de tidiga antikropparna är associerade med något signifikant skydd mot infektionen i akut skede. Tidiga antikroppar kan dock öka antigenprocessering och presentationen av virusantigen för det cellmedierade immunsvaret (Hammond *et al*, 1997).

Neutraliserande antikroppar har påvisats vid olika tidpunkter i olika studier, och uppgifterna varierar mellan 45 dagar PI (Mealey *et al*, 2003) upp till 2-3 månader PI (Hammond *et al*, 1997) eller sammanfallande med början av asymtomatisk bärarfas (Sponseller *et al*, 2007). I en annan studie påvisades neutraliserande antikroppar oväntat tidigt redan 14 dagar PI, och då i samband med hävd, initial viremi (Mealey *et al*, 2005). Effekten av dessa tidiga, neutraliserande antikroppar är dock oklar eftersom att de inte anses ha en tillräckligt stark korrelation med minskad virustiter (Mealey *et al*, 2005). Effekten av neutraliserande antikroppar är inte heller helt förstådd för senare sjukdomsfas (Hammond *et al*, 1997).

Neutraliserande antikroppar har däremot associerats med visst skydd mot klinisk sjukdom i försök med infekterade SCID-fölen (Taylor *et al*, 2010). Studien utreder funktionen av neutraliserande antikroppar i frånvaro av ett förvärvat cellmedierat immunförsvar. Fölen med SCID infekterades med EIAV efter att ha fått virusfri plasma från en immunokompetent, asymtomatisk donator med neutraliserande antikroppar. Antikropparna visade sig kunna ge visst skydd mot virus homologa med infektionsstammen och för fem heterologa, registrerade mutationstyper av PND på SU. En neutraliseringsresistent variant, EIAV_{WSU5-V55}, av inokuleringsstammen hittades i tre av de studerade fölen som fick EIAV-specifika antikroppar. Virusvarianten var troligtvis närvarande i inokuleringsdosen, eftersom samma variant upptäcktes hos de tre fölen samtidigt. Det var sannolikt den som gav upphov till de kliniska symtom som sågs hos de fölen upptäcktes i. Ett av fölen som fått plasma från bärare förblev fri från viremi och inget viralt DNA hittades, övriga tre fölen likt kontrollfölen utvecklade viremi, men under betydligt färre dagar än kontrollerna. Fölen hade också signifikant mildare trombocytopeni än kontrollerna. Sammantaget demonstrerade resultaten att trots att fölen utsatts för en neutraliseringsresistent virusmutant, gav neutraliserande antikroppar ensamt ett visst skydd mot klinisk sjukdom. Mycket tyder alltså på att neutraliserande antikroppar också har en betydelsefull roll i det förvärvade immunförsvaret. EIAV_{WSU5-V55} hade förändringar på V3 och V4 inom PND, vilket överensstämmer med en tidigare studie, men även inom V6- V7. Förändringarna inom V6 och V7 kan dessutom ha lett till ytterligare konformationsändringar inom V3 och V4 som påverkade deras antigena egenskaper (Taylor *et al*, 2010).

DISKUSSION

EIAV är en stor utmaning för hästens immunförsvar. Det är ett agens som ständigt byter utseende och hittar sätt att undkomma kontroll, något som leder till upprepade aktiveringar av det medfödda immunsvaret. I fallet med EIAV är det huvudsakligen världens medfödda immunsvaret som ger upphov till de kliniska besvären, inte virusinfektionen *per se* (Cook *et al*,

2013). I många fall lyckas individen leva ett fullt normalt liv efter att ha utvecklat ett tillräckligt brett och anpassat förvärvat immunsvår, men även i de all då hästen inte ger vika för infektionen kan det krävas lång konvalescens innan hästen blir besvärsfri. På grund av den speciella interaktionen mellan virus och värd behöver immunförsvaret tid och ett antal virusgenerationer, för att till sist skapa ett effektivt svar mot de strukturer som tillåter mindre mutation. Virala strukturer med viktiga funktioner kan inte förändras lika mycket utan att förlora sin effekt, och det utnyttjas av värden (Chung *et al*, 2004).

Trots immunförsvarets anpassning, klarar den inte av att eliminera viruset helt. Intressant nog påverkas inte andra hästdjursarter lika hårt. Cellkulturer från åsnor och mulor uppvisar lika hög replikationstakt hos viruset, men individerna utvecklar inte lika allvarliga symtom som hästar (Cook *et al*, 2013). Cook *et al* (2013) ser människans målmedvetna hästavel som en möjlig faktor som åtminstone delvis kan ligga bakom dessa skillnader. Detta är ett intressant spår eftersom att samevolution och anpassning av både virus och värd inom andra områden associeras med mildare sjukdom (R.B., Weiss, 2002). Det är ju inte till fördel för virusets överlevnad att vara kraftigt virulent om detta kan ta livet av värden, eftersom att det begränsar replikation och spridning. R.B. Weiss har valt att fördjupa sig i interaktion mellan infektiösa agens och deras värd. I sin artikel uttrycker Weiss (2002) sina åsikter i ämnet; i vissa sammanhang kan virulens anses essentiellt för spridning av viruset, genom att exempelvis uppnå tillräckliga virusiter för att kunna prestera en infektion i en dos, rimlig för den mängd blod som finns på vektorers mundelar. Ofta kan dock inte kraftigt virulenta egenskaper alltid associeras till ökad spridning,. Inte sällan ses nya virussjukdomar, till exempel fågelinfluensa, ge allvarligare sjukdomar hos en ny värdjursart än den tidigare värden som den anpassats till och som i viss mån kan ha anpassat immunsvaret mot viruset (R.B., Weiss, 2002). Vårdanpassning kan kanske ha påverkats när andra egenskaper har prioriterats vid hästavel.

Studierna är till stor del oense om vilken del av det förvärvade immunförsvaret som är viktigast i att skapa kontroll över virusreplikationen (Mealey *et al*, 2005, Hammond *et al*, 1997). Studierna är dessutom ofta genomförda med > 10 år mellan, vilket gör det svårt att avgöra vilka skillnader i fynden som beror på till exempel nya, eventuellt mer tillförlitliga eller känsliga metoder. Eventuella svagheter i studierna var sällan presenterade i artiklarna, men ofta användes ett begränsat material, samtidigt som många av studierna var stora och undersökte flera parametrar. I flera fall betonar författarna att ytterligare studier krävs för att bekräfta slutsatserna.

Många av studierna har framhållit vikten av ett fungerande cellmedierat immunförsvår (Mealey *et al*, 2005, Hammond *et al*, 1997), men mycket tyder på att det är den sammantagna effekten av både cellmedierat och humoralt svar som ger skydd mot sjukdom (Cook *et al*, 2013, Hammond *et al*, 1997). Helhetsbilden antyder alltså att både cellmedierat och humoralt förvärvat immunsvår verkar viktigt för infektionskontroll. Däremot framhäver studierna att breddad specificitet och inriktning av immunsvaret mot starkt bevarade virala epitoper är fundamental för långvarig kontroll av virusreplikation trots fortsatt mutation av viruset. Betydelsen av cellmedierat respektive antikroppsmedierat immunsvår verkar dock skilja sig något vid de olika faserna under infektionen, då dessa uppkommer vid olika tidpunkter (Hammond *et al*, 1997). Antikroppsmedierat immunsvår anses sammantaget involverat i att hålla infektionen under kontroll, men författarna är alltså inte helt överens om precis när neutraliserande antikroppar uppkommer, eller hur stor del av kontrollen av virusbördan som dessa utövar (Mealey *et al*, 2005, Hammond *et al*, 1997). Därför krävs ytterligare forskning för att fastställa uppkomst och funktion av neutraliserande antikroppar. Förklaringen kan finnas i känslighet i metod, men fyndet av neutraliserande antikroppar redan vid 14 dagar PI är extremt jämfört med tidigare studier och studien omfattade endast två hästar (Mealey *et al*,

2005). Trots det tidiga fyndet av Mealey *et al*, (2005) påpekade författarna att korrelationen mellan minskad virusbörda och ett CTL svar var starkare, då detta var den tydligaste differentierande faktorn mellan den progressor och nonprogressor som ingick i studien.

Sammanfattningsvis krävs utveckling av ett robust och brett förvärvat immunsvaret för att hålla virustiter och kliniska symtom i schack, men mekanismerna bakom är inte fullt förstådda. Under infektionsförloppet kommer specificiteten till virala epitoper att utvecklas och riktas från immunodominanta, variabla determinanter till immunrecessiva, bevarade strukturer för både den cellmedierade och humoral komponenten hos immunförsvaret. När världens immunförsvaret har nått en tröskelleffekt, upphör kliniska symtom men dynamiken mellan virus och värd fortsätter (Sponseller *et al*, 2007). Mer forskning kommer att kunna ge en mycket klarare, mer detaljerad bild av hur det förvärvade immunsvaret byggs upp och utvecklas under infektionens gång, även om grundläggande samband har upptäckts.

LITTERATURFÖRTECKNING

Ball, J.M., Issel, C.J., Montelaro, R.C. & Rushlow, K. E. (1992). Detailed mapping of the antigenicity of the surface unit glycoprotein of equine infectious-anemiavirus by using synthetic peptide Strategies. *Journal of Virology*, vol 66, issue 2, ss 732- 742.

Chung, C.W., Mealey, R.H. & McGuire, C.T. (2004). CTL from carrier horses with diverse MHC class I alleles recognize epitope clusters in Gag matrix and capsid proteins. *Virology*, vol 327, issue 1, ss 144-154.

Chung, C.W., Mealey, R.H. & McGuire, C.T. (2005). Evaluation of high functional avidity CTL to Gag epitope clusters in EIAV carrier horses. *Virology*, vol 342, issue 2, ss228- 239.

Cook, R.F., Leroux, C. & Issel, C.J. (2013). Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus 2013; a review. *Veterinary microbiology*, vol 167, issue 1-2, ss 181- 214.

Hammond, S.A., Cook, R.F., Lichtenstein, D.L., Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (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*, vol 71, issue 5, ss 3840- 3852.

Harrold, S.M., Cook, S.J., Cook, R.F., Rushlow, K.E., Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (2000). Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. *Journal of virology*, vol 74, issue 7, ss 3112- 3121.

Issel, C.J. & Adams Jr W.V. (1982). Detection of equine infectious anemia virus in a horse with an equivocal agar gel immunodiffusion test reaction. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol 180, issue 3, ss 276-278.

Leroix, C., Craigo, J.K., Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (2001). Equine Infectious Anemia Virus Genomic evolution in progressor and Nonprogressor ponies. *Journal of virology*, vol 75, issue 10, ss 4570-4583.

Mealey, R.H., Zhang, B., Lieb, S.R., Littke, R.H. & McGuire, T.C. (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. *Virology*, vol 313, issue 2, ss 537- 552.

Mealey, R.H., Leib, S.R., Powner, S.L. & McGuire, T.C. (2004). Adaptive immunity is the primary force driving selection of equine infectious anemia virus envelope SU variants during acute infection. *Journal of virology*, vol 78, issue 17, ss 9295- 9305.

Mealey, R.H., Sharif, A., Ellis, S.A., Littke, M.H., Leib, S.R. & McGuire, T.C. (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*, vol 339, issue 1, ss 110- 126.

Sponseller, B.A., Sparks, W.O., Wannemuehler, Y., Li, Y.X., Antons, A.K., Oaks, J.L. & Carpenter, S. (2007). Immune selection of equine infectious anemia virus env variants during the long-term inapparent stage of disease. *Virology*, vol 363, issue 1, ss 156- 165.

Sponseller, B.A., Clark, S.K. & Friedrich, R.A. (2012). Mechanisms of Equine Infectious Anemia Virus Escape from Neutralizing Antibody Responses Define Epitope Specificity. *Viral immunology*, vol 25, issue 4, ss 324- 328.

SVA, 2012-11-14, *Infektiös anemi (EIA) hos häst*,

<http://www.sva.se/sv/Djurhalsa1/Hast/Infektionssjukdomar/Infektios-anemi-EIA-hos-hast/>

Tagmyer, T.L., Craigo, J.K., Cook, S.J., Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (2007). Envelope-specific T-helper and cytotoxic T-lymphocyte responses associated with protective immunity to equine infectious anemia virus. *Journal of general virology*, vol 88, ss 1324- 1336.

Taylor, S.D., Lieb, S.R., Carpenter, S. & Mealey, R.H. (2010). Selection of a Rare Neutralization-Resistant Variant following Passive Transfer of Convalescent Immune Plasma in Equine Infectious Anemia Virus-Challenged SCID Horses. *Journal of virology*, vol 84, issue 13, ss 6536- 6548.

Weiss, R.A. (2002). Virulence and pathogenesis. *Trends in microbiology*, vol 10, issue 7, ss 314- 317.